

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

LEONARDO ALUISIO BAUMGARTNER

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO SOBRE O
DESEMPENHO REPRODUTIVO DE MACHOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia*
quelen)**

Toledo
2023

LEONARDO ALUISIO BAUMGARTNER

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO SOBRE O
DESEMPENHO REPRODUTIVO DE MACHOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia
quelen*)

Dissertação 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 Mestre 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.

Baumgartner, Leonardo Aluisio

Efeito da suplementação de ácido fólico sobre o desempenho reprodutivo de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*) / Leonardo Aluisio Baumgartner; orientador Robie Allan Bombardelli. -- Toledo, 2023.

39 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico 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. Reprodução de peixes. 2. Nutrição de peixes. 3. Qualidade seminal. I. Bombardelli, Robie Allan, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEONARDO ALUISIO BAUMGARTNER

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE MACHOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

Dissertação 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 Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

COMISSÃO JULGADORA

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

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

Dr^a. Marlise Teresinha Mauerwerk
Universidade Federal do Paraná

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2023.

Local de defesa: Apresentado de forma remota.

Dedico este trabalho a Deus,
a minha família e amigos, e a
todos aqueles que
contribuíram para sua
realização.

RESUMO

A redução na qualidade dos gametas e da prole têm se apresentado como fator limitante para a piscicultura. Com isso, a nutrição de reprodutores pode ser uma estratégia para solucionar esses problemas, devido a sua influência direta nos processos de gametogênese e fertilidade dos gametas. A vitamina B9 ou ácido fólico, atua diretamente sobre a saúde, crescimento e na reprodução dos animais, tem participação no metabolismo de aminoácidos, na síntese de nucleotídeos, formação de DNA e RNA, além da ação antioxidante, melhorando a qualidade seminal dos animais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de ácido fólico sobre o crescimento e desempenho reprodutivo de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Foram utilizados 720 alevinos de jundiá ($3,72 \pm 0,02$ g), distribuídos em 24 tanques-rede multifilamento (4x2x1 m). O experimento teve uma duração de 300 dias com início no outono e término no verão. No início da primavera, os peixes foram classificados em machos ($128,14 \pm 1,83$ g) e fêmeas ($155,70 \pm 1,97$ g) e estocados 15 animais de cada sexo por unidade experimental. Os animais foram alimentados durante 300 dias com rações (34,75 %PB; 3100 kcal ED kg⁻¹) suplementadas com 0,00; 0,75; 1,50; 2,25; 3,00 e 3,75 mg de ácido fólico kg⁻¹ de ração. Na estação reprodutiva, os machos foram submetidos a coleta de sêmen. Os peixes foram submetidos à manipulação hormonal para sincronização da espermiacção e o sêmen foi coletado após 10 horas (água à 24°C). O sêmen coletado dos cinco machos de cada unidade experimental, sem contaminação e boa motilidade subjetiva, foi analisado quanto a sua motilidade, velocidade, concentração, integridade de membrana e estresse oxidativo, além de pH e osmolaridade. Uma amostra do sêmen foi submetida a técnica de criopreservação em nitrogênio líquido. Os mesmos parâmetros foram avaliados no sêmen criopreservado e sêmen fresco. Após 30 dias da coleta de sêmen, os animais foram anestesiados para obtenção dos parâmetros de peso e comprimento, e retirada de sangue para análises hematológicas e plasmática. Em seguida foram eutanasiados e dissecados para avaliação dos índices hepatossomatico, gonadossomatico e viscerossomatico, e coleta de amostras de testículo e fígado para estresse oxidativo. Os dados obtidos foram checados quanto aos pressupostos, submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, à 5% de probabilidade. Para o sêmen fresco os peixes alimentados com as rações suplementadas com 3,00 e 3,75 mg de ácido fólico.kg⁻¹ apresentaram as maiores ($p < 0,05$) motilidades (72,12 e 76,43%). No sêmen criopreservado os machos alimentados com rações suplementadas com 3,00 mg de ácido fólico kg⁻¹ apresentaram a maior ($p < 0,05$) motilidade (55,54%), velocidade curvilínea ($69,57 \mu\text{m s}^{-1}$), velocidade média de percurso ($49,53 \mu\text{m s}^{-1}$), velocidade em linha reta ($47,12 \mu\text{m s}^{-1}$) e velocidade espermática ($55,72 \pm 3,01 \mu\text{m s}^{-1}$). O estresse oxidativo nas células espermáticas reduziu com o aumento das concentrações de ácido fólico, com melhores valores nos níveis de 3,00 e 3,75mg de ácido fólico kg⁻¹. Os parâmetros sanguíneos de albumina, colesterol e aspartato aminotransferase (AST), foram afetados, havendo uma diminuição no colesterol e um aumento na albumina e AST. Portanto, recomenda-se a suplementação a partir de 3,00 mg de ácido fólico kg⁻¹ em rações destinadas à alimentação de planteis de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*).

Palavra-chave: Reprodução, nutrição, qualidade seminal.

ABSTRACT

The reduction in the quality of gametes and offspring has been presented as a limiting factor for fish farming. Thus, the nutrition of breeders can be a strategy to solve these problems, due to its direct influence on the processes of gametogenesis and fertility of gametes. Vitamin B9 or folic acid, acts directly on the health, growth and reproduction of animals, participates in amino acid metabolism, nucleotide synthesis, DNA and RNA formation, in addition to antioxidant action, improving the seminal quality of animals. The objective of the present work was to evaluate the effects of folic acid supplementation on the growth and reproductive performance of silver catfish (*Rhamdia quelen*) males. A total of 720 silver catfish fingerlings (3.72 ± 0.02 g) were distributed in 24 multifilament net-tanks (4x2x1 m). The experiment lasted 300 days starting in autumn and ending in summer. In early spring, fish were classified into males (128.14 ± 1.83 g) and females (155.70 ± 1.97 g) and 15 animals of each sex were stocked per experimental unit. The animals were fed for 300 days with rations (34.75%PB; 3100 kcal ED kg⁻¹) supplemented with 0.00; 0.75; 1.50; 2.25; 3.00 and 3.75 mg of folic acid kg⁻¹ of feed. In the breeding season, males were submitted to semen collection. The fish were submitted to hormonal manipulation for synchronization of spermiation and the semen was collected after 10 hours (water at 24°C). The semen collected from the five males of each experimental unit, without contamination and good subjective motility, was analyzed for its motility, speed, concentration, membrane integrity and oxidative stress, in addition to pH and osmolarity. A semen sample was submitted to the technique of cryopreservation in liquid nitrogen. The same parameters were evaluated in cryopreserved and fresh semen. Thirty days after semen collection, the animals were anesthetized to obtain weight and length parameters, and blood was drawn for hematological and plasma analysis. Then, they were euthanized and dissected for evaluation of hepatosomatic, gonadosomatic and viscerosomatic indices, and collection of testicle and liver samples for analysis of oxidative stress. The data obtained were checked for assumptions, submitted to analysis of variance and Tukey's test, at 5% probability. For fresh semen, fish fed diets supplemented with 3.00 and 3.75 mg of folic acid.kg⁻¹ showed the highest ($p < 0.05$) motility (72.12 and 76.43%). In cryopreserved semen, males fed rations supplemented with 3.00 mg of folic acid kg⁻¹ showed the highest ($p < 0.05$) motility (55.54%), curvilinear velocity ($69.57 \mu\text{m s}^{-1}$), average travel speed ($49.53 \mu\text{m s}^{-1}$), straight-line speed ($47.12 \mu\text{m s}^{-1}$) and sperm velocity ($55.72 \pm 3.01 \mu\text{m s}^{-1}$). Oxidative stress in sperm cells decreased with increasing concentrations of folic acid, with better values at levels of 3.00 and 3.75mg of folic acid kg⁻¹. The blood parameters of albumin, cholesterol and aspartate aminotransferase (AST) were affected, with a decrease in cholesterol and an increase in albumin and AST. Therefore, supplementation is recommended from 3.00 mg of folic acid kg⁻¹ in rations intended for feeding male silver catfish (*Rhamdia quelen*) flocks.

Keywords: Reproduction, nutrition, seminal quality

Dissertação elaborada e formatada
conforme as normas da publicação
científica Aquaculture. Disponível em:
<https://www.elsevier.com/journals/aquaculture/0044-8486/guide-for-authors>.

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Material e Métodos.....	11
2.1 Estrutura, animais e delineamento	11
2.2 Rações experimentais e alimentação.....	11
2.3 Parâmetros de qualidade de água	13
2.4 Crescimento.....	13
2.5 Coleta e avaliação do sêmen fresco	13
2.6 Sêmen criopreservado	14
2.7 Fertilização do sêmen criopreservado	15
2.8 Coleta de material biológico	15
2.9 Análises hematológicas.....	16
2.10 Análises bioquímicas	16
2.11 Análise estatística.....	18
3. Resultados	18
4. Discussão	25
5. Conclusão	29
6. Referências bibliográficas.....	29

1. Introdução

A aquicultura é a atividade agropecuária que mais cresce em todo o mundo (FAO, 2022). E os peixes de água doce são o maior grupo de organismos aquáticos produzidos, apresentando uma produção de 54,4 milhões de toneladas em 2020, e um crescimento de 2,7% entre 2019 e 2020 (FAO, 2022). Com esse contínuo crescimento, a piscicultura fornecerá mais da metade dos peixes do mundo para consumo humano nos próximos anos (FAO, 2020).

