



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE PORTO NACIONAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-LICENCIATURA

GEOVANA DE SOUZA ANDRADE

**INCLUSÃO DE *Spirulina* sp. (*Arthospira*) NA ALIMENTAÇÃO DE *Arapaima*
gigas (Schinz, 1822): EFEITOS NA MATURAÇÃO GONADAL**

PORTO NACIONAL-TO

2023

GEOVANA DE SOUZA ANDRADE

INCLUSÃO DE *Spirulina* sp. (*Arthospira*) NA ALIMENTAÇÃO DE *Arapaima gigas* (Schinz, 1822): EFEITOS NA MATURAÇÃO GONADAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), avaliada como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas, sob orientação do Dr. Lucas Simon Torati.

PORTO NACIONAL-TO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

A553i Andrade, Geovana de Souza.
Inclusão de *Spirulina* sp. (*Arthospira*) na alimentação de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822): efeitos na maturação gonadal. / Geovana de Souza Andrade. – Porto Nacional, TO, 2023.
40 f.
Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Ciências Biológicas, 2023.
Orientador: Lucas Simon Torati
1. Pirarucu. 2. Reprodução. 3. Ovócitos. 4. Microalga. I. Título

CDD 570

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GEOVANA DE SOUZA ANDRADE

INCLUSÃO DE *Spirulina* sp. (*Arthospira*) NA ALIMENTAÇÃO DE *Arapaima gigas* (Schinz, 1822): EFEITOS NA MATURAÇÃO GONADAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), avaliada como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas, e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 23 / 06/ 2023.

Banca Examinadora:

Dr. Lucas Simon Torati.

Profa. Dra. Carine Cavalcante Chamon

Dra. Luciana Nakaghi Ganeco Kirschnik

AGRADECIMENTOS

Durante esse período muitas pessoas contribuíram e passaram pelo meu caminho, influenciando de forma direta e indireta a construção deste trabalho. Portanto, a palavra que define meu sentimento a todos os envolvidos é gratidão. Creio que não seja possível expressá-la; todavia, escreverei algumas palavras destacando algumas das contribuições que me foram concedidas, ainda que eu corra o risco de me esquecer de outras pessoas importantes.

Ao Lucas Torati, me faltam palavras para dizer o quanto sou honrada em ter trilhado esse caminho com você. Foram muitos momentos de muitas risadas, conversas, correções, muito aprendizado! Sou muito feliz por esse encontro da vida que me permitiu conhecê-lo.

Agradeço imensamente a Luciana Ganeco por todo o suporte na coleta de dados deste trabalho. Por me ensinar muito sobre histologia e criopreservação de sêmen. Você é um ser que brilha muito! Carrego você com muito carinho no meu coração.

Agradeço a todos que contribuíram na coleta de dados durante todo o período de estudo (Ana Paula Sobrinho, Gabryelle Guimarães e Francisco Costa). Em especial, a Sebastiana Lima que sempre esteve presente me ajudando e tornando o ambiente de trabalho mais leve e divertido!

À minha família que sempre torceu por mim, em especial aos meus pais. Uma vida inteira não será suficiente para retribuir tudo o que fizeram para que eu chegasse até aqui. Que fique registrada nesta folha de papel e no coração de vocês minha imensa gratidão.

A todos os excelentes professores, reitero meu muito obrigada! Com destaque especial para as professoras Carine Chamon e Etiene Fabbrin, que me ensinaram muito além de uma grade curricular. Elas são mulheres fortes e resistentes que caminham de cabeça erguida. Ensinaram-me a ser uma mulher firme frente a esse sistema de opressão em que nós lutamos contra todos os dias. Meu desejo é que a força da mulher mova o mundo!

Ao Guilherme Julião Zocolo e o LMQPN (Embrapa Agroindústria Tropical) pela colaboração nas análises de ácidos graxos.

Ao Programa de Pesquisa e Inovação Horizonte 2020 da União Europeia (contrato de subvenção nº 818173), “Projeto AquaVitae” por todo incentivo financeiro.

Com lágrimas nos olhos e o coração cheio de gratidão que escrevo todos esses agradecimentos.

VIVA a Universidade Pública, e todas as oportunidades que ela nos proporciona!

RESUMO

O pirarucu *Arapaima gigas* é um osteoglossídeo amazônico ameaçado que atrai enorme interesse na aquicultura. Entretanto, sua reprodução em cativeiro não ocorre de maneira controlada. Não havendo alevinos suficientes para sustentar sua cadeia produtiva, ainda hoje são capturados na natureza intensificando sua ameaça ecológica. Este trabalho objetivou avaliar o efeito da alimentação de casais de pirarucu com *Spirulina* sp. no desenvolvimento ovariano das fêmeas e na reprodução dos casais. Para isso, seis casais de pirarucu alocados em seis viveiros escavados foram estudados. Por um período de 41 dias, três casais (n=3) foram alimentados com bolotas contendo 9,3% de *Spirulina* sp, e três casais (n=3) foram alimentados com bolotas feitas de ração (grupo controle). Amostras de biópsias ovarianas foram coletadas antes e depois do período alimentar. As amostras de ovócitos obtidas foram medidas (diâmetro médio e volume), classificadas quanto ao padrão de coloração, e classificadas em estágio de desenvolvimento (vitelogênese e maturação final) para avaliação do desenvolvimento entre os grupos. Amostras em maturação final (2mm de diâmetro) foram processadas por histologia básica para avaliação do seu índice lipídico (%). Como resultados, observou-se que de forma geral os ovócitos das fêmeas tratadas com *Spirulina* sp. não tiveram diferença significativas em relação ao grupo controle (teste *t*, $P>0,05$). Não houve crescimento diferencial significativo no diâmetro e nem numérico quando comparadas as populações de ovócitos vitelogênicos e nem de maturação final entre os grupos tratado e controle (teste *t*, $P<0,05$). Observou-se que os ovócitos em maturação final das fêmeas alimentadas com *Spirulina* sp. tiveram um significativo incremento na coloração esverdeada (Qui-quadrado, $P<0,05$). Ainda, o índice lipídico das fêmeas alimentadas com *Spirulina* sp. (14.9%, n=2 fêmeas) foi maior do que o encontrado para fêmeas do grupo controle (12%, n=2 fêmeas). Apesar de nenhum dos casais terem tido reproduções ou desovas observadas, os resultados obtidos em conjunto sugerem que a alimentação de reprodutores de *A. gigas* com *Spirulina* sp. favoreça a fase de maturação final com possível incremento no conteúdo lipídico. Esses resultados contribuem para o desenvolvimento de protocolos alimentares de reprodutores da espécie objetivando o controle da sua reprodução em cativeiro.

Palavras-chave: Pirarucu. Reprodução. Ovócitos. Microalga.

ABSTRACT

The pirarucu *Arapaima gigas* is an endangered Amazonian osteoglossid that has attracted enormous interest in aquaculture. However, its reproduction in captivity is not yet controlled. Since there are not enough fingerlings to support its production chain, fingerlings are still captured in nature, intensifying the species ecological threat. This work aimed to evaluate the effect of feeding pirarucu couples with *Spirulina* sp. in the ovarian development of females and couple reproductions. For this, six pairs of pirarucu isolated in six earth ponds were studied. For a period of 41 days, three couples (n=3) were fed with “big pellets” containing 9.3% *Spirulina* sp. T, and three couples (n=3) were fed acorns made from feed, and were used as control group. Ovarian biopsy samples were collected before and after the feeding period. The oocyte samples obtained were measured (average diameter and volume), classified according to the colour pattern, and classified in stage of development (vitellogenesis and final maturation) for evaluation of growth (development) between groups. Samples in final maturation (2mm in diameter) were processed by basic histology to evaluate their lipid index (%). As a result, it was observed that, in general, oocytes from females treated with *Spirulina* sp. did not differ significant from the control group (t test, $P>0.05$). There was no significant difference in diameter or numerical growth when comparing the populations of vitellogenic or final maturation oocytes between treated and control groups (t test, $P<0.05$). However, there was a difference in the number of oocytes in the vitellogenic vitellogenesis phase for the treated group, and between the treated group and oocytes in final maturation for the control group (Chi-square, $P<0.05$). It was observed that the oocytes in final maturation of the females fed with *Spirulina* sp. had a significant increase in greenish coloration (Chi-square, $P<0.05$). Still, the lipid index of females fed *Spirulina* sp. (14.9%, n=2 females) was higher than that found for females in the control group (12%, n=2 females). Although none of the pairs had observed reproductions or natural spawning, the results obtained together indicate that the feeding of *A. gigas* couples with *Spirulina* sp. favours the final maturation phase of oocytes with a possible increase in lipid content. These results contribute to the development of feeding protocols for breeders of the species, aiming to control their reproduction in captivity.

Keywords: Pirarucu. Reproduction. Oocytes. Microalgae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fabricação das “bolotas” experimentais. A. Mistura da água, polvilho e *Spirulina* sp. B e C. Massa resultante homogeneizada e formatada em pequenas esferas de 33g. D. Bolota recheada com a esfera resultando em uma massa final com ~139,3 g. E e F. Corte transversal comparando uma bolota com recheio de ração (E) usada no grupo controle e *Spirulina* sp. (F) usada no grupo tratamento.....19
- Figura 2.** *Arapaima gigas*. Micrografia em microscopia de luz de um ovócito em estágio de maturação final, destacando o quadrante (500µm X 500µm) padronizado para o cálculo do índice lipídico (%), no qual a área total dos grânulos de lipídeo (AL) foi calculada.....22
- Figura 3.** Padrão de coloração encontrado nas amostras de biópsias ovarianas de *Arapaima gigas* tratados ou não com ração acrescida de *Spirulina* sp. A) amarelo claro (AM-CL); B) amarelo escuro (AM-ES); C) verde claro (VD-CL); D) verde escuro (VD-ES).....23
- Figura 4.** Diâmetro médio (mm) dos ovócitos de reprodutores de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp.....24
- Figura 5.** Diâmetro médio (mm) da coorte de ovócitos vitelogênicos de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp.....25
- Figura 6.** Número médio de ovócitos vitelogênicos de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp. Grupo *Spirulina* sp. (n=3 fêmeas), grupo Controle (n=3 fêmeas).....26
- Figura 7.** Diâmetro médio (mm) da coorte de ovócitos em maturação final de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp.....27
- Figura 8.** Número médio dos ovócitos em fase de maturação final de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp. Grupo *Sírulina* sp. (n=3 fêmeas), grupo Controle (n=3 fêmeas).....27
- Figura 9.** Padrão de coloração dos ovócitos de reprodutores de *Arapaima gigas* antes (tempo A) (A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) (B) alimentar com *Spirulina* sp. AM-CL = amarelo claro; AM-ES = amarelo escuro; VD-CL = verde claro; VD-ES = verde escuro.....28

