

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

# **INSTITUTO DE PESCA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

## **SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C À DIETA PARA RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) COMO FATOR ANTIESTRESSE**

**Rainer Knoop**

**Orientador: Cláudia Maris Ferreira Mostério  
Co-orientador: Neuza Sumico Takahashi**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

**São Paulo**

Setembro - 2009

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

## **INSTITUTO DE PESCA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

# **SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C À DIETA PARA RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) COMO FATOR ANTIESTRESSE**

**Rainer Knoop**

**Orientador: Cláudia Maris Ferreira Mostério**

**Co-orientador: Neuza Sumico Takahashi**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

**São Paulo**

Setembro - 2009

K72s

Knoop, Rainer

Suplementação de vitamina C à dieta para rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) como fator antiestresse. / Rainer Knoop. – São Paulo, 2009.

v, 70f. ; il. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientador: Cláudia Maris Ferreira Mostério

1. Ácido ascórbico. 2. Anfíbios. 3. Antioxidante. 4. Corticosterona. 5. Hormônios. 6. Ranicultura. I. Mostério, Cláudia Maris Ferreira. II. Título.

CDD 693.94

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PÊSCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Suplementação de vitamina C em dieta para rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) como fator antiestresse

**AUTOR: RAINER KNOOP**

**ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério**

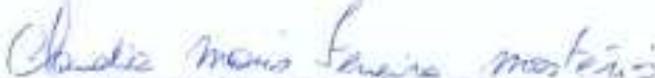
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Priscila Vian Furtado

  
Prof. Dr. Giovani-Sampaio Gonçalves

Data da realização: 16 de setembro de 2009

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

*Dedico aos meus pais, **Marta e Rainer**, por tudo o que fizeram por mim e por serem responsáveis pela minha formação, à minha esposa, **Jackline** e às minhas filhas, **Amanda e Mariana**.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Pesca e seus pesquisadores e mestres, pela oportunidade.

À Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério pela orientação, paciência e dedicação.

A Dra. Neuza Sumico Takahashi, Dr. Márcio Hipólito, Dr. Leonardo Tachibana, Dr. J. Francisco Olbrich Jr., Dr. Wilson Donegana, Dra. Priscila Viau Furtado, Dr. Atushi Sugohara, Dra. Adriana Marcantonio.

Ao Sr Valdeci e Sra Aparecida.

Ao Sr José e Sra Rosa.

A todos meus colegas de pós-graduação, especialmente Antônio, Danielle, Fernanda, Guilherme, Marina e Patrícia.

Aos motoristas do Instituto de Pesca, especialmente ao João Batista, pela grande colaboração.

Aos estagiários do projeto: Juliana, Luciana (UNESP), Ludmila, Rogério e Saulo.

Aos amigos e colegas da Bunge, da Guabi e da UNESP.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABELAS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
CAPÍTULO 1 - Avaliação fisiológica da suplementação de níveis crescentes de vitamina C como fator antiestresse à dieta de rãs-touro americana ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ), criadas comercialmente .....	10
CAPÍTULO 2 - Desempenho produtivo de rãs-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ) com a incorporação de níveis crescentes de vitamina C à dieta.....	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
APÊNDICE.....	60

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- FIGURA 1. Teores medianos de corticosterona (ng/mL) nos diferentes tratamentos com vitamina C, durante o período experimental.....22

### Capítulo 2

- FIGURA 1. Pesos médios (g) de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) obtidos durante o experimento com vitamina C .....45

### Apêndice

- FIGURA 1. Estufa coberta com polietileno e tela sombrite 50% utilizada no experimento com vitamina C incorporada à dieta de rã-touro ..... .67
- FIGURA 2. Vista das baias utilizadas no experimento com vitamina C incorporada à dieta de rã-touro.....67
- FIGURA 3. Vista interna das baias experimentais utilizadas no experimento com vitamina C incorporada à dieta de rã-touro.....68
- FIGURA 4. Extrusora da fábrica de rações da UNESP – Jaboticabal, utilizada para o preparo de rações.....68
- FIGURA 5. Local de estocagem das rações na Fazenda Marta, utilizado no experimento com vitamina C incorporada à dieta de rã-touro.....69
- FIGURA 6. Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal (FMVZ-USP) .....69
- FIGURA 7. Punção do vaso ciático do membro esquerdo após anestesia com lidocaína de exemplar de rã-touro .....70
- FIGURA 8. Lavagem da cavidade abdominal de exemplar de rã-touro (*L. catesbeianus*), para as análises imunológicas.....70