O jundiá ou bagre prateado (*Rhamdia quelen*) é um teleósteo que pertence à família Heptapteridae. Endêmico da América do Sul, é encontrado do sul do México ao centro da Argentina (Baldisserotto, 2009). É uma espécie onívora com tendência a carnívora (Santos e Meurer, 2020), que se adapta a dietas artificiais (Parra et al., 2008), apresenta rusticidade, rápido crescimento e boa conversão alimentar (Santos e Meurer, 2020). Além disso, apresenta boa taxa de fecundidade e fertilidade (Adames et al., 2015), e boa aceitação do mercado consumidor (Baldisserotto, 2009; Santos e Meurer, 2020). O jundiá é a quarta espécie com maior número de produtores no Brasil, totalizando 36 mil piscicultores distribuídos em 23 estados, com destaque para o Rio Grande do Sul com 56,7% da produção nacional (Peixe BR, 2020).

Para atender à crescente demanda, o setor aquícola precisa desenvolver estratégias que garantam a oferta de proles com quantidade e qualidade. Dentre as diferentes estratégias, nos últimos anos, tem-se dado ênfase à nutrição dos reprodutores, pois está diretamente relacionada à gametogênese e à qualidade dos gametas (Bombardelli et al., 2010; Bombardelli et al., 2017). Nesse sentido, diversos estudos focam na determinação das exigências nutricionais dos peixes durante a fase reprodutiva (Tessaro et al., 2012; Bombardelli et al., 2017), além da avaliação de alimentos (Parra et al., 2008; Mewes et al., 2016; Bombardelli et al., 2021) e o uso de aditivos funcionais (Bombardelli et al., 2021a; Bombardelli et al., 2021b; Bombardelli et al., 2023).

De modo geral, a grande maioria das pesquisas realizadas com nutrição de reprodutores são focadas nas fêmeas (Lima et al., 2020; Hilbig et al., 2020; Bombardelli et al., 2021) e, poucas são aquelas voltadas aos machos. Os poucos trabalhos existentes mostram efeitos deletérios (Mewes et al., 2016) e efeitos positivos (Bombardelli et al., 2010; Bombardelli et al., 2023) sobre a qualidade dos espermatozoides. Sendo assim, a alta qualidade dos espermatozoides é uma estratégia importante para melhorar a

qualidade da prole. Além disso, o setor produtivo vem mostrando interesse na produção de bancos genéticos (Bombardelli et al., 2023), onde a criopreservação é uma ferramenta que possibilita conservar gametas melhorados geneticamente (Magnotti et al., 2018) aumentando a produtividade e rentabilidade dos gametas (Figuerola et al., 2020).

Devido ao elevado esforço metabólico no qual os reprodutores de peixes são submetidos, a suplementação exógena das rações com diversos nutrientes é comum, uma vez que os nutrientes presentes nos alimentos não são suficientes para atender as exigências dos animais. Dentre vários nutrientes, as vitaminas se destacam pois não são produzidas pelo organismo nas quantidades exigidas (Borba et al., 2013), sendo fornecidos na forma de micro ingredientes nas dietas. As vitaminas contribuem para a manutenção dos organismos vivos e estão envolvidas como cofatores e substratos em algumas reações bioquímicas e fisiológicas (Martins et al., 2014; Miranda et al., 2003; NRC, 2011).

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel, e sua fonte é exclusivamente exógena (Vannucchi e Monteiro, 2010). Tem aspecto de um pó cristalino amarelo ou laranja-amarelado (Liew, 2016), inodoro e insípido (Arcot e Shrestha, 2005). Sua forma sintética é utilizada na fortificação dos alimentos (Alaburda e Shundo, 2007). Esses compostos são caracterizados por atividades biológicas semelhantes, sendo o ácido fólico o composto mais estável e facilmente absorvido do grupo dos folatos (Eichholzer, Tonz e Zimmermann, 2006).

O ácido fólico atua principalmente na produção e divisão celular, pela reparação e síntese de DNA e RNA, produção de determinadas proteínas e manutenção do sistema nervoso e cardiovascular (Vannuchi e Monteiro, 2010; Liew, 2016). A ação dessa vitamina está relacionada a mecanismos para a transferência de unidades monocarbônicas dos grupos metila e formil, utilizado nas reações de síntese dos ácidos nucleicos, DNA e RNA (Marchioro, Sá-Nakanishi e Campanerut, 2010), com papel importante no desenvolvimento embrionário inicial. Participa do metabolismo dos aminoácidos e da síntese dos ácidos nucleicos, sendo essencial para a formação das células do sangue (Carvalho et al., 2006). O ácido fólico em sua forma sintética elimina os radicais livres oxidantes, sendo considerado um agente antioxidante (Joshi et al., 2001).

Em estudos com vertebrados do sexo masculino o ácido fólico induziu a melhora da qualidade seminal e influenciou o ritmo da espermatogênese (Yousef et al., 2005;

Ibrahim et al., 2011; Alonge et al., 2019). Em ratos, quando alimentados com ácido fólico associado ou não à altas doses de cotrimaxol que é um agente inibidor da via de síntese de ácido fólico, melhorou os parâmetros espermáticos (Salarkia et al., 2017). Para cães alimentados com dietas suplementadas com vitamina E, selênio, zinco, ácido fólico e ácidos graxos, houve melhora na qualidade seminal (Alonge et al., 2019), mostrando a utilização do ácido fólico associado com outros micro ingredientes importantes. Devido a sua ação antioxidante, o ácido fólico pode ajudar as células espermáticas durante o processo de criopreservação, que causa grande estresse oxidativo nas células. Além disso, o ácido fólico também pode ser usado para neutralizar a toxicidade de alguns compostos como o arsênio (Ma et al., 2015) e reduzir as anormalidades no desenvolvimento embrionário em peixes.

Com o benefício comprovado do ácido fólico para os vertebrados, pode existir também um efeito benéfico para os peixes em período reprodutivo. São escassos os trabalhos utilizando o ácido fólico para reprodutores de peixes, isso pode estar ligado a dificuldade em realizar experimentos nessa fase de produção. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar a suplementação de ácido fólico para machos de jundiá (*Rhamdia quelen*), avaliando os parâmetros reprodutivos, fisiológicos e de crescimento.

2. Material e Métodos

2.1 Estrutura, animais e delineamento

O experimento foi realizado após aprovação do Comitê de Ética Animal para uso de animais experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE (07/2022). Foram utilizados 720 alevinos ($3,71 \pm 0,01$ g) de jundiá, distribuídos em 24 gaiolas (4x2x1 m), com malha de 15 mm. As gaiolas foram instaladas em viveiros escavados (200 m²) revestidos em alvenaria e com o fundo de terra. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e fotoperíodo natural, com renovação da água dos viveiros apenas para compensar a água evaporada e infiltrada. O experimento teve uma duração de 300 dias com início no outono (abril) e término no verão (março). No início da primavera (outubro), os peixes foram classificados em machos ($128,14 \pm 1,83$ g) e fêmeas ($155,70 \pm 1,97$ g) em densidade de 15 machos e 15 fêmeas por gaiola. Durante o período experimental os animais foram alimentados com seis rações com diferentes níveis de suplementação de ácido fólico, que foram 0; 0,75; 1,50; 2,25; 3,00 e 3,75 mg kg⁻¹ de

ração. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. A unidade experimental foi considerada uma gaiola com 15 machos e 15 fêmeas.

2.2 Rações experimentais e alimentação

As rações experimentais foram formuladas considerando a composição química de cada alimento, com proteína e energia digestível atendendo as exigências da espécie (Tabela 1) (Oliveira Filho e Fracalossi, 2006; Meurer et al., 2012). O software utilizado na formulação das rações foi o SuperCrac®. Os ingredientes utilizados na fabricação das rações foram moídos em moinho de martelo em peneira de 0,5 mm, misturados por 20 minutos. A ração foi produzida na forma extrusada (extrusora E-62, Ferraz®) em dois diâmetros de *pellets*, sendo fornecida a de 3 mm até a primavera e, a de 5 mm até o verão. Os níveis de ácido fólico foram ajustados pela pureza (97%, SALUS – Nutrição Animal) e com acréscimo de 10% pela perda da eficiência durante a extrusão e secagem em 100-110°C (Coelho, 2002).

Tabela 1. Composição das rações e teores de nutrientes para os diferentes níveis de suplementação de ácido fólico, utilizados na alimentação de machos de jundiá (*R. quelen*).

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

*Suplemento vitamínico e mineral (mínimo kg⁻¹): Vitamina A: 2.000.000UI kg⁻¹, vitamina D3: 640.000UI kg⁻¹, vitamina E: 2.400UI kg⁻¹, vitamina K3: 688mg kg⁻¹, vitamina B1: 400mg kg⁻¹, vitamina B2: 1.000mg kg⁻¹, vitamina B6: 1.200mg kg⁻¹, vitamina B9: 0 (zero); vitamina B12: 4.000mcg kg⁻¹, niacina: 9.000mg kg⁻¹, ácido pantotênico: 3.000mg kg⁻¹, biotina: 35mg kg⁻¹, manganês: 14g kg⁻¹, zinco: 11g kg⁻¹, ferro: 10g kg⁻¹, cobre: 2.000mg kg⁻¹, iodo: 200mg kg⁻¹, cobalto: 40mg kg⁻¹, selênio: 40mg kg⁻¹, hidroxitolueno butilado (B.H.T.): 300mg kg⁻¹.