Figura 10. Padrão de coloração encontrado em amostras de ovócitos em fase de maturação final nas fêmeas dos grupos controle (A) e após 41 dias (tempo B) de tratamento alimentar com *Spirulina* sp.(B).....28

Figura 11. Índice lipídico (%) nos ovócitos de *Arapaima gigas* em fase de maturação final antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp. Grupo controle, n=2 fêmeas; Grupo *Spirulina* sp., n=2 fêmeas).....29

Figura 12. Cortes histológicos de ovócitos de *Arapaima gigas* em fase de maturação final antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp. Coloração branca corresponde aos grânulos de lipídio. Coloração feita com Hematoxilina-Eosina (HE).....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de biométricos dos peixes utilizados para experimentação (*A. gigas*). TAG = número do chip. ID = identificação dos peixes. MC = massa corporal. CT = comprimento total. K = fator de condição Fulton.....18

Tabela 2. Composição de cada bolota ofertada para os reprodutores de Pirarucu do grupo tratado. *Ração (PraPeixe Viveirus Carnivorus 40, 12-14mm, Umidade máxima 10%, proteína bruta 40%, extrato etéreo 10%, matéria fibrosa 8%, fósforo, 0,7%, vitamina C 400mg/kg). **Polvilho (Amafil Matuto, valor energético 15,05 kj.g⁻¹, carboidratos 90%, proteína bruta 0%, gorduras totais 0%). *** *Spirulina* sp.....19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Geral.....	16
1.1.2 Específicos	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Animais estudados	17
2.2 Desenho experimental	17
2.3 Fabricação das dietas e alimentação dos peixes	18
2.4 Manuseio dos peixes e coleta de biópsias ovarianas	20
2.5 Análises dos ovócitos (tamanho, estágio, grânulos de lipídeo e coloração) ...	20
2.6 Análises estatísticas	23
3 RESULTADOS	24
3.1 Ovócitos totais: crescimento médio em diâmetro	24
3.2 Ovócitos vitelogênicos: crescimento em diâmetro e número	24
3.3 Ovócitos em maturação final: crescimento em diâmetro e número	26
3.4 Padrão de coloração dos ovócitos em fase vitelogênica e maturação final	28
3.5 Índice lipídico (%) em ovócitos na fase de maturação final	29
3.6 Desovas, reproduções naturais e mortalidades	30
4 DISCUSSÃO	31
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Spirulina*, reclassificado como *Arthospira* Smith 1969, tem como característica morfológica principal o enrolamento helicoidal de seus tricomas multicelulares (JUNG; BRAUNE; WALDECK; KÜPPER *et al.*, 2021). O gênero pertence à família Microcoleaceae (Cyanobacteria: Oscillatoriales), fazendo parte do diversificado grupo de microrganismos caracterizados por serem desprovidos de raízes, caules, folhas, e por possuírem clorofila *a* e fotossíntese oxigênica. Atualmente existem 23 espécies de *Arthospira* (*Spirulina*), sendo elas encontradas em diversos continentes, exceto na Antártida, podendo viver em ambientes marinhos e de água doce (NOWICKA-KRAWCZYK; MÜHLSTEINOVÁ; HAUER, 2019). Por ser um organismo com taxa de crescimento celular alta, resistente a ambientes alcalinos e salinos, uma fonte de minerais, fósforo, nitrogênio e sua forma filamentosa, torna sua produção viável como fonte de suplementação alimentar. Nutricionalmente, a *Spirulina* é rica fonte de energia, hidratos de carbono, ácidos graxos, proteínas, clorofila, vitamina B e minerais (NARASIMHA; VENKATARAMAN; DUGGAL; EGGUM, 1982; CARVALHO, 2014). Por ser uma excelente fonte nutricional, a *Spirulina* tem sido amplamente utilizada na nutrição humana e animal, no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, e aplicações como a remoção de nutrientes de águas residuais (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Diversos trabalhos têm mostrado a aplicação de *Spirulina* sp. como fonte suplementar de nutrientes em cultivos de diversos animais domesticados, tal como peixes ornamentais (BAKSHI; BEHERA; SAHA; MANDAL *et al.*, 2018), aves (NEUMANN; VELTEN; LIEBERT, 2018), cães (SATYARAJ; REYNOLDS; ENGLER; LABUDA *et al.*, 2021), camarões (MACIAS-SANCHO; POERSCH; BAUER; ROMANO *et al.*, 2014), equinos (NAWROCKA; KORNICKA; SMIESZEK; MARYCZ, 2017), vacas leiteiras (MANZOCCHI; GUGGENBÜHL; KREUZER; GILLER, 2020), dentre outros. Isso porque além de ser uma fonte nutricional rica, a *Spirulina* é também considerada de “fácil” produção (ANDRADE; COSTA, 2008). O cultivo pode ser realizado em sistemas abertos (lagos e lagoas) ou fechados (fotobiorreatores) com condições ideais para seu crescimento. É extraída dos tanques através de tubagem e encaminhada para filtragem. A biomassa resultante da filtragem é prensada e seca em baixa temperatura até o produto final. Atualmente os principais produtores globais são os Estados Unidos, Tailândia, Índia, China e Grécia

(FERREIRA, 2020). No Brasil, a *Spirulina* tem sido cultivada principalmente nos estados de Santa Catarina, Paraíba e Mato Grosso. Ainda assim, o consumo dessa microalga no Brasil supera sua capacidade produtiva, havendo necessidade de importação. Essa importação majoritariamente tem sido destinada para nutrição humana e animal (AMBROSI; REINEHR; BERTOLIN; COSTA *et al.*, 2008).

Em particular na piscicultura, a *Spirulina* tem sido empregada na substituição da farinha de peixe, com benefícios encontrados no desempenho animal de diferentes espécies de peixe (SHAH; LUTZU; ALAM; SARKER *et al.*, 2018). Por exemplo, a farinha de peixe pode ser substituída por até 30% de *Spirulina* para o desempenho de crescimento em alevinos de *Oreochromis* sp. (RINCÓN; VELÁSQUEZ; DÁVILA; SEMPRUN *et al.*, 2012). Na inclusão de 5 % de *Spirulina* na dieta de *Oplegnathus fasciatus*, observou-se um ganho de peso maior comparado a outras taxas de conversão alimentar (KIM; RAHIMNEJAD; KIM; LEE, 2013). Além disso, por ser rica fonte de ácidos graxos poli-insaturados (AMBROSI; REINEHR; BERTOLIN; COSTA *et al.*, 2008), atualmente seu uso tem se voltado para suprir deficiências nutricionais em reprodutores de peixes, com ganhos demonstrados na qualidade dos gametas (WAHBI; SANGAK, 2017; CALABRÒ; BERTUCCIO; GERVAZI; LAURIANO *et al.*, 2021).

Quando peixes são trazidos para o ambiente de cativeiro, a maioria das espécies não encontra um ambiente favorável à reprodução, uma vez que no ambiente de cultivo normalmente faltam estímulos ambientais e nutricionais necessários para regulação dos processos fisiológicos envolvidos (MAÑANÓS; DUNCAN; MYLONAS, 2008; MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010). Em tais situações, disfunções reprodutivas diversas podem acontecer e a reprodução não ocorre sem algum tipo de intervenção, podendo estas ser hormonais, ambientais e nutricionais (MYLONAS; ZOHAR, 2001; MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010; MYLONAS; DUNCAN; ASTURIANO, 2017). Ainda assim, para o emprego de terapias hormonais ou simulações ambientais, a existência de uma nutrição adequada é sempre uma condição fundamental para que os peixes possam alocar energia no desenvolvimento e maturação das gônadas (LUBZENS; YOUNG; BOBE; CERDÀ, 2010).

O Pirarucu, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 é um peixe bastante promissor para a aquicultura tropical (VALLADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2016), com elevado potencial de crescimento (SAINT-PAUL, 2017), tendo sido trazido para o ambiente de

cultivo desde a década de 40 (FONTENELE, 1948). Porém, desde então sua reprodução em cativeiro nunca ocorreu de forma controlada e regular. O pirarucu pertencente à família Arapaimidae (Osteoglossiformes), e tem sido uma fonte de proteína de enorme relevância para populações ribeirinhas, em especial da região Norte. Por isso, a sobre pesca levou o pirarucu quase a extinção e tendo sido demonstrada redução na sua diversidade genética em diversas populações naturais (HRBEK; FARIAS; CROSSA; SAMPAIO *et al.*, 2005; VITORINO; NOGUEIRA; SOUZA; ARARIPE *et al.*, 2017; TORATI; TAGGART; VARELA; ARARIPE *et al.*, 2019). O controle da reprodução de *A. gigas* em cativeiro poderia não somente contribuir para o aumento da sua produção pela aquicultura, mas também ser uma forma de contribuir para a redução da pesca predatória da espécie em seu habitat natural (CAVOLE; ARANTES; CASTELLO, 2015).

Os primeiros estudos sobre a biologia reprodutiva de *A. gigas* descreveram o seu comportamento pré-copulatório e hábito de desova em ambiente de cativeiro (FONTENELE, 1948; 1953). Segundo Osmar Fontenele (1948), o comportamento reprodutivo do pirarucu em cativeiro é complexo, envolve um processo de “formação de casais”, que é seguido pela construção de ninhos por ambos os sexos, a desova e fertilização dos ovos no ninho, seguido de um cuidado parental intenso no qual macho e fêmea se revezam no cuidado do ninho até a fase quando as larvas têm sua bexiga respiratória inflada. Estudos posteriores mostraram que ambos os sexos do pirarucu possuem apenas a gônada esquerda funcional, sendo o ovário desprovido de “cápsula”, resultando que na ovulação, os ovos são liberados diretamente na cavidade celomática, sendo então conduzidos para o ambiente externo por uma ação muscular (GODINHO; SANTOS; FORMAGIO; GUIMARÃES-CRUZ, 2005). A maturidade sexual de *A. gigas* é atingida entre o terceiro e quinto ano de idade (Godinho *et al.*, 2005). O desenvolvimento ovariano do pirarucu é classificado como assincrônico, resultando na possibilidade de múltiplas desovas ao longo do período reprodutivo, que coincide com o período chuvoso da região amazônica (Nov-Mai) (GODINHO; SANTOS; FORMAGIO; GUIMARÃES-CRUZ, 2005; NÚÑEZ; CHU-KOO; BERLAND; ARÉVALO *et al.*, 2011). Sendo de desenvolvimento assincrônico, no ovário do pirarucu são encontrados ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Estudo mais recente descreveu histologicamente a ovogênese do pirarucu em seu crescimento primário (ovócitos < 0,770 mm de diâmetro), secundário (ovócitos com 0,783 a 1,276

mm de diâmetro), maturação final (ovócitos com 1,302-2,466 mm de diâmetro) e ovulação (ovócitos > 2,480 mm) (TORATI; LIMA; GANECO-KIRSCHNIK; MIGAUD, 2019).