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

- TABELA 1. Teores medianos de corticosterona (ng/mL) nos tratamentos com as rãs-touro alimentadas com diferentes níveis de vitamina C, durante o período experimental.....21
- TABELA 2. Médias e erro padrão, entre todos os tratamentos, dos parâmetros hematológicos de rãs-touro alimentadas com diferentes níveis de vitamina C, durante o período experimental.....23
- TABELA 3. Médias e erro padrão dos números absolutos de leucócitos entre todos os tratamentos, dos parâmetros hematológicos de rãs-touro alimentadas com diferentes níveis de vitamina C, durante o período experimental.....25

### Capítulo 2

- TABELA 1. Análises químicas e bromatológicas das rações experimentais após o processo de extrusão.....43
- TABELA 2. Valores médios e desvio padrão de ganho de peso total, valores médios de peso inicial, peso final, consumo de ração e conversão alimentar de rãs-touro obtidos durante o experimento com vitamina C.....46
- TABELA 3. Valores médios de consumo de ração por animal (CR/A) por período obtido durante o experimento com vitamina C.....47
- TABELA 4. Valores médios de conversão alimentar (CA) por período obtido durante o experimento com vitamina C.....49
- TABELA 5. Mortalidade e canibalismo por período observados durante o experimento com vitamina C .....50

## RESUMO GERAL

O experimento foi realizado na ranicultura da Fazenda Marta, localizada no município de Tremembé no Estado de São Paulo, Brasil. O objetivo foi avaliar a influência da vitamina C como aditivo alimentar sobre o desempenho produtivo e fisiológico de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*). Os animais foram mantidos em 24 baias de 2,0 x 1,0 m com uma densidade inicial de 50/m<sup>2</sup>. Foram testados os seguintes níveis de suplementação na ração: 0, 250, 500, 750, 1.000 e 2.000 mg de vitamina C/kg de ração. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro réplicas. Os parâmetros avaliados foram: consumo de ração, determinação do ganho de peso médio, conversão alimentar, sobrevivência, determinação dos valores de corticosterona plasmática, parâmetros hematológicos (taxa de hemoglobina, hematócrito, número total de eritrócitos e de leucócitos) e avaliação imunológica através da ativação de macrófagos. Os animais foram pesados no início do experimento e a cada 30 dias e diariamente registrou-se a temperatura ambiente. Pode-se concluir que não houve influência da vitamina C sobre o desempenho produtivo (crescimento, sobrevivência e conversão alimentar) e também sobre a diminuição dos níveis de estresse monitorados pela corticosterona plasmática, parâmetros hematológicos e imunológicos avaliados. Observou-se diminuição dos teores de corticosterona plasmática ao longo do período de experimentação, sugerindo que há uma dependência deste glicocorticóide com o estágio de desenvolvimento dos animais ou uma possível adaptação à situação de cativeiro após a metamorfose.

Palavras-chave: ácido ascórbico, anfíbios, antioxidante, corticosterona, hormônios, ranicultura

## GENERAL ABSTRACT

The experiment was conducted in the frogculture at Fazenda Marta, placed in Tremembé city, São Paulo, Brazil. The aim was to evaluate the influence of vitamin C as a nutritional additive on the productive and physiological performance of american bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). The animals were kept in 24 boxes of 2.0 x 1.0 m with a initial density of 50 animals / m<sup>2</sup>. It was tested the following levels of supplementation on diet: control, 250, 500, 750, 1,000 and 2,000 mg of vitamin C per kg of diet. The experimental design was completely randomized with six treatments and four repetitions. The parameters evaluated were: feed intake, weight gain, feed conversion, survival cote, determining the values of plasma corticosterone, hematological parameter (hemoglobin rate, hematocrit, total number of eritrocytes and leucocytes) and immunological evaluation through macrophagos activation. The animals were weighed at the beginning of the experiment and every 30 days, and the environmental temperature was also daily recorded. It was concluded that there was no influence of vitamin C on productive performance (growth, survival and feed conversion) and to decreased levels of stress, monitored by plasma corticosterone, hematological and immunological parameter evaluated. It was observed a decreasing of plasma corticosterone value during the experimental period, it suggests that there is a glucocorticoid dependency with the animals life cycle or a possible adaptation to a captivity situation after metamorphosis.

Key words: ascorbic acid, amphibians, antioxidant, corticosterone, hormone, frog culture

# Introdução Geral

## INTRODUÇÃO GERAL

A ranicultura desperta grande interesse junto aos produtores em virtude do elevado potencial reprodutivo das espécies de cultivo, da eficiência da conversão alimentar dos animais e do retorno financeiro com a venda da carne e outros subprodutos para o mercado interno e externo. Suas características zootécnicas e a alta qualidade de sua carne (baixa quantidade de gordura e boa digestibilidade) fazem da rã um produto de grande interesse para a indústria de processamento com boa aceitação pelo mercado consumidor (TEIXEIRA *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2009).