** Ajuste pela pureza (97%) e acréscimo de 10% pela perda da eficiência durante a extrusão e secagem em 100-110°C.

Foram realizadas alimentações *ad libitum* às 8h:00min, 12h:00min e 17h:00min, com a ração de 3mm. No início da primavera após a biometria total, passou-se a alimentar

os animais com a ração 5mm, *ad libitum* às 9h:00min e 15h:00min horas (Bombardelli et al., 2021).

2.3 Parâmetros de qualidade de água

Diariamente foi mensurada a temperatura da água (mínima: $19,69 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$ e máxima: $22,80 \pm 0,22^{\circ}\text{C}$; Incoterm® $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$). O oxigênio dissolvido ($5,19 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$; Oxímetro YSI® 550A) foi mensurado semanalmente às 6h:00min. Amônia total ($0,08 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$), nitrito ($0,07 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$) foram medidos quinzenalmente às 6h:00min (Fotocolorímetro Multiparamétrico AlfaKit AT 100 PB II®). O pH da água ($7,14 \pm 0,14$; digital pHmeter Tecnal® Tec 5) foi mensurado quinzenalmente às 6h:00min.

2.4 Crescimento

No verão os animais foram avaliados quanto ao crescimento. Os machos de cada unidade experimental foram anestesiados com eugenol (50 mg L^{-1} , Cunha et al., 2010), quando foram mensurados os parâmetros zootécnicos de peso final, comprimento e sobrevivência. Também, foram calculados os parâmetros de ganho de peso ($\text{GP} = \text{peso final} - \text{peso inicial}$), ganho de peso diário ($\text{GPD} = \text{GP} / \text{n}^{\circ} \text{ de dias de experimento}$) e conversão alimentar ($\text{CAA} = \text{consumo de ração} / \text{GP}$).

2.5 Coleta e avaliação do sêmen fresco

Após a biometria final, todos os 15 machos de cada unidade experimental foram transferidos para tanques de 500L, instalados em sistema de recirculação, com temperatura controlada, em densidade de cinco machos por tanque. Os machos receberam dose única de extrato pituitário de carpa (EHC) de 3 mg kg^{-1} (Bombardelli et al., 2006). Após 10 horas (água a 24°C), o sêmen foi coletado através de massagem abdominal na direção cefalocaudal (Neumann et al., 2021). O sêmen foi coletado em tubos de ensaio graduados ($\pm 0,1 \text{ mL}$) e mensurado o volume seminal, onde a primeira gota foi desprezada para evitar a contaminação do sêmen com fezes e urina. O sêmen foi então armazenado individualmente em tubos falcon à 12°C até a realização de todas as análises (Goes et al., 2017).

O sêmen de todos os machos foi avaliado quanto a contaminação e análise subjetiva da motilidade. Foi selecionado o sêmen de cinco machos sem ativação e com motilidades elevadas. No sêmen fresco foram avaliados os parâmetros de motilidade,

tempo de ativação espermática, velocidade curvilínea, velocidade média de percurso e velocidade em linha reta, utilizando o sistema CASA (*Computer assisted sperm analysis*) (Bombardelli et al., 2021). Os dados de velocidade (velocidade curvilínea, velocidade média de percurso e velocidade em linha reta) foram submetidos a análises de componentes principais (PCA), para avaliar a correlação (Tessaro et al., 2012). Verificada a correlação, um fator comum foi gerado (Velocidade espermática) e submetido a análise estatística. Uma alíquota de sêmen foi diluída em proporção 1:1000 em solução formol salino tamponada para análise de concentração. Também foi realizada análise de integridade de membrana utilizando o kit live/dad (Thermofisher) (Bombardelli et al., 2022). A concentração espermática, foi mensurada através da alíquota de sêmen previamente fixada, pela contagem das células espermáticas em câmara hematómica de Neubauer (Mylonas et al., 1997), em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200®), em objetiva 40x.

Uma amostra de 4mL do sêmen de cada peixe foi centrifugada (Micro Centrífuga NT805 Novatécnica®) a 997g por 10 minutos a 4°C para a separação do plasma seminal e as células espermáticas (Lahnsteiner et al., 2010). As células espermáticas foram congeladas em vapor de nitrogênio (-170°C) e armazenadas a -80°C, para posterior análise bioquímica. Uma alíquota de 5mL de sêmen foi centrifugada (Baby Centrifuge mod.206, FANEM®) a 997g por 10 minutos para separação do plasma seminal, que foi destinado as análises de osmolaridade (Osmometro PZL 1000®) e pH seminal (fita colorimétrica).

2.6 Sêmen criopreservado

Amostras de 5mL do mesmo sêmen fresco foram diluídas em diluente composto por 5% de D-frutose, 5% de leite em pó e 10% de metanol (Bombardelli et al., 2021). Na sequência o sêmen diluído foi envazado em palhetas de 0,25 mL, e congelado em botijão de vapor de nitrogênio (-170°C). Após 30 min, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido a -196°C. O sêmen criopreservado foi submetido ao protocolo de descongelamento por imersão da palheta em água a 25°C (Adames et al., 2015). No sêmen descongelado foi analisado a motilidade, tempo de ativação espermática, velocidade curvilínea, velocidade média de percurso e velocidade em linha reta, além de concentração espermática, como descrito anteriormente para o sêmen fresco.

Amostras de 1mL de sêmen descongelado foram processadas para posterior realização das análises bioquímicas. O sêmen descongelado foi suspenso em solução tampão salina (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) centrifugado á 997g por 30 minutos a 4°C (Lahnsteiner et al., 2010), para retirar os compostos do diluente. O sêmen descongelado foi lavado quatro vezes, pela adição de solução fosfato salina, colocado novamente em suspensão e centrifugado á 997g por 10 minutos (Lahnsteiner et al., 2010). A amostra de sêmen descongelado foi armazenada a -80°C (Ultra Freezer SS Scientific®) para as análises bioquímicas.

2.7 Fertilização do sêmen criopreservado

Seis fêmeas alimentadas com ração comercial, apresentando maturação gonadal foram selecionadas para avaliação da fertilidade dos espermatozoides descongelados. As fêmeas receberam duas doses de extrato pituitário de carpa (EHC), a inicial de 0,5 mg kg⁻¹, e uma segunda dose de 5,0 mg kg⁻¹ após 12 h da primeira (Bombardelli et al. 2006). Após 10 horas (água a 24°C) da segunda dose, os ovócitos foram coletados seguindo técnica semelhante à dos machos. Os ovócitos das seis fêmeas foram misturados para a obtenção de um pool de ovócitos. Uma alíquota de 1mL de ovócitos (± 1800 ovócitos) foram fertilizados, utilizando 70.000 espermatozoides móveis por ovócito. Foi adicionado um volume de 10mL de água sobre os ovócitos e o sêmen descongelado para a ativação e foi homogeneizado suavemente durante 1 minuto. Após a fertilização, 50 ovócitos já fertilizados foram colocados em placas de petri com volume de 20mL de água em ambiente com temperatura controlada (26 $\pm$ 1°C) (Panini et al., 2001). Após 12 horas da fertilização, foi avaliada a taxa de fertilidade (Fertilidade = [(nº de ovócitos fertilizados x 100) / nº total de ovócitos avaliados]) (Pereira et al., 2006). A taxa de eclosão (Eclosão = [(nº de ovócitos eclodidos x 100) / nº total de ovócitos avaliados]) foi avaliada após 24h da fertilização.

2.8 Coleta de material biológico

Após 30 dias da coleta de sêmen, cinco machos de cada unidade experimental foram aleatoriamente selecionados e anestesiados com eugenol (50 mg L⁻¹, Cunha et al., 2010). Em seguida os peixes foram submetidos à coleta de sangue por meio de punção da veia caudal, com seringas convencionais de 3mL e agulha de 0,55mm. Uma alíquota de 1mL do sangue coletado foi destinada para análise do sangue fresco. Outra alíquota foi

centrifugada (Micro Centrífuga NT805 Novatécnica[®]) a 997g por 10 minutos a 4°C, em seguida retirado o soro e armazenado a -80°C (Ultra Freezer SS Scientific[®]) para análises bioquímicas.

Após a coleta de sangue os animais anestesiados foram eutanasiados em dose letal de eugenol (500 mg L⁻¹) (Cunha et al., 2010) e secção da coluna vertebral e em seguida dissecados. Os órgãos foram pesados para avaliação dos índices hepatossomático (IHS) = [(peso do fígado x 100) / peso total do peixe], gonadossomático (IGS) = [(peso da gonada x 100)/ peso total do peixe] e viscerossomático (IVS) = [(peso das vísceras x 100)/ peso total do peixe].

2.9 Análises hematológicas

No sangue fresco foram avaliados concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (Drabkin e Austin, 1935), utilizando kit comercial (Hemoglobina Bioclin[®]), e leitura em comprimento de onda 530nm. A contagem de hematócrito foi realizada pelo método de microhematócrito (Goldenfarb et al., 1971). A contagem de eritrócitos realizada conforme Ranzani-Paiva et al., (2013), onde o sangue foi diluído em proporção 1:200 em solução salina a 0,65%, e realizada a contagem em Câmara Hematimétrica de Neubauer. Os índices hematimétricos foram calculados de acordo com Ranzani-Paiva et al., (2013), sendo: volume corpuscular médio (VCM)=(Ht/nº eritrócitos) x 10; hemoglobina corpuscular média (HCM)=(Hb/nº eritrócitos) x 10; e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)=(Hb/Ht)x100.