Visando o controle reprodutivo do pirarucu em cativeiro, estudos foram desenvolvidos para entender melhor sua biologia reprodutiva. Por se tratar de uma espécie sem dimorfismo sexual evidente, a identificação sexual foi ao longo da história um problema a ser sanado. A sexagem por exame laparoscópico permitiu a observação direta da gônada, porém o procedimento envolvia cirurgia, sendo portanto arriscado ao peixe e de difícil operacionalidade (CARREIRO; FURTADO-NETO; MESQUITA; BEZERRA, 2011). Avanços foram conseguidos posteriormente com o método de detecção de vitelogenina plasmática (CHU-KOO; DUGUE; ALVAN AGUILAR; CASANOVA DAZA *et al.*, 2009), que permitiu a identificação de fêmeas com segurança e contribuiu para a estruturação de diversas pisciculturas na região Norte do Brasil (LIMA; RODRIGUES; VARELA; TORATI *et al.*, 2017). Mais recentemente, um procedimento de endoscopia não cirúrgica (gonoductoscopia) permitiu a observação direta do ovário de *A. gigas* (TORATI; VARGES; GALVÃO; MESQUITA *et al.*, 2016), e contribuiu para o entendimento da anatomia urogenital da espécie, avançando então com a viabilidade do processo de canulação em fêmeas sem a necessidade da endoscopia como orientação visual (TORATI; LIMA; GANECO-KIRSCHNIK; MIGAUD, 2019). Com esse avanço, tornou-se possível a obtenção de biópsias ovarianas para análise de estágio de maturação e qualidade nutricional. O método de canulação possibilitou monitorar o desenvolvimento gonadal *in vivo* permitindo o acompanhamento do desenvolvimento ovariano em experimentos. Desde então, a técnica tem sido utilizada objetivando observar o efeito de terapias hormonais na estimulação da gonadogênese do Pirarucu (TORATI; TAYLOR; MESQUITA; MIGAUD, 2020) Entretanto, sabe-se que tais terapias somente são eficazes quando associadas à uma nutrição apropriada nas fases que antecedem o período reprodutivo.

De forma geral, estudos que avaliam o efeito da suplementação nutricional na maturação gonadal em animais vivos ainda são escassos, principalmente para peixes nativos do Brasil. Para o pirarucu, estudos de nutrição são ainda restritos às fases de recria e engorda (RODRIGUES; LIMA; ANDRADE; MEDEIROS, 2019; CAVALI; AL., 2020). São inexistentes estudos com nutrição de reprodutores de pirarucu, justificado pelas dificuldades técnicas relacionadas a impossibilidade de se sacrificar

animais altamente valiosos para coleta de amostras, bem como a onerosidade para se manter grandes planteis da espécie. Entretanto, após o desenvolvimento da técnica de canulação, tornou-se possível investigar o efeito da inclusão de nutrientes específicos no desenvolvimento ovariano da espécie.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da alimentação de reprodutores de *Arapaima gigas* com *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) na maturação gonadal e reprodução.

1.1.2 Específicos

Avaliar em casais de *A. gigas*, os efeitos da alimentação com *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) nos (as):

- a) Ovócitos totais: crescimento médio em diâmetro;
- b) Ovócitos vitelogênicos: crescimento em diâmetro e número;
- c) Ovócitos em maturação final: crescimento em diâmetro e número;
- d) Padrão de coloração dos ovócitos em fase vitelogênica e maturação final;
- f) Índice lipídico (%) em ovócitos na fase de maturação final;
- g) Desovas, reproduções naturais e mortalidades.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais estudados

O experimento descrito aqui atende a “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos” – DBCA, o projeto do qual esse experimento faz parte foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado – SISGen (ADBE614) e o experimento aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da Embrapa Pesca e Aquicultura (certificado n°69).

Para esta pesquisa, um experimento foi conduzido nos campos experimentais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas-TO (S 10°7'59,7702" - W 48°19'1,1568"). O estudo utilizou seis fêmeas de *A. gigas* previamente chipadas com TAGs intramusculares (AnimallTAG®, São Carlos, Brasil), permitindo a identificação individual dos animais em cada coleta. Cada fêmea havia sido previamente alocada com um macho em um viveiro escavado (200m²; 0,8 a 1,6m profundidade), totalizando seis viveiros escavados. Todos os peixes eram sexualmente maduros com média de sete anos de idade (Tab. 1). Os casais estavam distribuídos dessa forma desde setembro de 2019, sem registros de eventos reprodutivos até o início do experimento.

2.2 Desenho experimental

As coletas de dados foram realizadas em dois tempos diferentes: A) coleta inicial antes da alimentação experimental com inclusão de *Spirulina* sp. (*Arthrospira*), realizada nas manhãs (9:00-13:00) dos dias 15 e 16 de fevereiro de 2023, e B) coleta final após um período de 41 dias de alimentação com *Spirulina* sp., realizada nas manhãs (9:00-13:00) dos dias 29 e 30 de março de 2023. No intervalo entre as coletas A e B, três casais foram alimentados com dieta experimental (Tratamento, n=3 casais), enquanto outros três receberam uma dieta convencional (Controle, n= 3 casais). Ao início do experimento, os machos pesavam $45,0 \pm 3,7$ Kg e as fêmeas $53,7 \pm 2,0$ Kg. O fator de condição de Fulton (K) dos animais foi calculado de acordo com a fórmula $K=(MC \times 100)/CT^3$, de acordo com FROESE (2006), onde MC e CT correspondem à massa corporal e comprimento total, respectivamente (Tab. 1). A MC dos animais não foi avaliada ao término do experimento devido à problemas técnicos encontrados na última coleta.

Tabela 1: Dados de biométricos dos peixes utilizados para experimentação (*A. gigas*). TAG = número do chip. ID = identificação dos peixes. MC = massa corporal. CT = comprimento total. K = fator de condição Fulton.

TAG	ID	MC (kg)	CT (cm)	K	Tratamento
563340	F1	51,3	1,75	0,95	Controle
006244	M1	46,2	1,71	0,92	Controle
563328	F3	46,4	1,73	0,89	<i>Spirulina</i>
563328	M3	46,4	1,73	0,89	<i>Spirulina</i>
106949	F4	56,4	1,83	0,92	Controle
563331	M4	27,4	1,39	1,10	Controle
105303	F5	58,1	1,70	1,11	Controle
483619	M5	46,8	1,70	0,95	Controle
563371	F6	59,1	1,80	1,10	<i>Spirulina</i>
563339	M6	54,9	1,86	0,85	<i>Spirulina</i>
107690	F8	51,1	1,80	0,87	<i>Spirulina</i>
006280	M8	48,5	1,75	0,90	<i>Spirulina</i>

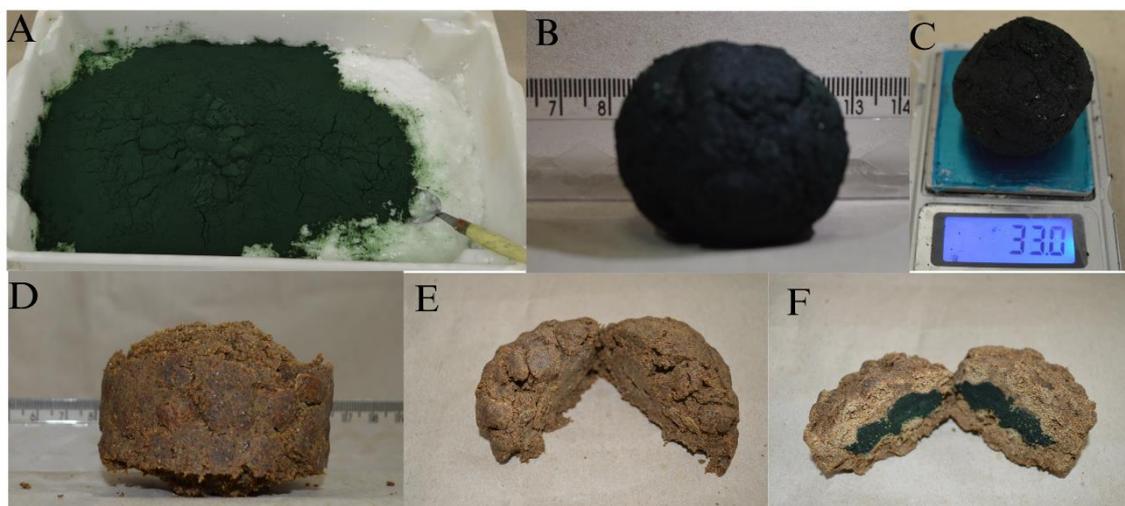
Fonte: Andrade, 2023.

2.3 Fabricação das dietas e alimentação dos peixes

A alimentação de reprodutores de *A. gigas* é normalmente realizada por meio de “bolotas” confeccionadas majoritariamente com ração comercial (TORATI; TAYLOR; MESQUITA; MIGAUD, 2020). Para esse experimento, com base na literatura, realizou-se uma inclusão de 9,3% de *Spirulina* sp. em cada bolota fabricada para os casais do grupo tratamento. A composição de cada unidade de bolota está discriminada na Tabela 2. Para fabricação da bolota (unidade), adicionou-se 16,25mL de água fervente em 5g de polvilho (água fervente para formar massa). Após a homogeneização da mistura, esta foi resfriada e 13g de *Spirulina* sp. foi adicionado à massa (Fig. 1 A). A massa resultante foi homogeneizada e formatada em uma pequena esfera de 33g (Fig. 1 B e C). Essa esfera foi então incluída no interior da bolota de ração umidificada, que foi padronizada com uma massa final de ~139,25 gramas (Fig. 1 D). Para a fabricação das bolotas ofertadas ao grupo controle, uma esfera de 33g de massa feita com ração comercial e igual quantidade de polvilho (5g) foi incluída no interior da bolota ao invés da massa de *Spirulina* sp. acima descrita (Fig. 1 E), mantendo-se a massa final da bolota “controle” igualmente em ~139,25 gramas. Na Figura 1 F pode-se observar o corte transversal de uma bolota experimental com inclusão de *Spirulina* sp.