Os primeiros exemplares de rã-touro americana, recentemente reclassificada como *Lithobates catesbeianus* (FROST *et al.*, 2006) chegaram ao Brasil na década de 30, oriundos do Canadá. Até a década de 70 utilizava-se tanques múltiplos, com diversos tipos de alimentos como tecido pulmonar bovino e restos de carcaças em decomposição para a atração de insetos e desenvolvimento de suas larvas. Sucedeu-se a essa estrutura os sistemas de engorda conhecidos como tanque-ilha; confinamento; anfigranja; gaiolas; ranabox; inundado e sistemas híbridos construídos ou não sob estufas agrícolas (FERREIRA *et al.*, 2002).

TEIXEIRA *et al.* (2001) afirmam que fora do país a maior parte da carne de rã comercializada é ainda proveniente de caça predatória. Desta forma, os estoques naturais tendem a baixar devido a uma demanda sempre crescente. Atualmente leis proíbem a caça predatória, o que incentiva o consumo de carne de rãs criadas em cativeiro. A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), é atualmente a única espécie utilizada pelos ranários comerciais brasileiros, apresenta ótima capacidade de adaptar-se aos diferentes regimes climáticos, bem como aos diferentes manejos físicos e alimentares. Este fato deve-se as suas características zootécnicas tais como: rusticidade, precocidade e prolificidade (FERREIRA *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2009).

Um dos principais desafios da criação de rãs em ranários comerciais é eliminar os fatores estressantes (canibalismo, presença de predadores, competição

por alimento e espaço), que tanto na natureza como no cativeiro retardam o crescimento do animal, que por sua vez poderia direcionar toda sua energia para a engorda e/ou a reprodução, através de manejo e instalações adequadas e uso de alimento balanceado e nutritivo (ROCHA, 2007; TEIXEIRA, 2007).

Na natureza, os anuros alimentam-se principalmente de insetos, crustáceos, vermes, moluscos e outros pequenos invertebrados. No passado, nas primeiras criações em cativeiro, restos de animais em decomposição, bem como minhocas, ovos, alevinos e camarões, foram muito utilizados (FERREIRA *et al.*, 2002). Atualmente, a alimentação em cativeiro é feita com ração peletizada ou extrusada para rãs e juvenis (i.e. imagos), com a utilização de cochos vibratórios ou indutores biológicos, e farelada para girinos. Geralmente apresentam teores de proteína bruta próximos a 40%. As rações comerciais utilizadas em ranicultura são formuladas e balanceadas para atender as exigências nutricionais de peixes, pois não se dispõe de informações suficientes sobre as necessidades nutricionais desses animais (STÉFANI *et al.*, 2001; SEIXAS FILHO *et al.*, 2008), além do número reduzido de projetos comerciais.

Para o balanceamento de uma dieta é necessário conhecer não apenas a digestibilidade do alimento, mas de outros aditivos e procedimentos que possam oferecer aos organismos criados intensivamente condições adequadas de manejo alimentar. A partir de nova regulamentação do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), a Instrução Normativa nº 13 de 30/11/04, segundo orientações do *Codex Alimentarius*, os aditivos passaram a ser classificados como: aditivos nutricionais (os quais incluem as vitaminas), aditivos tecnológicos (adsorventes e aglomerantes e emulsificantes), aditivos sensoriais (corantes e aromatizantes), aditivos zootécnicos (enzimas, probióticos e promotores de crescimento), e anticoccidianos (sulfas e ionóforos).

Vitaminas são substâncias orgânicas naturais indispensáveis para as funções vitais em humanos e animais, essenciais para o crescimento, saúde e desempenho. Podem ser disponibilizadas na dieta uma vez que os animais não são capazes de sintetizá-las em quantidades suficientes. As vitaminas estão

disponíveis em 2 grandes grupos: lipossolúveis (A, D, E, K3) e hidrossolúveis (complexo B, vitamina C e outras). A falta deste aditivo alimentar pode acarretar em retardo no crescimento, comprometimento da fertilidade e baixa resistência imunológica. Níveis além das exigências nutricionais mínimas podem trazer benefícios potenciais (SINDIRAÇÕES, 2005).

As vitaminas utilizadas nas dietas dos animais são produzidas industrialmente por processos químicos ou fermentação microbológica. São suscetíveis a vários fatores aos quais são expostas durante a produção como umidade, temperatura, luz. Entretanto, podem ser produzidas estabilizadas ou protegidas garantindo a sua atividade biológica. Os requerimentos de vitaminas variam de espécie para espécie, dependendo da idade e da fase de produção, garantindo as necessidades diárias (KUBITZA, 2004; SINDIRAÇÕES, 2005).