O leucograma e trombograma foram realizados utilizando as extensões sanguíneas (Ranzani-Paiva et al., 2013), que foram coradas utilizando panóptico rápido (Laborclin[®]). 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 aumento de 100x com óleo de imersão. As capturas de imagem foram analisadas no software ImageJ 1.48v[®], para a contagem total de células, e, posteriormente, a contagem diferencial de leucócitos. As células avaliadas foram, linfócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, célula granulocítica especial (CGE), trombóticos e células imaturas. Para a determinação do número de células µL⁻¹, foi utilizado o seguinte cálculo: valor total do tipo de leucócito = (nº do tipo leucócitos contados nas extensões x eritrócitos) / nº de total de leucócitos contados.

2.10 Análises bioquímicas

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 (*High-density lipoprotein*) (REF. 413), fosfatase alcalina (FAL) (REF. 440), aspartato aminotransferase (AST) (REF. 421E), alanina aminotransferase (ALT) (REF. 422E), creatinina (REF. 435), albumina (REF. 419). As análises foram realizadas utilizando o kit comercial Gold Analisa®, utilizando uma leitora de microplaca (Fisherscientific Accuskan Go®).

As amostras das células espermáticas do sêmen fresco e do sêmen descongelado, e as amostras de testículo e fígado foram homogeneizadas com solução tampão fosfato salina (pH 7,2). Após o rompimento das células em homogeneizador (T10 basic, IKA®), as amostras foram centrifugadas (Micro Centrífuga NT805 Novatécnica®) á 12800g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, fracionado em microtubos e armazenados a -80°C (Ultra Freezer SS Scientific®). Uma fração das amostras preparadas foi utilizada para realização da quantificação de proteína, pelo método de Bradford (1976), com leitura em comprimento de onda de 595 nm em leitora de microplaca (Fisherscientific Accuskan Go®). Após a quantificação de proteínas, as amostras foram normalizadas para 1mg mL⁻¹ de proteína, para realização dos ensaios.

Nas amostras de testículo e fígado foram avaliados a peroxidação lipídica (LPO) (Jiang, Hunt e Wolff, 1992) 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, absorvendo luz em comprimento de onda de 570nm. Catalase (CAT) (Aebi, 1984) que se dá pelo decréscimo de absorbância devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, em comprimento de onda de 240nm. A análise de carbonilação de proteínas (PCO) que consiste em reagir o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas em comprimento de onda de 370 nm. A análise de superóxido dismutase (SOD) (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, em comprimento de onda de 560 nm. Foi utilizada uma leitora de microplaca (Fisherscientific Accuskan Go®) para realização das análises.

Nas células espermáticas do sêmen fresco e do criopreservado foram avaliados LPO, SOD, PCO, conforme descrito para fígado e testículo. A catalase (CAT) foi adaptada de Aebi (1984), utilizando 180 leituras de 1 segundo em comprimento de onda de 240nm em leitora de microplaca (Fisherscientific Accuskan Go®).

2.11 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Os pressupostos de homogeneidade da variância e normalidade dos resíduos foram verificados pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Os resultados expressos em porcentagem foram transformados pela raiz quadrada do arco-seno para a análise estatística. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias múltiplas de Tukey, ambos ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 7.0®.

3. Resultados

A espermatogênese em machos de jundiá foi influenciada pela alimentação contendo níveis crescentes de ácido fólico. Os machos alimentados com 3,00 e 3,75 mg de ácido fólico kg^{-1} apresentaram as maiores ($p < 0,05$) motilidades ($72,12 \pm 4,39$ e $76,43 \pm 5,18\%$) para o sêmen fresco (Tabela 2). Os animais alimentados com 3,00 mg de ácido fólico kg^{-1} apresentaram as maiores ($p < 0,05$) osmolaridades. Os demais parâmetros seminais e espermáticos do sêmen fresco não foram influenciados ($p > 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros seminais e espermáticos do sêmen fresco de jundiás (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de inclusão de ácido fólico (mg kg ⁻¹)						<i>p</i> -valor
	0	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
Machos Espermiantes (%)	100,00±0,00	98,33±1,66	96,66±1,92	98,33±1,66	96,54±1,99	96,66±1,92	0,6506
Volume Seminal (mL)	14,17±0,36	15,43±0,42	14,28±0,45	14,62±0,20	13,89±0,39	14,38±0,51	0,1809
Volume Seminal Relativo (mL kg⁻¹)	43,38±0,35	44,16±1,09	41,85±1,10	43,40±1,55	43,95±0,67	41,99±1,67	0,6292
Motilidade (%)	50,83±3,62 ^b	59,57±5,82 ^{ab}	71,42±4,91 ^{ab}	62,53±1,69 ^{ab}	72,12±4,39 ^a	76,43±5,18 ^a	0,0088
VLC (µm s⁻¹)	70,48±2,73	75,52±2,70	80,85±2,61	77,76±1,66	75,65±1,89	75,86±3,02	0,1530
VAP (µm s⁻¹)	43,26±2,80	45,26±4,17	51,41±4,00	42,71±1,00	46,40±1,85	48,60±2,74	0,3239
VSL (µm s⁻¹)	42,36±2,13	43,24±4,48	49,85±3,83	41,78±0,51	44,78±2,10	47,20±2,50	0,3656
VE (µm s⁻¹)	51,10±2,42	56,27±3,81	59,68±3,37	54,59±0,47	54,59±1,88	56,00±272,71	0,3274
CSPZ (x10⁹ spz mL⁻¹)	2,06±0,20	2,08±0,11	2,05±0,17	1,83±0,26	2,00±0,21	1,91±0,10	0,8308
Tempo de Ativação (s)	34,83±3,00	34,67±5,10	31,16±1,35	26,72±1,65	28,21±1,29	30,80±1,84	0,2533
Fecundidade (x10¹⁰ spz)	2,92±0,26	3,22±0,18	2,95±0,34	2,68±0,63	2,76±0,23	2,75±0,23	0,6326
Fecundidade Efetiva (x10⁹ spz)	1,49±0,19	1,94±0,29	2,09±0,23	1,67±0,05	2,02±0,28	2,12±0,28	0,3723
Integridade de Membrana (%)	55,86±5,76	61,71±3,51	73,11±6,72	73,32±7,46	66,45±9,36	70,50±4,96	0,3816
pH seminal	9,06±0,29	8,72±0,24	9,00±0,29	8,98±0,26	8,71±0,06	8,64±0,15	0,7441
Osmolaridade (mOSm kg⁻¹)	251,61±2,12 ^b	251,50±2,11 ^{ab}	255,13±0,70 ^{ab}	256,00±0,97 ^{ab}	258,91±1,09 ^a	256,68±1,59 ^{ab}	0,0191

*VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média de percurso; VSL: velocidade em linha reta; VE: velocidade espermática; CSPZ: concentração de espermatozoides.

As rações contendo ácido fólico também influenciaram o movimento dos espermatozoides no sêmen criopreservado (Tabela 3). O sêmen criopreservado dos machos alimentados com 3,00 mg de ácido fólico.kg⁻¹ apresentou maior motilidade (55,54±3,39) (p<0,05). Os animais alimentados com rações suplementadas com 1,50 e 3,00 mg de ácido fólico.kg⁻¹ também apresentaram maiores (p<0,05) parâmetros de velocidade curvilínea, velocidade média de percurso, velocidade em linha reta e velocidade espermática (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros espermáticos e fertilidade do sêmen criopreservado de jundiás (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de Ácido Fólico (mg kg ⁻¹)						p-valor
	0	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
Motilidade (%)	39,66±1,61 ^b	50,32±2,65 ^{ab}	51,65±3,10 ^{ab}	42,26±1,85 ^{ab}	55,54±3,39 ^a	49,86±4,36 ^{ab}	0,0119
VCL (µm s⁻¹)	54,18±2,38 ^b	66,30±3,47 ^{ab}	69,98±2,05 ^a	67,05±3,96 ^{ab}	69,57±2,82 ^a	66,30±2,32 ^{ab}	0,0136
VAP (µm s⁻¹)	36,21±1,78 ^b	46,38±4,12 ^{ab}	50,91±1,91 ^a	45,81±3,53 ^{ab}	49,53±3,06 ^a	47,05±1,91 ^{ab}	0,0290
VSL (µm s⁻¹)	33,33±1,97 ^b	42,80±4,67 ^{ab}	46,96±1,78 ^a	43,33±3,45 ^{ab}	47,12±2,66 ^a	43,48±1,51 ^{ab}	0,0376
VE (µm s⁻¹)	39,95±2,03 ^b	52,00±3,43 ^{ab}	55,80±2,48 ^a	49,25±4,19 ^{ab}	55,72±3,01 ^a	51,54±2,11 ^{ab}	0,0149
CSPZ (x10⁹ spz mL⁻¹)	0,80±0,05	0,92±0,10	0,94±0,13	0,94±0,14	1,03±0,12	1,14±0,12	0,5224
Tempo de ativação (s)	27,55±2,25	20,5±1,26	22,22±0,18	20,45±2,45	24,81±6,81	21,01±3,01	0,6335
Fertilidade (%)	38,16±0,83	51,50±1,5	43,33±0,66	40,33±11,66	32,66±9,05	32,00±10,00	0,5688
Eclosão (%)	10,22±3,89	16,50±3,50	11,00±3,00	10,83±4,16	6,88±5,55	14,00±4,00	0,6840

VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média de percurso; VSL: velocidade em linha reta; VE: velocidade espermática; CSPZ: concentração de espermatozoides;

O crescimento (Tabela 4) dos machos alimentados com rações suplementadas com níveis crescentes de ácido fólico não foram influenciados (p>0,05), com exceção da conversão alimentar (p<0,05). Os parâmetros hematológicos (Tabela 5) também não foram influenciados (p>0,05) nos animais alimentados com rações suplementadas com ácido fólico.