Para fabricação por quilo de recheio de *Spirulina* sp. adicionou-se 1,250 mL de água fervente em 385g de polvilho. Após a homogeneização da mistura, esta foi resfriada e 1kg de *Spirulina* sp. foi adicionado à massa onde foi homogeneizada e formatada em esferas de 33g cada. Para fabricação das bolotas por quilo, a proporção utilizada foi de 308 g de água quente (utilizada para umedecer os pellets de ração) para cada quilo de ração. O mesmo processo se repetiu para fabricação de bolotas do grupo controle, onde houve apenas a substituição da *Spirulina* sp. por 1kg de ração triturada.

Figura 1. Fabricação das “bolotas” experimentais. A. Mistura da água, polvilho e *Spirulina* sp. B e C. Massa resultante homogeneizada e formatada em pequenas esferas de 33g. D. Bolota recheada com a esfera resultando em uma massa final com ~139,3 g. E e F. Corte transversal comparando uma bolota com recheio de ração (E) usada no grupo controle e *Spirulina* sp. (F) usada no grupo tratamento.



Fonte: Lima & Torati, 2023.

Tabela 2. Composição de cada bolota ofertada para os reprodutores de Pirarucu do grupo tratado. *Ração (PraPeixe Viveirus Carnivorus 40, 12-14mm, Umidade máxima 10%, proteína bruta 40%, extrato etéreo 10%, matéria fibrosa 8%, fósforo, 0,7%, vitamina C 400mg/kg). **Polvilho (Amafil Matuto, valor energético 15,05 kJ.g⁻¹, carboidratos 90%, proteína bruta 0%, gorduras totais 0%). *** *Spirulina* sp.

Ingrediente	Quantidade por bolota (g)
Ração comercial*	80,35
Água	40,9
Polvilho**	5
<i>Spirulina</i> sp. (<i>Arthrospira</i>)***	13 (9,3%)
Total	139,25

Fonte: Torati, 2023.

Ao longo do período de estudo, ofertou-se para cada casal oito bolotas diariamente, e considerando que cada animal tenha consumido 4 delas, estima-se o consumo por peixe em $1,17 \pm 0,18$ % da MC. As alimentações ocorreram no período dentre 15h00min e 18h00min por um período de 30 minutos, tempo no qual se observou

e anotou o consumo das bolotas por viveiro (casal), não tendo sido possível observar o consumo de bolotas por peixe.

2.4 Manuseio dos peixes e coleta de biópsias ovarianas

Para realização das coletas (A e B), os peixes foram retirados dos viveiros escavados utilizando-se redes de malha, e uma vez retirados da água, foram contidos com uma rede de contenção (“camisinha”) sobre um tablado macio (tatame), mantido úmido pelo período todo do manejo (~20 minutos). Para coleta das amostras de ovócitos, utilizou-se uma seringa acoplada com um cateter de silicone (cânula), método de canulação descrito originalmente em TORATI; LIMA; GANECO-KIRSCHNIK e MIGAUD (2019) e melhor detalhado em TORATI; LIMA; GANECO-KIRSCHNIK e MIGAUD (2022). Brevemente, neste procedimento uma cânula de silicone foi introduzida na cavidade celomática da fêmea através da abertura urogenital. Por sucção, retiraram-se biópsias ovarianas (ovócitos). As biópsias ovarianas foram armazenadas em soro fisiológico (Arboreto, Cloreto de sódio 0,9%). Após levadas para laboratório, as amostras foram lavadas com soro fisiológico, para retirada de eventual contaminação com sangue e fluido celomático. Em seguida, os ovócitos foram distribuídos em placas de Petri com graduação milimétrica, e com auxílio de uma mesa estativa, as placas foram fotografadas usando-se uma câmera fotográfica (Nikon D3200). As amostras de ovócitos foram então fixadas em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) para análises histológicas.

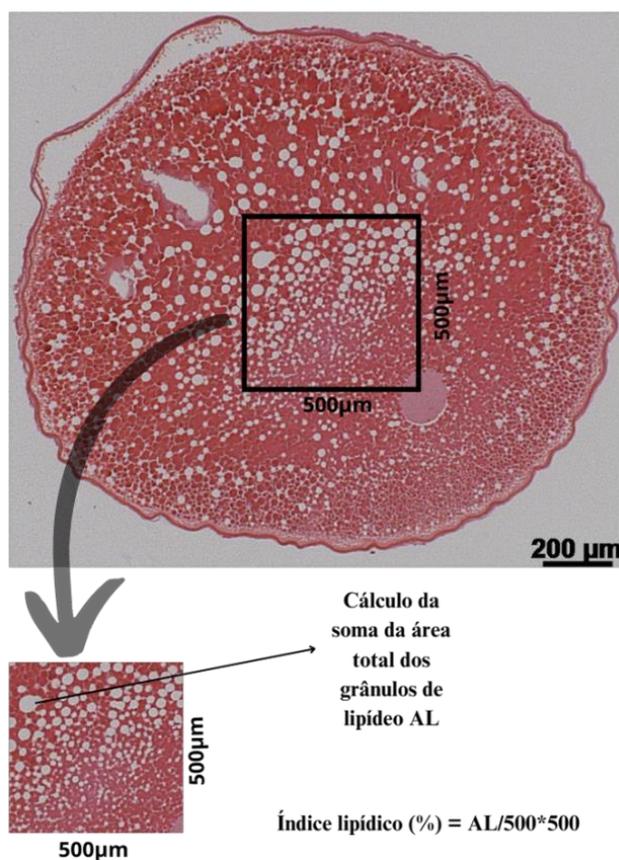
2.5 Análises dos ovócitos (tamanho, estágio, grânulos de lipídeo e coloração)

As fotos das biópsias ovarianas foram então analisadas usando-se o software ImageJ v. 1.54d (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Os ovócitos de cada fêmea (todos os estágios) foram numerados sequencialmente nas fotografias. Em seguida, utilizou-se a função “aleatórioentre” em uma planilha Excel para escolher 100 ovócitos aleatoriamente de cada biópsia ovariana. Em seguida, a marcação milimétrica das fotos foi utilizada para calibrar as medições de dois maiores diâmetros perpendiculares dos ovócitos. A classificação dos estágios de desenvolvimento em primário e secundário (vitelogênese) e maturação final baseou-se no tamanho do diâmetro médio dos ovócitos segundo TORATI; LIMA; GANECO-KIRSCHNIK e MIGAUD (2019), em que:

- 1) Vitelogênese: combinação dos estágios de crescimento primário (ovócitos < 0,770 mm de diâmetro) e crescimento secundário (ovócitos com 0,783 a 1,276 mm de diâmetro);
- 2) Maturação final: ovócitos > 1,302.

Para as análises histológicas, fixou-se o estágio de maturação final (~2,0 mm de diâmetro, n=4 ovócitos por fêmea) para análise quantitativa dos grânulos de lipídeos. Para isso as amostras previamente fixadas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol: 70%, 80%, 90% e 100% (30 min por concentração). Na última concentração (100%), o processo foi repetido por três vezes para garantir completa desidratação. Em seguida, o etanol foi substituído pela solução de infiltração componente do kit de historesina (Leica Biosystems Nussloch GmbH, kit-historesin). O processo de infiltração foi realizado por 72 horas a temperatura ambiente (~26-28°C). Cada amostra foi emblocada em formas de 0,7 ml a temperatura ambiente por seis horas após adição de solução catalisadora. Os cortes histológicos (3 µm) foram feitos usando-se um micrótomo (Leica RM2235) estendidos sobre água a 28°C em um banho Maria (Lupetec BH2015) e as lâminas confeccionadas coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram então observadas em microscopia ótica, usando-se um microscópio (1000X; Leica DM2500, Heerbrugg, Suíça) equipado com um sistema de câmera Leica DFC 500. Em seguida, as imagens geradas com escala foram analisadas o software ImageJ v. 1.54d. Nesta análise, uma área central de 250.000µ² foi padronizada para análise do índice lipídico (%), calculado como o percentual (em área) dos grânulos de lipídeos presentes nesse quadrante central (Fig. 2).

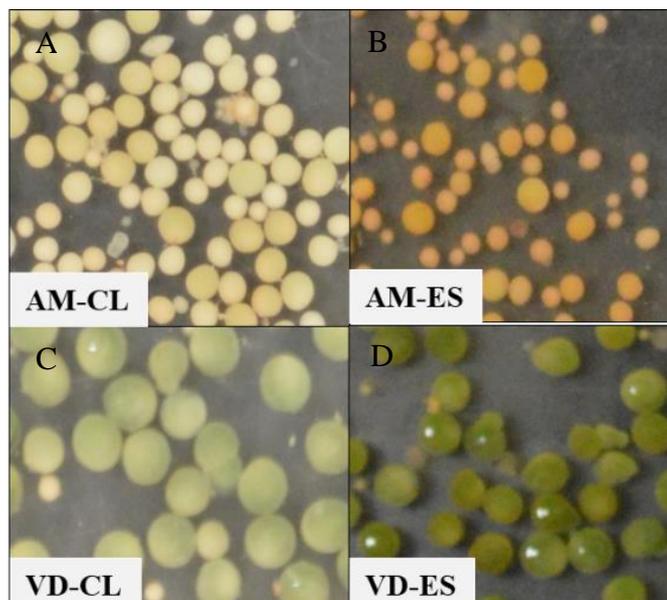
Figura 2. *Arapaima gigas*. Micrografia em microscopia de luz de um ovócito em estágio de maturação final, destacando o quadrante (500µm X 500µm) padronizado para o cálculo do índice lipídico (%), no qual a área total dos grânulos de lipídeo (AL) foi calculada.



Fonte: Torati, 2023.

Para análise do padrão de coloração dos ovócitos, utilizou-se a amostragem de 100 ovócitos por fêmea/coleta escolhidos aleatoriamente para medição, portanto previamente fotografados a fresco. As amostras continham ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, e os padrões de coloração utilizados para classificar cada um deles foram: amarelo claro (AM-CL), amarelo escuro (AM-ES), verde claro (VD-CL) e verde escuro (VD-ES) para todos os estágios, conforme padrão ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Padrão de coloração encontrado nas amostras de biópsias ovarianas de *Arapaima gigas* tratados ou não com ração acrescida de *Spirulina* sp. A) amarelo claro (AM-CL); B) amarelo escuro (AM-ES); C) verde claro (VD-CL); D) verde escuro (VD-ES).