Tabela 4. Parâmetros de crescimento e índices somáticos de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de Ácido Fólico (mg kg ⁻¹)						<i>p</i> -valor
	0	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
PF (g)	320,45±9,70	334,5±12,1	324,24±7,65	320,87±7,66	313,52±6,81	323,66±9,15	0,7177
GP (g)	316,69±9,70	330,78±12,14	320,54±7,96	317,2±7,69	309,76±6,84	319,96±9,11	0,7165
GPD (g)	1,22±0,03	1,27±0,04	1,23±0,02	1,22±0,02	1,19±0,02	1,23±0,03	0,7165
CA	1,42±0,03 ^a	1,26±0,04 ^b	1,29±0,03 ^{ab}	1,34±0,03 ^{ab}	1,34±0,02 ^{ab}	1,32±0,01 ^{ab}	0,0361
SOB (%)	96,83±1,42	97,33±1,41	92,26±1,72	96,50±0,50	95,00±1,91	96,50±2,87	0,3467
IHS	0,94±0,09	0,78±0,03	0,77±0,07	0,85±0,04	0,78±0,05	0,77±0,04	0,4846
IVS	4,35±0,08	4,65±0,31	4,61±0,29	4,44±0,07	4,7±0,30	4,5±0,02	0,9234
IGS	2,85±0,16	3,03±0,38	2,68±0,25	2,23±0,05	2,87±0,25	2,45±0,04	0,3193
CP (cm)	25,5±0,38	25,1±0,29	26,24±0,23	25,18±0,48	25,74±0,28	25,65±0,23	0,3600

P.F.: peso final; GP: ganho de peso; GPD: ganho de peso diário; C.A.: conversão alimentar; SOB.: sobrevivência; IHS: índice hepatossomático; IVS: índice vicerossomático; IGS: índice gonadossomático; CP: comprimento padrão.

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de Ácido Fólico (mg kg ⁻¹)						<i>p</i> -valor
	0	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
Eritrócito (10⁶ µL⁻¹)	1,65±0,04	1,64±0,09	1,78±0,05	1,63±0,08	1,61±0,04	1,45±0,01	0,270441
Hematócrito (%)	31,91±2,00	35,07±1,00	34,47±2,00	32,83±2,69	33,71±1,87	32,86±1,80	0,815812
Hemoglobina (g dL⁻¹)	4,42±1,37	5,12±2,31	4,93±2,24	4,57±2,09	4,54±2,18	3,86±1,25	0,998161
VCM (fL)	190,80±4,10	197,31±6,64	182,30±3,40	190,24±1,28	192,07±3,68	214,42±11,60	0,095126
HCM (pg)	24,76±10,66	30,31±12,34	26,97±11,70	27,20±12,12	27,19±12,37	30,54±13,39	0,999322
CHCM (g dL⁻¹)	19,57±7,27	21,86±10,39	23,37±10,54	22,94±9,94	21,77±10,46	20,54±10,03	0,999697
Trombócitos (x10³ cel µL⁻¹)	10,9±2,18	7,37±2,43	9,96±1,80	9,72±1,93	8,17±2,08	7,02±1,81	0,708463
Linfócitos (x10³ cel µL⁻¹)	7,12±2,45	6,15±1,39	6,07±1,13	7,85±1,35	6,44±2,61	3,95±0,86	0,729418
Mononócito (x10³ cel µL⁻¹)	1,21±0,53	1,96±0,52	0,60±0,07	0,49±0,16	0,99±0,19	0,87±0,19	0,072666
Neutrófilos (x10³ cel µL⁻¹)	3,61±1,34	7,24±3,22	7,51±3,17	3,67±1,82	3,27±2,16	2,81±1,15	0,534715
Basófilos (x10³ cel µL⁻¹)	0,15±0,04	0,28±0,08	0,27±0,01	0,43±0,04	0,15±0,05	0,13±0,07	0,882141
Eusínófilos (x10³ cel µL⁻¹)	0,13±0,05	0,19±0,06	0,24±0,06	0,17±0,06	0,29±0,01	0,12±0,05	0,645364
CGE (x10³ cel µL⁻¹)	0,23±0,08	0,42±0,02	0,17±0,03	0,15±0,01	0,22±0,01	0,13±0,08	0,656542
Células imaturas (x10³ cel µL⁻¹)	0,88±0,11	0,45±0,12	0,93±0,23	0,72±0,08	0,65±0,22	0,80±0,28	0,560821
Leucócitos totais (x10³ cel µL⁻¹)	13,10±3,66	15,93±5,21	16,06±3,94	12,60±3,15	12,04±4,60	9,84±2,43	0,863735

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; CGE: célula granulocítica especial.

As rações contendo ácido fólico influenciaram nos parâmetros de albumina, aspartato aminotransferase e colesterol (Tabela 6). O sangue dos machos alimentados com 1,50 mg de ácido fólico kg⁻¹ apresentou maior concentração de albumina (1,33±0,02) (p<0,05). A aspartato aminotransferase teve maior concentração (p<0,05) (50,57±2,45) no sangue dos machos alimentados com 2,25 mg de ácido fólico kg⁻¹. Os animais alimentados com rações suplementadas com 0 mg de ácido fólico kg⁻¹ apresentaram maiores (p<0,05) concentrações de colesterol no sangue (267,30±16,20).

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos do sangue de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de Ácido Fólico (mg kg ⁻¹)						<i>p</i> -valor
	0	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
FAL (U L⁻¹)	24,32±1,48	35,36±2,79	25,67±1,05	29,63±4,74	24,26±1,88	36,95±4,38	0,0248
ALT (U L⁻¹)	19,72±1,29	21,96±0,49	22,44±0,45	19,35±1,99	19,91±1,46	21,02±2,96	0,7215
AST (U L⁻¹)	28,90±1,73 ^b	32,54±2,36 ^b	31,55±3,82 ^b	50,57±2,45 ^a	42,15±3,39 ^{ab}	43,25±5,92 ^{ab}	0,0026
Colesterol (mg dL⁻¹)	267,30±16,20 ^a	248,79±4,19 ^{ab}	247,50±8,23 ^{ab}	247,56±7,78 ^{ab}	230,42±7,52 ^{ab}	223,70±6,87 ^b	0,0496
Creatinina (mg dL⁻¹)	0,51±0,04	0,56±0,01	0,43±0,01	0,47±0,02	0,50±0,04	0,39±0,03	0,1017
Albumina (g dL⁻¹)	1,15±0,02 ^b	1,19±0,03 ^b	1,33±0,02 ^a	1,22±0,01 ^{ab}	1,22±0,02 ^{ab}	1,25±0,03 ^{ab}	0,0063
Glicose (mg dL⁻¹)	88,15±3,56	96,38±4,55	96,86±9,03	96,10±3,20	107,73±10,93	91,06±4,09	0,4294
HDL (mg dL⁻¹)	98,50±15,85	109,37±22,98	112,16±14,96	107,08±17,09	77,34±11,71	134,00±15,88	0,3405
Proteínas (mg dL⁻¹)	45,55±1,01	47,31±0,84	45,66±0,40	45,46±0,83	45,03±0,50	48,15±2,37	0,4007
Triglicerídeos (mg dL⁻¹)	272,67±20,10	247,23±22,81	256,22±39,84	241,45±22,48	226,98±22,68	229,66±9,68	0,7828

AST: aspartato aminotransferase; FAL: fosfatase alacalina; HDL: colesterol HDL (*High-density lipoprotein*); ALT: alanina aminotransferase.

Os indicadores de equilíbrio redox do sêmen fresco (Tabela 7) e o descongelado (Tabela 8) foram influenciados nos animais alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico. A lipoperoxidação, a atividade de catalase e a carbonilação de proteínas reduziram (p<0,05) no sêmen fresco e criopreservado dos animais alimentados com diferentes níveis de ácido fólico. No sêmen criopreservado não foi detectada atividade de superóxido dismutase (Tabela 8).

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos do sêmen fresco de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de Ácido Fólico (mg.kg ⁻¹)						<i>p</i> -valor
	0	0,83	1,66	2,5	3,33	4,16	
LPO	2,55±0,39 ^{abc}	3,03±0,53 ^{ab}	3,53±0,47 ^a	1,42±0,01 ^b	2,29±0,17 ^{abc}	1,48±0,13 ^{bc}	0,0021
CAT	0,02±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,02±0,00 ^{ab}	0,01±0,00 ^b	0,0046
SOD	6,66±1,56	6,12±2,34	6,56±2,75	7,04±3,14	5,35±1,17	3,73±1,05	0,8966
PCO (x10⁻⁵)	7,84±0,45 ^a	5,23±0,85 ^{ab}	5,41±0,42 ^{ab}	3,81±0,77 ^b	4,66±0,77 ^b	4,39±0,27 ^b	0,0074

LPO: peroxidação lipídica (mM de hidroperóxido por mg de proteína); CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase (unidades de SOD por mg de proteína); PCO: carbonilação de proteínas (mM de DNPH por mg de proteína).

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos do sêmen criopreservado de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de Ácido Fólico (mg kg ⁻¹)						<i>p</i> -valor
	0	0,83	1,66	2,5	3,33	4,16	
LPO	7,15±0,39 ^a	4,36±0,27 ^b	5,55±0,22 ^{ab}	6,20±0,59 ^{ab}	4,72±1,17 ^b	4,41±0,67 ^b	0,0370
CAT	0,40±0,01 ^a	0,28±0,01 ^b	0,31±0,02 ^b	0,33±0,00 ^b	0,32±0,00 ^b	0,28±0,02 ^b	0,0004
SOD	---	---	---	---	---	---	---
PCO (x10⁻⁵)	4,50±0,56 ^a	2,75±0,38 ^{ab}	2,61±0,35 ^{ab}	1,72±0,50 ^b	2,60±0,49 ^{ab}	2,64±0,48 ^{ab}	0,0179

LPO: peroxidação lipídica (mM de hidroperóxido por mg de proteína); CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase (unidades de SOD por mg de proteína); PCO: carbonilação de proteínas (mM de DNPH por mg de proteína).

Os indicadores de equilíbrio redox do testículo (Tabela 9) e fígado (Tabela 10) não foram influenciados nos animais alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de suplementação de ácido fólico.

Tabela 9. Parâmetros bioquímicos do testículo de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de Ácido Fólico (mg kg ⁻¹)						<i>p</i> -valor
	0	0,83	1,66	2,5	3,33	4,16	
LPO	0,87±0,05	1,02±0,07	0,90±0,03	0,91±0,11	0,94±0,05	0,91±0,12	0,8331
CAT	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,05±0,00	0,0522
SOD	1,47±0,16	1,54±0,23	1,38±0,20	1,36±0,22	1,22±0,17	1,80±0,28	0,5473
PCO	0,1583±0,01	0,1592±0,00	0,16±0,02	0,14±0,01	0,13±0,00	0,13±0,01	0,6872

LPO: peroxidação lipídica (mM de hidroperóxido por mg de proteína); CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase (unidades de SOD por mg de proteína); PCO: carbonilação de proteínas (mM de DNPH por mg de proteína).

Tabela 10. Parâmetros bioquímicos do fígado de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Níveis de Ácido Fólico (mg kg ⁻¹)						<i>p</i> -valor
	0	0,83	1,66	2,5	3,33	4,16	
LPO	1,99±0,52	1,58±0,26	1,97±0,59	1,72±0,42	1,60±0,50	1,62±0,49	0,9772
CAT	0,34±0,02	0,38±0,03	0,39±0,00	0,35±0,02	0,40±0,03	0,39±0,01	0,4227
SOD	1,03±0,19	1,88±0,52	1,19±0,39	1,26±0,43	1,34±0,40	1,36±0,40	0,7651
PCO	0,20±0,01	0,19±0,04	0,19±0,04	0,15±0,02	0,15±0,02	0,12±0,00	0,3706

LPO: peroxidação lipídica (mM de hidroperóxido por mg de proteína); CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase (unidades de SOD por mg de proteína); PCO: carbonilação de proteínas (mM de DNPH por mg de proteína).

4. Discussão

Embora não exista evidências claras sobre o efeito do ácido fólico em dietas de reprodutores machos de peixes, já existem relatos de sua utilização na melhora espermática de vertebrados (Yousef et al., 2005; Ibrahim et al., 2011; Salarkia et al., 2017; Alonge et al., 2019). Os resultados deste estudo comprovam que a suplementação de diferentes níveis de ácido fólico influencia positivamente sobre a reprodução de machos de jundiá (*R. quelen*), embora não tenha apresentado influência sobre o crescimento. A melhora na reprodução está ligada ao aumento na qualidade dos espermatozoides, devido ao aumento na motilidade do sêmen fresco, e aumento da motilidade e velocidades no sêmen criopreservado.

A melhora na motilidade do sêmen fresco nos níveis mais elevados de ácido fólico pode estar ligada ao aumento da osmolaridade, e a diminuição da carbonilação de proteínas. Os espermatozoides são imóveis no testículo e plasma seminal, e a constituição do plasma seminal exerce função importante sobre a ativação espermática e qualidade do sêmen (Alavi e Cosson, 2006; Valdebenito et al., 2009). A ativação dos espermatozoides ocorre devido à pressão osmótica exercida através de soluções ativadoras, ou pelo ambiente onde o sêmen é liberado (França et al., 2020).

A osmolaridade é a concentração de solutos em uma solução, como o plasma seminal (Martinez, Garcia e Carrasco, 2011), que é formado principalmente de íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Cl (França et al., 2020). O ácido fólico teve influência sobre a osmolaridade, podendo ter alterado a concentração de um ou mais solutos do plasma seminal. Os solutos presentes no plasma seminal não são responsáveis somente por inativar o sêmen, mas também fazem a sua proteção (Inoda e Morisawa, 1987). Portanto, níveis mais elevados de osmolaridade podem estar ligados a uma maior proteção dos espermatozoides, melhorando assim a motilidade.

A carbonilação de proteínas é utilizada como um biomarcador do estresse oxidativo (Shiva et al., 2011; Lone et al., 2019). As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas na oxidação de biomoléculas, como as proteínas (Lone et al., 2019), que possuem função importante na motilidade e ativação dos espermatozoides (Li, Hulak e Linhart, 2008). A suplementação de ácido fólico em níveis mais elevados reduziu a carbonilação de proteínas no sêmen fresco. Com isso, os resultados mais elevados da motilidade podem estar diretamente ligados a redução da carbonilação de proteínas, visto que a oxidação das proteínas leva a inativação de suas funções (Wong, et al., 2010).

O ácido fólico não apresentou melhoras significativas no sêmen fresco, mas tornou o sêmen mais tolerante a criopreservação. Os níveis mais elevados de ácido fólico apresentaram melhora na motilidade e nas velocidades dos espermatozoides criopreservados. A criopreservação dos espermatozoides gera um grande estresse osmótico e oxidativo nas células espermáticas, devido a formação de gotículas de gelo intra e extracelulares, alterando as concentrações das enzimas com ação antioxidante presentes nos espermatozoides (Lasso et al., 1994; Du Teaux et al., 2004).

A melhora no sêmen criopreservado pode estar ligada a redução na peroxidação lipídica. As células espermáticas são suscetíveis a peroxidação lipídica devido a presença de ácidos graxos insaturados nas suas membranas (Jones, Hamilton e Fawcett, 1979; Sanocka e Kurpysz, 2004). O desequilíbrio entre as ROS e o sistema antioxidante dos espermatozóides, levam a um aumento dos níveis de lipoperoxidação das membranas, devido a alterações metabólicas e funcionais (Figuerola et al., 2018). Portanto, o aumento da lipoperoxidação pode levar a uma redução no potencial da membrana plasmática, devido ela perder sua fluidez (Storey, 1997), reduzindo a motilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides (Ball et al., 2008; Figuerola et al., 2017).

Os resultados do presente estudo corroboram com os encontrados em estudos com outros vertebrados, onde o ácido fólico isolado ou em associação com outros nutrientes aumenta a espermatogênese e melhora o status antioxidante no sêmen, quando submetido a algum dano oxidativo (Yousef et al., 2005; Ibrahim et al., 2011; Alonge et al., 2019). Os parâmetros de fertilidade e eclosão foram semelhantes entre todos os níveis de inclusão de ácido fólico, porém deve ser dada maior atenção a movimentação e velocidade espermática, que determinam o sucesso da fertilização e eclosão (Gallego et al., 2013). Os resultados de fertilidade e eclosão já eram esperados, devido a razão espermatozoides móveis: ovócito ser controlada e padronizada para todos os tratamentos (Rurangwa et al., 2004; Gallego et al., 2013; Pedreira et al., 2022).

O fornecimento de um maior número de espermatozoides móveis, implicará em uma diminuição da quantidade de sêmen utilizada (Pedreira et al., 2022), otimizando em até 40% os espermatozoides criopreservados. A otimização do sêmen criopreservado de animais alimentados com níveis mais elevados de ácido fólico compensará as perdas decorrentes da criopreservação, contribuindo também na implantação de bancos de sêmen criopreservado (Adames et al., 2015; Pedreira et al., 2022).

Os parâmetros bioquímicos do sangue podem ajudar a avaliar as condições fisiológicas, saúde e estado nutricional dos peixes. O aumento dos níveis de ácido fólico diminuiu o colesterol dos animais, onde o maior nível de suplementação de ácido fólico (3 mg de ácido fólico kg⁻¹) apresentou o menor nível de colesterol. Os níveis de colesterol no sangue podem apresentar respostas quanto a saúde dos animais (Maita et al., 1998), ainda, a diminuição do colesterol pode estar relacionada a uma diminuição do LDL (*Low-density lipoprotein*) plasmático, que pode levar a deposição de gordura nos tecidos (Neu

et al., 2013). Autores apresentam que os níveis ideais de colesterol para machos de jundiá são de 110 a 240 mg dL⁻¹, podendo o ácido fólico ter ajudado no metabolismo energético, diminuindo o colesterol e em contrapartida aumentou os danos causados no fígado devido ao aumento da atividade de aspartato aminotransferase (AST).

As transaminases como ALT e AST apresentam principalmente respostas da saúde hepática (Rastiannasab et al., 2016; Badran e Alin, 2021). Essas enzimas estão presentes na mitocôndria e podem ser liberadas após um dano tecidual (Cheng et al., 2017). Embora a enzima ALT não ter apresentado diferença, o aumento na aspartato aminotransferase (AST), pode estar ligado a um esforço metabólico no fígado, tendo um aumento significativo a partir da concentração de 2,25 mg de ácido fólico kg⁻¹. Formas jovens de esturjões siberianos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de ácido fólico, apresentaram uma diminuição na enzima AST (Falah et al., 2021), discordando dos dados apresentados no presente trabalho, que pode estar ligado a fase de cultivo e aos reprodutores direcionarem o esforço metabólico para os processos fisiológicos reprodutivos.