Fonte: Andrade, 2023.

2.6 Análises estatísticas

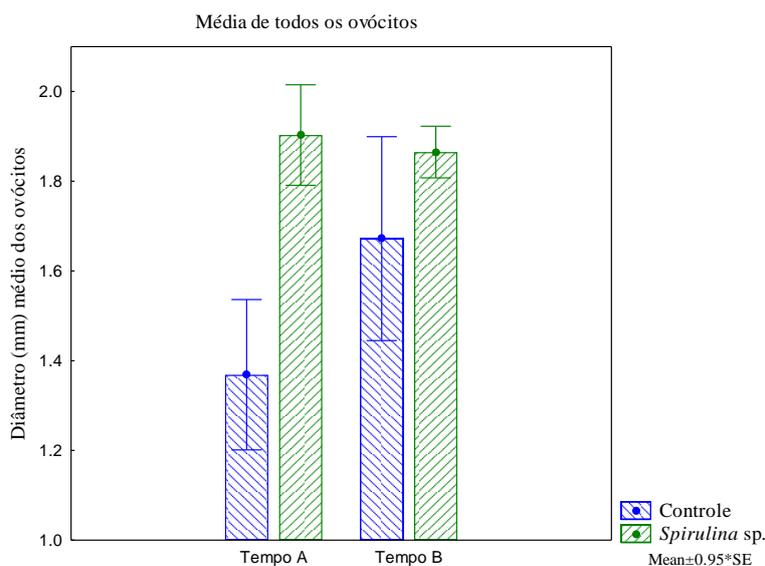
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statistica v. 7.1 (STATSOFT, 2005) ao nível de significância de $P < 0,05$. O crescimento médio dos ovócitos no período de 41 dias foi comparado entre os diferentes tratamentos (Controle vs *Spirulina*) por meio de um teste t considerando a normalidade dos dados. O teste considerou a) os ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento, b) os ovócitos apenas em fase de vitelogênese e c) os ovócitos em fase de maturação final-ovulação. Para a média do diâmetro e do número de ovócitos por coorte foi analisada considerando 100 ovócitos por fêmea em cada tempo e as diferenças testadas com teste t . Utilizou-se um teste de Qui-Quadrado para comparar o padrão de coloração dos ovócitos entre os tratamentos no tempo B (41 dias pós alimentação com *Spirulina* sp.).

3 RESULTADOS

3.1 Ovócitos totais: crescimento médio em diâmetro

O crescimento médio no diâmetro dos ovócitos das fêmeas de *A. gigas* alimentadas com *Spirulina* sp. ($-0,038 \pm 0,178$ mm; n=3 fêmeas) foi estatisticamente similar ao do grupo controle ($0,303 \pm 0,416$ mm; n=3 fêmeas) (teste *t*, $P= 0,140$) em que não houve crescimento significativo. Nas fêmeas tratadas com *Spirulina* sp., a média dos ovócitos ($1,903 \pm 0,117$ mm) no tempo A foi estatisticamente similar à encontrada no tempo B ($1,865 \pm 0,060$ mm) (Fig. 4) (teste *t*, $P= 0,846$). No grupo controle, a média no tempo A ($1,369 \pm 0,176$ mm) também foi estatisticamente similar a encontrada no tempo B ($1,672 \pm 0,239$ mm) (Fig. 4) (teste *t*, $P= 0,290$). Essa análise considerou uma amostra (100 ovócitos por fêmea) de todos os ovócitos vitelogênicos e em maturação final presentes na biópsia ovariana no momento da coleta.

Figura 4. Diâmetro médio (mm) dos ovócitos de reprodutores de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp.



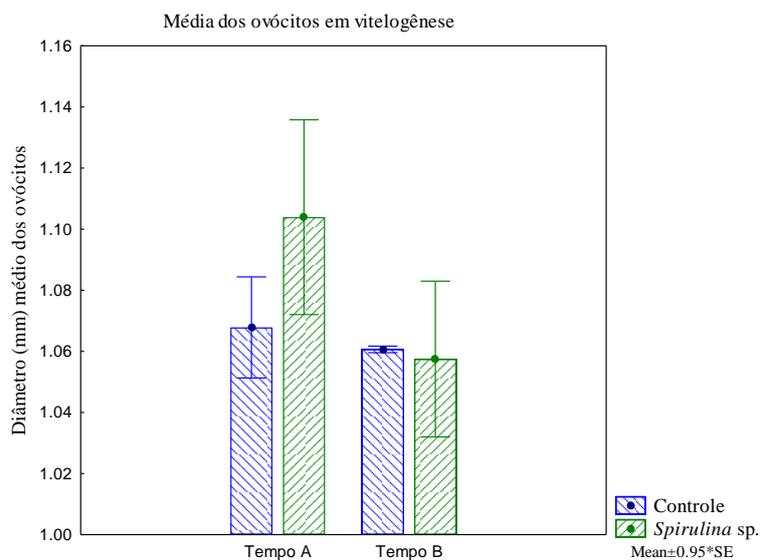
Fonte: Andrade, 2023.

3.2 Ovócitos vitelogênicos: crescimento em diâmetro e número

Não houve diferença significativa no crescimento dos ovócitos vitelogênicos entre as fêmeas do grupo controle ($-0,007 \pm 0,019$ mm; n=3 fêmeas) e as do grupo alimentado com *Spirulina* sp. ($-0,046 \pm 0,060$ mm; n=3 fêmeas) (teste *t*, $P= 0,570$). Nas fêmeas tratadas com *Spirulina* sp., a média dos ovócitos ($1,104 \pm 0,033$ mm) no tempo

A foi estatisticamente similar à encontrada no tempo B ($1,057 \pm 0,026$ mm) (Fig. 5) (teste t , $P= 0,141$). No grupo controle, a média do tempo A ($1,068 \pm 0,017$ mm) também foi estatisticamente similar à encontrada no tempo B ($1,061 \pm 0,001$ mm) (Fig. 5) (teste t , $P= 0,729$).

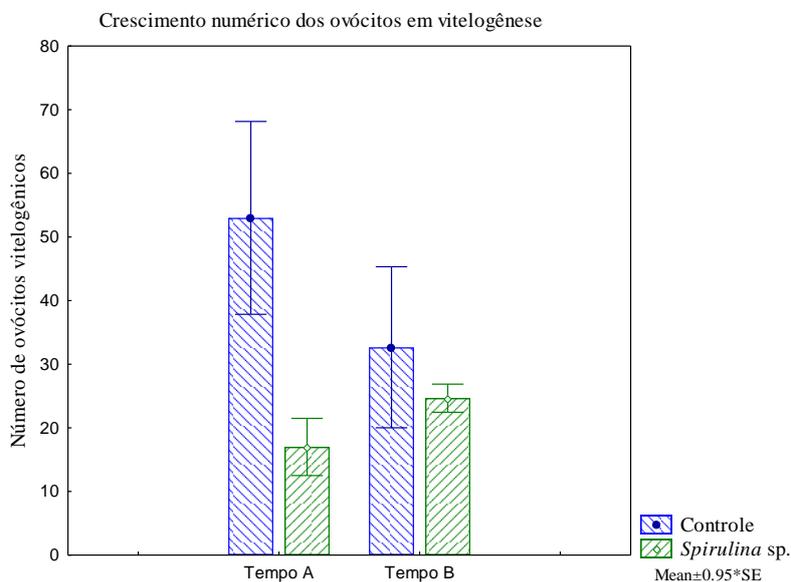
Figura 5. Diâmetro médio (mm) da coorte de ovócitos vitelogênicos de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp.



Fonte: Andrade, 2023.

Em termos numéricos, quando comparado a abundância de ovócitos entre os tempos, ambos os tratamentos não tiveram diferenças significativas. As fêmeas tratadas com *Spirulina* sp. tinham $17,0 \pm 4,7$ ovócitos vitelogênicos no tempo A, e passaram a ter $25,0 \pm 2,3$ no tempo B (teste t ; $P=0,144$, $n=3$ fêmeas) (Fig. 6). No grupo controle, as fêmeas possuíam $53,0 \pm 15,9$ ovócitos vitelogênicos no tempo A e passaram a ter $33,0 \pm 13,3$ no tempo B (teste t ; $P=0,106$; $n=3$ fêmeas) (Fig. 6).

Figura 6. Número médio de ovócitos vitelogênicos de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp. Grupo *Spirulina* sp. (n=3 fêmeas), grupo Controle (n=3 fêmeas).

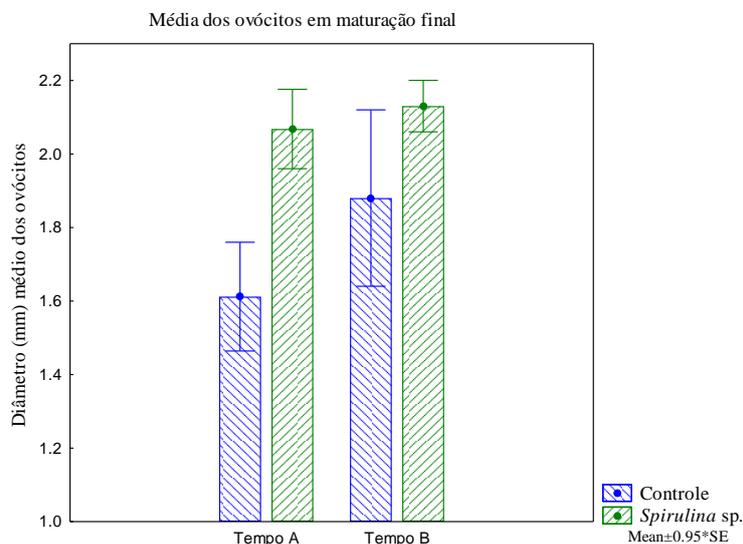


Fonte: Andrade, 2023.

3.3 Ovócitos em maturação final: crescimento em diâmetro e número

Não houve diferença significativa no crescimento dos ovócitos em fase de maturação final (>1,302 mm) entre as fêmeas do grupo controle ($0,268 \pm 0,408$ mm; n=3 fêmeas) e as do grupo alimentado com *Spirulina* sp. ($0,062 \pm 0,187$ mm; n=3 fêmeas) (teste *t*, $P=0,124$, n=3 fêmeas). Nas fêmeas tratadas com *Spirulina* sp., a média dos ovócitos ($2,068 \pm 0,113$ mm) no tempo A foi estatisticamente similar à encontrada no tempo B ($2,130 \pm 0,073$ mm) (Fig. 7) (teste *t*, $P=0,764$). No grupo controle, a média dos ovócitos em maturação final no tempo A ($1,612 \pm 0,155$ mm) também foi similar a encontrada no tempo B ($1,880 \pm 0,252$ mm) (Fig. 7) (teste *t*, $P=0,429$).