A albumina desempenha papel importante para a osmorregulação e principalmente no transporte lipídico e metabolismo energético (Andreeva, 2019). A albumina é responsável por transportar diferentes componentes, como ácidos graxos, peptídeos, além de fazer o transporte de hormônios (Curry et al, 1998; Ascenzi et al., 2013; Andreeva, 2022). O aumento na albumina junto ao aumento da suplementação de ácido fólico, pode ser explicado com o aumento da atividade hepática, devido a albumina ser sintetizada no fígado, além da utilização da albumina como transportadora de alguns hormônios responsáveis pela reprodução.

Diferente de peixes em crescimento, que apresentam melhoras no desempenho zootécnico (Barros et al., 2009) quando alimentados com ácido fólico os parâmetros de crescimento dos machos de jundiá não sofreram alterações. A conversão alimentar foi afetada pelos tratamentos, pois foi calculada para a biomassa total de cada gaiola, e esteve diretamente relacionada ao efeito nos parâmetros de crescimento das fêmeas.

Os parâmetros hematológicos também não foram influenciados, não corroborando com trabalhos de animais em crescimento (Fioruz et al., 2021). A discordância entre a literatura e os resultados encontrados no experimento, pode ser explicada devido os animais em período reprodutivo direcionarem seu metabolismo para o sucesso

reprodutivo, e deixarem de colocar esforço metabólico no crescimento, podendo ter influência em outras vias metabólicas não avaliadas. Os indicadores de estresse oxidativo no testículo e fígado, não sofreram alterações, podendo estar ligado ao ácido fólico ter maior influência sobre as células espermáticas, sangue e atuar principalmente sobre o DNA.

5. Conclusão

Os efeitos da suplementação de ácido fólico sobre os parâmetros reprodutivos do *Rhamdia quelen* foram benéficos, visto que aumentou a motilidade espermática no sêmen fresco e criopreservado, além de ter influenciado de forma positiva no estresse oxidativo das células espermáticas. Portanto, a suplementação de ácido fólico pode fornecer maior número de espermatozoides móveis, otimizando o uso do sêmen fresco, e aumentando o rendimento das doses criopreservadas. Sendo assim, recomenda-se uma suplementação de 3,00 mg de ácido fólico kg⁻¹.

6. Referências bibliográficas

- 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*, Toledo, v. 1, n. 161, p. 119-128. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.08.014
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Method Enzym*, v.105, p.121-126.
- Alaburda, J., Shundo, L. (2007). Ácido fólico e fortificação de alimentos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 2, n. 66, p. 95-102.
- Alavi S. M. H., Cosson J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International*, v.1, n.30, p.14. Doi:10.1016/j.cellbi.2005.06.004.
- Alonge, S., Melandri, M., Leoci, R., Lacalandra, G., Caira, M., & Aiudi, G. (2019). The Effect of Dietary Supplementation of Vitamin E, Selenium, Zinc, Folic Acid, and N-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Sperm Motility and Membrane Properties in Dogs. *Animals*, v.2, n.9, p.34. Doi:10.3390/ani9020034

Arcot J. e Shrestha A. (2005). Folate: methods of analysis. Trends in Food Science & Technology, v.16, p.253-66. Doi: 10.1016/j.tifs.2005.03.013

Baldisseroto, B., (2009). Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. Ciência Rural. v.1, n.39, p.291-299. Doi:10.1590/S0103-84782008005000046

Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress, and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. Animal Reproduction Science v. 3-4, n.107, p.257–267. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04

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, v. 8, n.40, p.895–903. Doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02175.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, v. 45, n. 11, p. 1323–1332. Doi: 10.1016/j.ijom.2016.06.011

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 & Gaimardm, 1824). Revista Brasileira de Zootecnia, v. 35, p.1251-1257. Doi: 10.1590/S1516-35982006000500001

Bombardelli, R. A., Hayashi, C., Natali, M. R. M., Sanches, E. A., Piana, P. A., (2010). Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nilo. Revista Brasileira de Zootecnia. V. 5, n. 39, p. 941-949. Doi:10.1590/S1516-35982010000500001

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. V. 479, p.817-823. Doi:10.1016/j.aquaculture.2017.07.031

Bombardelli, R. A., Mewes, J. K., Buzzi, A. H., Pedreira, A. C. de O., Syperreck, M. A., Dalmaso, A. C. S., Chagas, T. V., Chiella, R. J., Meurer, F. (2021)a 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. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736098

Bombadelli, 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. (2021)b Silver catfish

(*Rhamdia quelen*) breeders fed on crude glycerin-containing diets exhibited metabolic alterations and increased sperm concentration. *Aquaculture*, v. 530, p. 735724. Doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735724

Bombardelli, R. A., Henriques, J. K. S., Cestari, M. M., Marques, A. E. M. L., Chagas, T. V., Meurer, F. (2022). Improved sperm DNA integrity and altered fat metabolism and intestinal morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) males fed rations with purified nucleotide. *Aquaculture*, v.562, p. 738682. Doi: <https://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, p. 121-165.

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*, v. 536, p. 736459. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736459.

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. Doi: 10.1006/abio.1976.9999

Carvalho, P. G. B., Machado, M. N. M., Moretti, C. L., Fonseca, M. E. N. (2006) Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticultura Brasileira*. Brasília, v.24, n. 4.

Cheng, C. H., Guo, Z. X., YE, C. X., Wang, A. L. (2017) 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*, v. 44, n. 1, p. 209-218. Doi: 10.1007/s10695-017-0425-5.

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

Crouch, R. K.; Gandy, S. E.; Kimsey, G. (1981). The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*, v.35, p.235-41. Doi: 10.2337/diab.30.3.235

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., e Baldissierotto, B. (2010). Anesthesia of silver catfish with eugenol: Time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural*, v.40, p. 2107–2114. Doi: 10.1590/s0103 -84782010005000154.

Drabkin, D. L., Austin, J. H. (1935). Spectrophotometric studies: ii. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v.112, p.51-65. Doi: 10.1016/S0021-9258(18)74965-X

Du Teaux, S. B., Berger, T., Hess, R. A., Sartini, B. L. e Miller, M. G. (2004). Toxicidade reprodutiva masculina do tricloroetileno: oxidação da proteína do esperma e diminuição

da capacidade de fertilização. *Biologia da Reprodução*, v. 5, n. 70, p. 1518–1526. Doi:10.1095/biolreprod.103.022210

Eichholzer M., Tonz O., Zimmermann R. (2006). Folic acid: a public health challenge. *Lancet*. v. 61, p. 352 -367. Doi: 10.1016/S0140-6736(06)68582-6

El-Sayed, A. F.M., 2006. *Tilapia Culture*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK.

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*, v. 17, p. 100391, Doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100391.

FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. Doi: 10.4060/ca9229en.

FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome. 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*, v.84, p.415-430. Doi: 10.1016/j.aquatox.2007.07.009

França, T. S., Motta, N. C., Egger, R. C., Oliveira, A. V., e Murgas, L. D. (2020). Impact of activation solutions on fresh and frozen-thawed sperm motility and fertilization success for two species of migratory freshwater fishes. *Theriogenology*, v. 149, p. 6-15. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.03.016

Figuerola, E., Valdebenito, I., Zepeda, A. B., Figuerola, C. A., Dumorné, K., Castillo, R. L., Farias, J. G. (2017). Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Reviews in Aquaculture*, v. 1, n. 9, p. 76–87. Doi:10.1111/raq.12105

Figuerola, 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*, v. 493, p. 1–8. Doi:10.1016/j.aquaculture.2018.04

Figuerola, E., Lee-Estevez, M., Valdebenito, I., Farias, J.G., Romero, J., (2020). Potential biomarkers of DNA quality in cryopreserved fish sperm: impact on gene expression and embryonic development. *Reviews in Aquaculture*. v. 1, n. 12, p. 382–391. Doi:10.1111/raq.12323.

Firouz, A., Soheil, L., Hossein, K., Shabanali, N., Mohammad, B. (2013) The Effects of Folic Acid Treatment on Biometric and Blood Parameters of Fingerling Rainbow Trout Fishes (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Research e Development v. 4, p. 175 Doi:10.4172/2155-9546.1000175.

Gallego, V., P´erez, L., Asturiano, J. F., Yoshida, M., (2013). Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). Aquaculture v. 416–417, p. 238–243. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.035.

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 v. 3, n. 88, p. 254–263. Doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.029.

Goldenfarb, P. B., Bowyer, F. P., Hall, E. (1971). Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. American Journal of Clinical Pathology, v.56, p.35-39. Doi: 10.1093/ajcp/56.1.35

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, v.249, p.7130- 7139. Doi: 10.1016/S0021-9258(19)42083-8

Hilbig, C. C., Nascimento, N. F. do, Campos, A. C. S., Martins, L. F., Ventura, A. S., Nakaghi, L. S. O., Bombardelli, R. A. (2020) Liver histology and hematological parameters of female *Rhamdia quelen* fed different lipid sources. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 49, n. 1, p. 1-7. Doi: 10.37496/rbz4920180204.

Ibrahim, W., Tousson, E., Ali, E. M. M., Mansour, M. A. (2011). Folic acid alleviates oxidative stress and hyperhomocysteinemia involved in testicular dysfunction of hypothyroid rats. General and Comparative Endocrinology, v. 2. n. 174, p. 143–149. Doi:10.1016/j.ygcen.2011.08.012

Inoda, T. e Morisawa, M. (1987). Efeito da osmolalidade no início da motilidade espermática em *Xenopus laevis*. Bioquímica e Fisiologia Comparadas Parte A: Fisiologia, v. 3, n.88, p. 539–542. Doi:10.1016/0300-9629(87)90077-6

Jiang, Z.-Y., Hunt, J. V, e Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Analytical Biochemistry, v. 2, n. 202, p. 384–389. Doi:10.1016/0003-2697(92)90122-n

Jones, R., Hamilton, D. W., e Fawcett, D. W. (1979). Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. v. 3, n. 156, p. 373–400. Doi:10.1002/aja.1001560307

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, v. 30, n. 12, p. 1390-1399. Doi: 10.1016/S0891-5849(01)00543-3

Lahnsteiner, F., Mansour, N., e Plaetzer, K. (2010). Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. Animal Reproduction Science, v. 3-4, n. 119, p. 314-321. Doi:10.1016/j.anireprosci.2010.01.010

Lasso, J. L., Noiles, E. E., Alvarez, J. G., Storey, B. T. (1994) Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. Jornal of Andrology, v. 15, p. 255–265. Doi: 10.1002/j.1939-4640.1994.tb00444.x

Li, P., Hulak, M., e Linhart, O. (2008). Sperm proteins in teleostean and chondrosteian (*sturgeon*) fishes. Fish Physiology and Biochemistry, v. 4, n. 35, p. 567–581. Doi:10.1007/s10695-008-9261-y

Li, P., Li, Z.H., Dzyuba, B., Hulak, M., Rodina, M., Linhart, O. (2010). Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. Biology of Reproduction, V. 83, p. 852–858. Doi: 10.1095/biolreprod.110.085852

Liew, S. C. (2016) Folic acid and diseases – supplement it or not? BioMed Research International, v. 1, n. 62, p.90-100. Doi: 10.1155/2014/560183.

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

Lone, S. A., Mohanty, T. K, Baithalu, R. K, Yadav, H. P. (2019). Sperm protein carbonylation. Andrology. v. 51. Doi: 10.1111/and.13233.

Ma, Y., Zhang, C., Gao, X., Luo, H., 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, v. 5, n. 1, p. 1-1. Doi: 10.1038/srep16093.

Magnotti, C., Cerqueira, V., Lee-Estevez, M., Farias, J.G., Valdebenito, I., Figueroa, E., (2018). Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. *Reviews in Aquaculture*. v. 1, n. 10, p. 15–25. Doi:10.1111/raq.12145

Maita, M., Satoh, K., Fukuda, Y., Lee, H., Winton, J. R., Okamoto, N. (1998) Correlation Between Plasma Component Levels of Cultured Fish and Resistance to Bacterial Infection. *Fish Pathology*, v. 33, p. 129 – 133. Doi: 10.3147/jsfp.33.129

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

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*, v. 6, n. 2, p. 111-118. Doi: 10.3738/1982.2278.1084.

Martínez, J. G., Garcia, V. A., Carrasco, S. C. P. (2011). Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Revista Mvz Córdoba*, v. 2, n. 16, p. 2554-2563.

McCarthy, M. J., Baumber, J., Kass, P. H., Meyers, S. A. (2010) Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 82, p. 644–651. Doi: 10.1095/biolreprod.109.080507

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*. v. 465, p. 164-171. Doi:10.1016/j.aquaculture.2016.08.035

Millacura, N., Pardo, R., Cifuentes, L., Suazo, J. (2017). Effects of folic acid fortification on orofacial clefts prevalence: A metaanalysis. *Public Health Nutrition*, v. 20, n. 12, p. 2260-2268. Doi: 10.1017/S1368980017000878

Miranda, E. C., Pezzato, L. E., Pinto, L. G. Q., Furuya, W. M., Barros, M. M., Pezzato, A. C. (2003) Ganho de peso e taxa de sobrevivência de pós-larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de vitamina C. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 25, n. 1, p. 31-36, Doi: 10.4025/actascianimsci.v25i1.2070.

Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y., Zohar, Y., (1997). Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRH delivery system. *Aquaculture*. v. 153, p. 301–313. Doi:10.1016/S0044-8486(97)00021-5.

Neu, D. H., Furuya, W. M., Boscolo, W. R., Potrich, F. R., Lui, T. A., Feiden, (2013) A. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

juveniles. *Aquaculture Nutrition*, v. 19, n. 2, p. 211-217. Doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.00968.x.

Neumann, G., Joaquim Bernardes Junior, J., Neumann, V., e Bombardelli, R. A. (2021). Comparando a precisão das medidas de motilidade espermática de peixes obtidas de dois extremos computacionais em abordagens de rastreamento: vizinho mais próximo e rastreamento de múltiplas hipóteses. *Reprodução em Animais Domésticos*, v. 6, n. 56, p. 829–836. Doi:10.1111/rda.13922.

NRC - COMMITTEE ON NUTRIENT REQUIREMENTS OF FISH AND SHRIMP (United States) (2011). Division On Earth And Life Studies. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Wahington: The National Academies Press, 376 p.

O'Brien, E. D., Krapf, D., Cabada, M. O., Visconti, P. E., & Arranz, S. E. (2011). Transmembrane adenylyl cyclase regulates amphibian sperm motility through protein kinase A activation. *Developmental Biology*, v. 1, n. 350, p. 80–88. Doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.019

Oliveira Filho, P. R. C., Fracalossi, D. M., (2006). Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, p. 1581–1587. Doi: 10.1590/S1516-35982006000600002

Parra, J. E. G., Radünz Neto, J., Veiverberg, C. A., Lazzari, R., Bergamin, G. T., Pedron, F. A., Rossato, S., Sutili, F. J., (2008). Alimentação de fêmeas de jundiá com fontes lipídicas e sua relação com o desenvolvimento embrionário e larval. *Ciência Rural*. V. 7, n. 38, p. 2011-2017. Doi: 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*, v. 245, p. 107054. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107054>

PeixeBR - Associação brasileira de piscicultura. Anuário PeixeBR da Piscicultura 2020. São Paulo, SP: Associação Brasileira de Piscicultura, 2020.

Pereira, C. R., Barcelos, L. J. G., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Ritter, F., Silva, L. B. (2006). Embryonic and larval development of Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American Catfish. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 66, n. 4, p. 1057-1063. Doi: 10.1590/s1519-69842006000600013.

Ranzani-Paiva, M. J. T.; Pádua, S. B.; Tavares-Dias, M. (2013) Métodos para análise hematológica em peixes. 1ª Ed., Maringá: Edum.

Rastiannasab, A., Afsharmanesh, S., Rahimi, R., Sharifian, I., 2016. Alternations in the liver enzymatic activity of common carp, *Cyprinus carpio* in response to parasites,

Dactylogyrus spp. and *Gyrodactylus spp.* Journal of Parasitic Diseases. v. 40, p. 1146–1149. Doi:10.1007/s12639-014-0638-9.

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, v. 234, p. 1–28. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.006.

Salarkia, E., Sepehri, G., Torabzadeh, P., Abshenas, J., Saberi, A. (2017). Effects of administration of co-trimoxazole and folic acid on sperm quality and histological changes of testes in male rats. International Journal of Reproductive Biomedicine. v. 10, n. 15, p. 625-634.

Sanocka, D.; Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells, Reproductive Biology and Endocrinology. v. 2, p. 12. Doi: 10.1186/1477-7827-2-12.

Santos, H. K.; Meurer, F. (2020). Nutrition and Feeding Aspects for Jundiá (*Rhamdia quelen*) Nutrition and Feeding. Review in Aquaculture, v. 12. p. 299-309. Doi: 10.1111/raq.12318.

Sesay, D. F., Tsion, H. M., Zhou, Q., Ren, M., Xie, J., Liu, B., Chen, C., 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, v. 452, p. 142–150. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.10.026

Shiva, M., Gautam, A. K., Verma, Y., Shivgotra, V., Doshi, H., & Kumar, S. (2011). Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. Clinical Biochemistry, v. 4, n. 44, p. 319–324. Doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.11

Storey, B. (1997). Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. Reprodução Humana Molecular, v. 3, n. 3, p. 203–213. Doi:10.1093/molehr/3.3.203.

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. v. 326-329, p. 74-80. Doi: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, v. 45, p. 1425–1433. Doi: 10.1111/are.12087

Valdebenito, I; Fletcher, C; Vera, V; Fernández, J. (2009). Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. una revisión. Archivos de Medicina Veterinaria, v. 41, n. 2, p. 97-106. Doi:10.4067/s0301-

Vannucchi, H., Monteiro, T. H. (2010). Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ácido Fólico. *Ilsi Brasil International Life Sciences*, v.10, p. 1-24.

Witeck, L., Bombardelli, R. A., Sanches, E. A., Oliveira, J. D. S., Baggio D. M., Souza, B. E. (2011). Sperm motility, oocyte fertilization and egg hatching on Jundiá catfish in cadmium contaminated water. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 3, p. 477-481.

Wong, C. M., Marcocci, L., Liu, L., Suzuki, YJ (2010). Cell Signaling by Protein Carbonylation and Decarbonylation. *Antioxidantes e Redox Signaling*, v. 3, n. 12, p. 393–404. Doi:10.1089/ars.2009.2805

Yousef, M. I., El-Demerdash, F. M., Kamil, K. I. e Elaswad, F. A. M. (2006). Ameliorating effect of folic acid on chromium (VI)-induced changes in reproductive performance and seminal plasma biochemistry in male rabbits. *Reproductive toxicology*, v. 3, n. 21, p. 322–328. Doi:10.1016/j.reprotox.2005.09.00