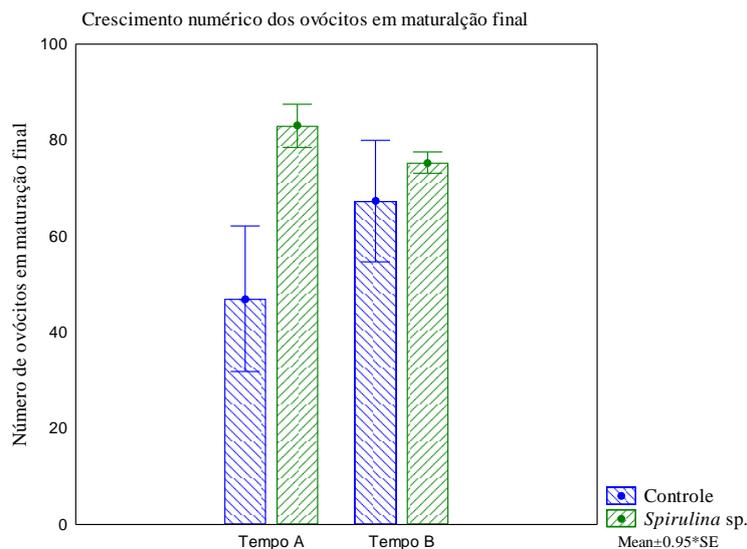
Figura 7. Diâmetro médio (mm) da coorte de ovócitos em maturação final de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp.



Fonte: Andrade, 2023.

Quando comparado o crescimento numérico de ovócitos, não houve diferenças significativas entre os tempos nos dois grupos. As biópsias ovarianas das fêmeas tratadas com *Spirulina* sp. tinham $83,0 \pm 4,72$ ovócitos no tempo A, e passaram a ter $75,0 \pm 2,3$ no tempo B (teste *t*; $P = 0,144$, $n=3$ fêmeas) (Fig. 8). No grupo controle, as fêmeas possuíam $47,0 \pm 15,9$ ovócitos no tempo A e passaram a ter $67,0 \pm 13,3$ no tempo B (teste *t*; $P = 0,106$; $n=3$ fêmeas) (Fig. 8).

Figura 8. Número médio dos ovócitos em fase de maturação final de *Arapaima gigas* antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp. Grupo *Síru*lina sp. ($n=3$ fêmeas), grupo Controle ($n=3$ fêmeas).

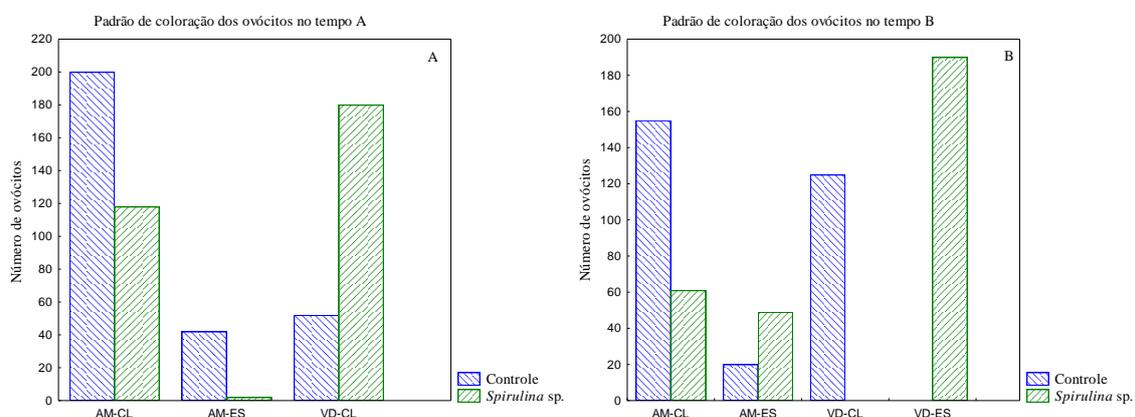


Fonte: Andrade, 2023.

3.4 Padrão de coloração dos ovócitos em fase vitelogênica e maturação final

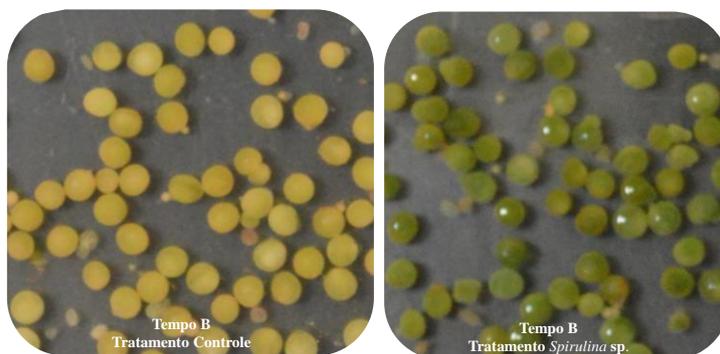
Analisando a coloração dos ovócitos nas amostras (Fig. 9 e 10), o teste de Qui-quadrado indicou diferenças entre os tratamentos após a inclusão (tempo B) da *Spirulina* sp. na alimentação ($\chi^2 = 38,7$ $P < 0.0001$) para o padrão de coloração verde claro (VD-CL) e verde escuro (VD-ES) em que, apenas o grupo controle teve coloração verde clara e apenas o grupo tratado teve coloração verde escuro. No tratamento controle, as colorações de maior frequência foram o amarelo claro em ambos os tempos e o verde claro no tempo B. Para o tratamento *Spirulina* sp. as cores mais presentes foram verde claro no tempo A e o verde escuro no tempo B. Vale ressaltar que apenas o tratamento *Spirulina* sp. teve ovócitos de coloração verde escuro (Fig. 9 e 10).

Figura 9. Padrão de coloração dos ovócitos de reprodutores de *Arapaima gigas* antes (tempo A) (A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) (B) alimentar com *Spirulina* sp. AM-CL = amarelo claro; AM-ES = amarelo escuro; VD-CL = verde claro; VD-ES = verde escuro.



Fonte: Andrade, 2023.

Figura 10. Padrão de coloração encontrado em amostras de ovócitos em fase de maturação final nas fêmeas dos grupos controle (A) e após 41 dias (tempo B) de tratamento alimentar com *Spirulina* sp.(B).

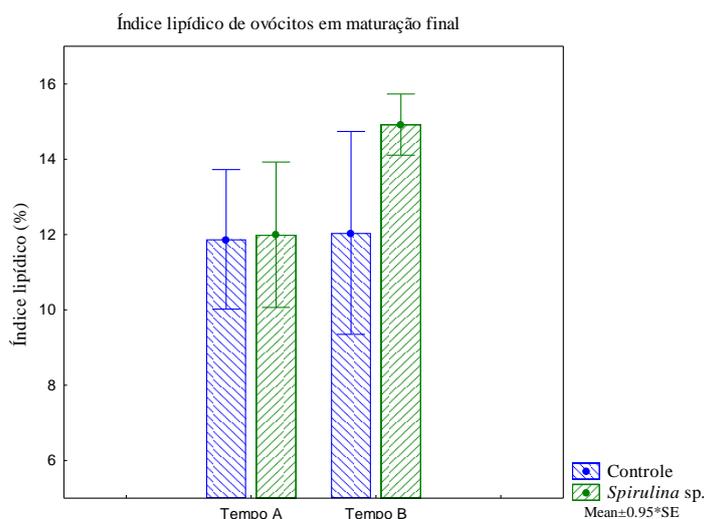


Fonte: Andrade, 2023.

3.5 Índice lipídico (%) em ovócitos na fase de maturação final

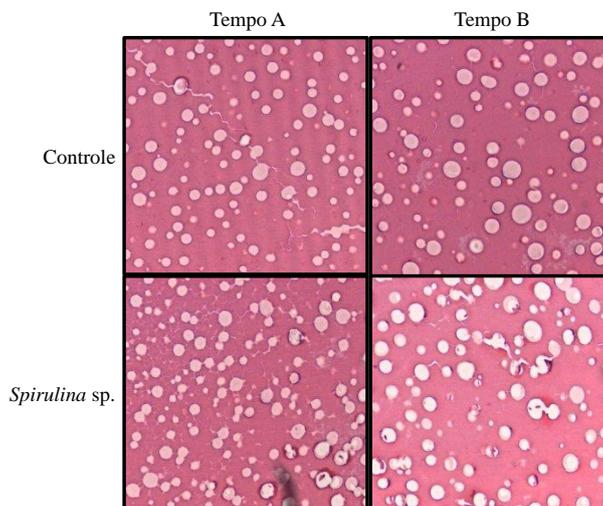
Analisando o índice lipídico (%) entre os tratamentos, os ovócitos em maturação final do tratamento *Spirulina* sp. teve a maior média no tempo B ($14,9 \pm 1,2\%$ Fig. 11) comparado ao tratamento controle ($12,0 \pm 4,0\%$). No tempo A, os tratamentos estiveram com média similares, sendo $11,9 \pm 2,7\%$ para tratamento controle e $12,0 \pm 2,8\%$ para *Spirulina* sp. A Figura 12 ilustra os grânulos de lipídio observados, cujas áreas foram mensuradas a partir de cortes histológicos.

Figura 11. Índice lipídico (%) nos ovócitos de *Arapaima gigas* em fase de maturação final antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp. Grupo controle, n=2 fêmeas; Grupo *Spirulina* sp., n=2 fêmeas).



Fonte: Andrade, 2023.

Figura 12. Cortes histológicos de ovócitos de *Arapaima gigas* em fase de maturação final antes (tempo A) e após 41 dias de tratamento (tempo B) alimentar com *Spirulina* sp. Coloração branca corresponde aos grânulos de lipídio. Coloração feita com Hematoxilina-Eosina (HE).



Fonte: Andrade, 2023.

3.6 Desovas, reproduções naturais e mortalidades

Durante o período do estudo e após 60 dias do término do experimento, não foram observadas desovas naturais em nenhum dos casais estudados. Também não houve interrupção da alimentação com bolotas por mais de dois dias seguidos que pudessem indicar um comportamento de construção de ninhos e/ou desova. Também nesse mesmo período não houve nenhuma mortalidade nos animais estudados.

4 DISCUSSÃO

O *A. gigas* é classificado como uma espécie onívora sendo posicionada como consumidor secundário (WATSON; STEWART; TEECE, 2013). Na fase adulta, ele se alimenta majoritariamente de peixes loricarídeos, calictídeos, pimelodídeos, além de caranguejos e camarões (WATSON; STEWART; TEECE, 2013; CARVALHO; POWER; FORSBERG; CASTELLO *et al.*, 2017). Objetivando otimizar a fase de engorda na aquicultura de *A. gigas*, estudos anteriores determinaram os níveis de proteína bruta para fase juvenil (ITUASSÚ; PEREIRA-FILHO; ROUBACH; CRESCÊNCIO *et al.*, 2005), a digestibilidade aparente de dietas com diferentes níveis de energia: proteína nos juvenis (ONO; NUNES; PEREIRA-FILHO; CEDANO *et al.*, 2008), os efeitos da adição das vitaminas C e E nos parâmetros sanguíneos (MENEZES; TAVARES-DIAS; ONO; DE ANDRADE *et al.*, 2006; ANDRADE; ONO; MENEZES; BRASIL *et al.*, 2007), e os benefícios da adição de Virginiamicina na dieta de juvenis. Recentemente, também estudou-se as enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs) em *A. gigas* sendo esse importante avanço no conhecimento da espécie (LOPES-MARQUES; OZÓRIO; AMARAL; TOCHER *et al.*, 2017). Entretanto, até o presente momento, ainda faltam informações sobre as necessidades nutricionais de *A. gigas* na fase adulta especialmente relacionadas aos processos reprodutivos e de produção de gametas, estudos na maioria das vezes dificultados pela necessidade de se sacrificar animais valiosos em termos econômicos e ecológicos. Neste trabalho, avaliou-se pela primeira vez os efeitos da adição de um alimento altamente rico em proteínas, carboidratos, e lipídeos sobre o desenvolvimento ovariano de reprodutores da espécie sem necessidade de sacrificar os animais estudados.

Estudos ecológicos sugerem que o período das secas (Maio-Outubro), quando os pirarucus ficam nas regiões alagadas ricas em alimento natural, seja o período quando ocorre as fases de vitelogênese e maturação gonadal na espécie (CASTELLO, 2008a; b). Com o início das chuvas (Outubro-Novembro), inicia-se o processo de formação de casais e estes procuram regiões calmas para construção de ninhos para as desovas (CASTELLO, 2008a; b). Por ser uma espécie de desenvolvimento gonadal assincrônico (GODINHO; SANTOS; FORMAGIO; GUIMARÃES-CRUZ, 2005), uma fêmea de *A. gigas* pode desovar diversas vezes ao longo do período reprodutivo, com intervalo entre desovas de aproximadamente um mês (NÚÑEZ; CHU-KOO; BERLAND; ARÉVALO *et al.*, 2011). Considerando-se esse intervalo entre desovas, acreditou-se que a oferta de

suplementação alimentar com *Spirulina* sp. por período de 41 dias seria suficiente para impactar nas populações de ovócitos em fase de maturação final. Entretanto, não foi observado crescimento em tamanho (diâmetro) e número de ovócitos na fase de maturação final como seria esperado. É possível que a qualidade dos ovócitos em fase de maturação final tenha sido incrementada como observado pelo aparente incremento do índice lipídico nas fêmeas alimentadas com *Spirulina* sp. Incremento na composição corporal de ácidos graxos foi observado na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dieta suplementada por *Spirulina* sp. (2,5%, 5% e 7,5%) por doze semanas (JAFARI; RABBANI; EMTYAZJOO; PIRYAEI, 2014). Similarmente, no zebrafish *Danio rerio* a alimentação com *Spirulina* sp. mostrou melhora na fertilidade e qualidade dos ovócitos (CALABRÒ; BERTUCCIO; GERVASI; LAURIANO *et al.*, 2021). A hipótese de incremento na composição lipídica dos ovócitos está sendo investigadas por meio da análise do perfil de ácidos graxos dos ovócitos, análises que irão complementar este trabalho em publicação posterior. Além disso, observou-se um incremento na coloração esverdeada nos ovócitos em maturação final das fêmeas tratadas com *Spirulina* sp. Essa diferença em relação ao grupo controle indica a possível absorção de pigmentos carotenoides e C-ficocianina, que são abundantes em *Spirulina* sp. (PARK; KIM; LI; LIM *et al.*, 2018), e possível incremento na qualidade nutricional por suas atividades antioxidantes a serem oferecida na fase inicial do desenvolvimento larval.

A fase de vitelogênese, também classificada como crescimento primário e secundário, é caracterizada pelo início da deposição de grânulos de lipídeos na periferia dos ovoplasma e de vesículas de vitelo na região ao redor do núcleo (GRIER; ARANZÁBAL; PATIÑO, 2009). Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas para o aumento no número médio de ovócitos na fase vitelogênica das fêmeas alimentadas com *Spirulina* sp., assim como não houve no aumento do tamanho dos ovócitos nessa fase de desenvolvimento. É possível que a fase vitelogênica tenha tido sua composição lipídica incrementada pela adição de *Spirulina* sp. na dieta, entretanto optou-se por avaliar o índice lipídico apenas na fase de maturação final, visto que o foco do trabalho foi tentar avançar a maturação final nos casais tratados. Sabe-se também que as exigências de nutrientes são diferentes para as diferentes etapas do desenvolvimento gonadal (WAHBI; SANGAK, 2017; CALABRÒ; BERTUCCIO; GERVASI; LAURIANO *et al.*, 2021). Nesse sentido, seria interessante avaliar os

efeitos da adição de *Spirulina* sp. na alimentação de *A. gigas* nos meses de junho a outubro, que coincidem com os meses de recrutamento de populações de ovócitos vitelogênicos e intensificação da maturação final na espécie. Além disso, a alimentação por período superior a 41 dias e/ou em níveis superiores a 9,3% poderia resultar em influência mais observável na coorte de ovócitos vitelogênicos e consequente benefícios nas fases seguintes (maturação final e ovulação). Entretanto, aspectos como composição nutricional, digestibilidade, palatabilidade são importantes de serem avaliados para *A. gigas*, informações ainda escassas para fase adulta da espécie. Experimentos desse tipo são desafiadores por exigirem a manutenção de animais de grande porte em estruturas físicas adequadas, o que requer altos investimentos e material biológico valioso.

A técnica de adição da *Spirulina* sp. nas “bolotas” foi essencial para garantir que os peixes estivessem consumindo o suplemento. Embora, para a flutuabilidade da bolota, tivemos que realizar ajustes técnicos para que as bolotas permanecessem tempo suficiente flutuando até o consumo pelo peixe, o que de forma geral, levava cinco minutos. Isso ajuda estudos futuros a aplicar essa mesma metodologia de alimentação com adição de outros tipos de suplementos alimentares, tal como a *Spirulina* sp. Durante o estudo foi possível observar o consumo das bolotas, assim como a natação dos casais sempre juntos. Contudo, não foram observadas desovas ou reproduções naturais no período do estudo. É possível que alguma fêmea tenha ovulado sem que fosse possível a observação. Isso porque a análise da coorte de ovócitos em fase de maturação final no tempo B mostrou-se inferior ao tempo A no grupo tratado com *Spirulina* sp., o que indica que uma parcela desses ovócitos pode ter sido ovulada e/ou reabsorvida. Em geral, a observação de reprodução e desovas em ambientes aquáticos são difíceis, principalmente devido à turbidez da água e no caso de *A. gigas*, ao seu comportamento reprodutivo complexo, em que muitos fatores ambientais podem interferir no processo, além do perigo de confrontar os reprodutores na água em um eventual momento de filmagem (FONTENELE, 1948; 1953).

Esse estudo acerca da influência da suplementação alimentar com *Spirulina* sp. em reprodutores de *A. gigas* é inédito. Os resultados obtidos podem direcionar os estudos futuros para investigarem melhor a influência da *Spirulina* sp. em um período maior ao deste estudo, visando englobar o período que antecede a fase chuvosa. A *Spirulina* sp. pode ser uma boa alternativa em um período que prepare melhor as fêmeas para fase reprodutiva. Uma vez que, a *Spirulina* sp. fornece muitos nutrientes que são

essenciais para a nutrição dos peixes (SHAH; LUTZU; ALAM; SARKER *et al.*, 2018). É importante que tenha estudos que ajude no avanço para um melhor protocolo de reprodução de *A. gigas* em cativeiro. Além de ajudar na produção comercial, a reprodução em cativeiro contribuirá para possíveis re-estocagens da espécie em seu ambiente natural e contribuir também para a diminuição da pesca predatória de peixes adultos e alevinos em condições nativas, o que tem impactado diretamente a variabilidade genética da espécie (HRBEK; FARIAS; CROSSA; SAMPAIO *et al.*, 2005; VITORINO; NOGUEIRA; SOUZA; ARARIPE *et al.*, 2017; TORATI; TAGGART; VARELA; ARARIPE *et al.*, 2019).

REFERÊNCIAS

- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. *et al.* Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 29, n. 2, p. 109-117, 2008.
- ANDRADE, J. I.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M. *et al.* Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. Comparative Biochemistry and Physiology A, 146, n. 4, p. 576-580, Apr 2007.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. Ciência e Agrotecnologia, 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- BAKSHI, S.; BEHERA, S.; SAHA, S.; MANDAL, A. *et al.* Influence of spirulina powder at carotenoids concentration in fin of an ornamental fish *Trichogaster lalius*. Journal of Entomology and Zoology Studies, 6, n. 1, p. 870-873, 2018.
- CALABRÒ, C.; BERTUCCIO, C.; GERVASI, T.; LAURIANO, E. R. *et al.* Effects of spirulina diet on the oogenesis of zebrafish: morphological analysis and immunohistochemical determination of the vitellogenin. Natural Product Research, 35, n. 22, p. 4454-4459, 2021.
- CARREIRO, C. R. P.; FURTADO-NETO, M. A. A.; MESQUITA, P. E. C.; BEZERRA, T. A. Sex determination in the Giant fish of Amazon Basin, *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes, Arapaimatidae), using laparoscopy. Acta Amazonica, 41, n. 3, p. 415-420, 2011.
- CARVALHO, F.; POWER, M.; FORSBERG, B. R.; CASTELLO, L. *et al.* Trophic Ecology of *Arapaima* sp. in a ria lake-river-floodplain transition zone of the Amazon. Ecology of Freshwater Fish, early view, 2017.
- CARVALHO, L. F. Produção de biossurfactantes e nanoemulsões a partir da microalga *Spirulina*. Orientador: COSTA, J. A. V. 2014. 114 f. (PhD) - Programa De Pós-Graduação Em Engenharia E Ciência De Alimentos, Universidade Federal Do Rio Grande, Rio Grande-RS.
- CASTELLO, L. Lateral migration of *Arapaima gigas* in floodplains of the Amazon. Ecology of Freshwater Fish, 17, n. 1, p. 38-46, 2008a.
- CASTELLO, L. Nesting habitat of *Arapaima gigas* (Schinz) in Amazonian floodplains. Journal of Fish Biology, 72, n. 6, p. 1520-1528, 2008b.
- CAVALI, J.; AL., E. Benefits of Adding Virginiamycin to *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) Diet Cultivated in the Brazilian Amazon. Hindawi, 2020.
- CAVOLE, L. M.; ARANTES, C. C.; CASTELLO, L. How illegal are tropical small-scale fisheries? An estimate for arapaima in the Amazon. Fisheries Research, 168, p. 1-5, 2015.

CHU-KOO, F.; DUGUE, R.; ALVAN AGUILAR, M.; CASANOVA DAZA, A. *et al.* Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, n. 1, p. 125-136, Mar 2009.

FERREIRA, M. M. *Spirulina: uma revisão*. 2020. 62 f. (B.Sc) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, MG.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do Pirarucú, "*Arapaima gigas*" (Cuvier), em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 8, n. 4, p. 445-459, 1948.

FONTENELE, O. Habitos de desova do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) (Pisces, Isospondyli, Arapaimidae), e evolução de sua larva. Fortaleza: DNOCS, 1953. 22 p., v. 153).

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, p. 241-253, 2006.

GODINHO, H. P.; SANTOS, J. E.; FORMAGIO, P. S.; GUIMARÃES-CRUZ, R. J. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zoologica, Stockolm*, 86, p. 289-294, 2005.

GRIER, H. J.; ARANZÁBAL, M. C. U.; PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. *In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 2009. p. 24-85.

HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I. *et al.* Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Anim Conserv*, 8, n. 3, p. 297-308, 2005.

ITUASSÚ, D. R.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; CRESCÊNCIO, R. *et al.* Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 40, n. 3, p. 255-259, 2005.

JAFARI, S. M. A.; RABBANI, M.; EMTYAZJOO, M.; PIRYAEI, F. Effect of dietary *Spirulina platensis* on fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *Aquaculture International*, 22, n. 4, p. 1307-1315, Aug 2014.

JUNG, C. H. G.; BRAUNE, S.; WALDECK, P.; KÜPPER, J. H. *et al.* Morphology and Growth of *Arthrospira platensis* during Cultivation in a Flat-Type Bioreactor. *Life*, 11, n. 536, p. 1-8, 2021.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, p. 137-138A, 1965.

KIM, S. S.; RAHIMNEJAD, S.; KIM, K. W.; LEE, K. J. Partial Replacement of Fish Meal with *Spirulina pacifica* in Diets for Parrot Fish (*Oplegnathus fasciatus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13, p. 197-204, 2013.

LIMA, A. F.; RODRIGUES, A. P. O.; VARELA, E. S.; TORATI, L. S. *et al.* A produção do Pirarucu em catveiro. Aquaculture Brazil, 2017.

LOPES-MARQUES, M.; OZÓRIO, R.; AMARAL, R.; TOCHER, D. R. *et al.* Molecular and functional characterization of a fads2 orthologue in the Amazonian teleost, *Arapaima gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology B, 203, p. 84-91, 2017.

LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. General and Comparative Endocrinology, 165, p. 367-389, 2010.

MACIAS-SANCHO, J.; POERSCH, L. H.; BAUER, W.; ROMANO, L. A. *et al.* Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands), 426-427, p. 120-125, 2014.

MAÑANÓS, E.; DUNCAN, N.; MYLONAS, C. C. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: CABRITA, E.; ROBLES, V., *et al.* (Ed.). Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species: Taylor and Francis Group CRC Press, 2008.

MANZOCCHI, E.; GUGGENBÜHL, B.; KREUZER, M.; GILLER, K. Effects of the substitution of soybean meal by spirulina in a hay-based diet for dairy cows on milk composition and sensory perception. Journal of Dairy Science, 103, n. 12, p. 11349-11362, 2020.

MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; DE ANDRADE, J. I. *et al.* The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. Comparative Biochemistry and Physiology A, 145, n. 2, p. 274-279, Oct 2006.

MYLONAS, C. C.; DUNCAN, N. J.; ASTURIANO, J. F. Hormonal manipulations for the enhancement of spermproduction in cultured fish and evaluation of sperm quality. Aquaculture, 472, p. 21-44, 2017.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165, n. 3, p. 516-534, Feb 1 2010.

MYLONAS, C. C.; ZOHAR, Y. Use of GnRH α -delivery systems for the control of reproduction in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10, p. 463-491, 2001.

NARASIMHA, D. L.; VENKATARAMAN, G. S.; DUGGAL, S. K.; EGGUM, B. O. Nutritional quality of the blue-green alga *Spirulina platensis* Geitler. *J Sci Food Agric*, 33, n. 5, p. 456-460, May 1982.

NAWROCKA, D.; KORNICKA, K.; SMIESZEK, A.; MARYCZ, K. *Spirulina platensis* Improves Mitochondrial Function Impaired by Elevated Oxidative Stress in Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells (ASCs) and Intestinal Epithelial Cells (IECs), and Enhances Insulin Sensitivity in Equine Metabolic Syndrome (EMS) Horses. *Marine Drugs*, 15, n. 237, p. 1-28, 2017.

NEUMANN, C.; VELTEN, S.; LIEBERT, F. The Graded Inclusion of Algae (*Spirulina platensis*) or Insect (*Hermetia illucens*) Meal as a Soybean Meal Substitute in Meat Type Chicken Diets Impacts on Growth, Nutrient Deposition and Dietary Protein Quality Depending on the Extent of Amino Acid Supplementation. *Open Journal of Animal Sciences*, 8, p. 163-183, 2018.

NOWICKA-KRAWCZYK, P.; MÜHLSTEINOVÁ, R.; HAUER, T. Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria). *Scientific Reports*, 9, n. 694, p. 1-11, 2019.

NÚÑEZ, J.; CHU-KOO, F.; BERLAND, M.; ARÉVALO, L. *et al.* Reproductive success and fry production of the paiche or pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz), in the region of Iquitos, Perú. *Aquaculture Research*, 42, n. 6, p. 815-822, 2011.

ONO, E. A.; NUNES, E. S. S.; PEREIRA-FILHO, M.; CEDANO, J. C. C. *et al.* Digestibilidade aparente de dietas práticas com diferentes relações energia:proteína em juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 43, n. 2, p. 249-254, 2008.

PARK, W. S.; KIM, H. J.; LI, M.; LIM, D. H. *et al.* Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin, in *Spirulina* Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 23, n. 8, Aug 2018.

RINCÓN, D. B.; VELÁSQUEZ, H. A.; DÁVILA, M. J.; SEMPRUN, A. M. *et al.* Substitution levels of fish meal by *Arthrospira* (= *Spirulina*) maxima meal in experimental diets for red tilapia fingerlings (*Oreochromis* sp.). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25, p. 430-437, 2012.

RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ANDRADE, C. L.; MEDEIROS, R. M. S. Feeding frequency affects feed intake and growth in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*). *Acta Amazonica*, 49, n. 1, p. 11-16, 2019.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

SATYARAJ, E.; REYNOLDS, A.; ENGLER, R.; LABUDA, J. *et al.* Supplementation of Diets With *Spirulina* Influences Immune and Gut Function in Dogs. *Frontiers in Nutrition*, 8, n. 667072, p. 1-7, 2021.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, p. 671-675, 2012.

SHAH, M. R. M.; LUTZU, G. A.; ALAM, A. M.; SARKER, P. *et al.* Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30, p. 197-213, 2018.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 69, n. A, p. 157-171, 2017.

STATSOFT, I. Statistica v. 7.1. www.statsoft.com, 2005.

TORATI, L. S.; LIMA, A. F.; GANECO-KIRSCHNIK, L. N.; MIGAUD, H. Endoscopy and Cannulation as Non-Invasive Tools to Identify Sex and Monitor Reproductive Development in *Arapaima gigas*. *Copeia*, 107, n. 2, p. 287-296, 2019.

TORATI, L. S.; LIMA, A. F.; GANECO-KIRSCHNIK, L. N.; MIGAUD, H. Canulação como técnica de baixo custo para identificação do sexo e condição reprodutiva em fêmeas de pirarucu *Arapaima gigas*. Comunicado Técnico. AQUICULTURA, C. L. D. P. D. E. P. E. Palmas-TO: Embrapa. 09: 1-13 p. 2022.

TORATI, L. S.; TAGGART, J. B.; VARELA, E. S.; ARARIPE, J. *et al.* Genetic diversity and structure in *Arapaima gigas* populations from Amazon and Araguaia-Tocantins river basins. *BMC Genetics*, 20, n. 13, p. 1-13, 2019.

TORATI, L. S.; TAYLOR, J.; MESQUITA, P. E. C.; MIGAUD, H. GnRH α implants and size pairing effects on plasma and cephalic secretion sex steroids in *Arapaima gigas*. *General and Comparative Endocrinology*, p. 113614, 2020.

TORATI, L. S.; VARGES, A. P. S.; GALVÃO, J. A. S.; MESQUITA, P. E. C. *et al.* Endoscopy application in broodstock management of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Journal of Applied Ichthyology*, 32, p. 353-355, 2016.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 0, p. 1-19, 2016.

VITORINO, C. A.; NOGUEIRA, F.; SOUZA, I. L.; ARARIPE, J. *et al.* Low genetic diversity and structuring of the Arapaima (Osteoglossiformes, Arapaimidae) population of the Araguaia-Tocantins basin. *Front Genet*, 8, n. 159, p. 1-10, 2017.

WAHBI, O. M.; SANGAK, Y. Enhancement of Reproductive Performance of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* using Phytobiotic *Spirulina platensis*. *Journal of Biological Sciences*, 17, n. 7, p. 305-311, 2017.

WATSON, L. C.; STEWART, D. J.; TEECE, M. A. Trophic ecology of *Arapaima* in Guyana: giant omnivores in Neotropical floodplains. *Neotropical Ichthyology*, 11, n. 2, p. 341-349, 2013.