Dentre os aditivos a vitamina C ou ácido ascórbico destaca-se como componente essencial para algumas espécies, como primatas, porcos da Índia, peixes, camarões, morcegos, pássaros e alguns insetos, devido à falta ou insuficiência da enzima L-gulonolactona oxidase (O'KEEFE, 2001). Nos peixes, anfíbios e répteis o ácido ascórbico quando produzido ocorre nos rins. As espécies endotérmicas, como aves e mamíferos, sintetizam a vitamina no fígado, órgão mais amplo e com capacidade de atender a demanda maior devido à mudança dos mecanismos de regulação da temperatura (STONE, 1997).

A maioria dos peixes não sintetiza a vitamina C, necessitando de suplementação na dieta. Esta vitamina previne os efeitos negativos do estresse, promove melhoras na cicatrização de feridas, minimiza a toxicidade de contaminantes da água e incrementa o sistema imunológico na defesa contra doenças infecciosas e parasitárias. Apresenta capacidade de influenciar positivamente a imunidade e resistência de organismos aquáticos quando suplementada em excesso na dieta, tipicamente 10 a 100 vezes a exigência mínima (MCDOWELL, 1989; ROTTA, 2003; BORBA *et al.*, 2007).

O ácido ascórbico desempenha importante papel em muitas reações bioquímicas, com função relacionada a características de oxidação e redução

reversível (antioxidante). Participa da biossíntese do colágeno é importante também para a formação óssea, cicatrização e manutenção do tecido conectivo. Mantém os metais ferro e cobre na forma reduzida, favorecendo a absorção gástrica. Atua também como agente redutor na desintoxicação do fígado contra contaminantes dietéticos como metais pesados e pesticidas organoclorados, além de participar também nas hidroxilações na biossíntese de carnitina e hidroxilação da tirosina na formação de catecolaminas. Sua deficiência implica em um incremento na suscetibilidade de infecções, hemorragia espontânea de mucosas e membranas, redução na absorção de ferro, deformações ósseas e aumento do estresse (MCDOWELL, 1989; ROTTA, 2003; BORBA *et al.*, 2007).

Estresse é o estado produzido por fatores, ambientais ou não, que provocam respostas adaptativas no animal frente a uma alteração da função normal. Representa uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo animal, a homeostase, é ameaçado ou perturbado por ações de estímulos intrínsecos e extrínsecos (MOBERG, 2000).

Segundo WENDELAAR BONGA (1997) a resposta ao estresse ocorre em 3 etapas, com a participação dos sistemas nervoso (nervos simpáticos e células cromafins) e endócrino (hipotálamo – hipófise – células interrenais). Na primeira etapa ocorre a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticóides, como resposta ao estímulo cerebral. A liberação destes hormônios causa constrição da musculatura lisa vascular e esplênica, com desvio de leucócitos para o compartimento circulante. Observa-se nesta etapa a diminuição do número de leucócitos totais com neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitose (BIONDO, 2005). A diminuição do hematócrito também ocorre em animais submetidos ao estresse (CHEN *et al.*, 1995). Observa-se adicionalmente prejuízo nas funções fagocitárias das células. A terceira etapa caracteriza-se pela diminuição de resistência e desempenho, com a exaustão dos animais (GOMES *et al.*, 2003).

Em anfíbios o principal glicocorticóide envolvido na resposta ao estresse é a corticosterona (DENVER *et al.*, 2002). Os glicocorticóides influenciam ações comportamentais ligadas à reprodução, ingestão de alimento, atividade locomotora e processos de fuga e luta (CRESPI & DENVER, 2004, 2005; WADA, 2008). Ao

mesmo tempo o excesso de glicorticóides diminui o crescimento, a função imune e pode causar morte neural e altas taxas de mortalidade (WADA, 2008).

Esse padrão de resposta é observado com freqüência em criações de varias espécies animais incluindo criações de rãs onde observamos empilhamento nos cantos das baias, excesso de peles soltas e maior susceptibilidade a doenças. Na ranicultura o estresse é um dos grandes problemas sendo a porta de entrada para muitas doenças ocasionando assim o insucesso da criação. Pode ser causado por fatores como: sistemas de criação não apropriados, manejos físicos, profiláticos, sanitários e alimentares inadequados, mudanças na temperatura ou na luminosidade do ambiente, alterações nos parâmetros físicos e químicos da água, bem como ruídos, presença de outros animais ou pessoas (ROCHA 2007; TEIXEIRA, 2007).

Estes estressores impõem um metabolismo composto por dois componentes: a demanda de energia requerida frente ao distúrbio, e a energia para corrigir o balanço iônico (CARNEIRO *et al.*, 2002). Torna-se necessário portanto, a execução de práticas preventivas apoiadas nos três manejos básicos: o zootécnico, o nutricional e o higiênico sanitário, constituindo o “princípio do tripé”. Somente a total integridade dos três garante a perfeita qualidade da produção animal. Possíveis falhas nestes manejos levam ao desequilíbrio, comprometendo a saúde das rãs e, conseqüentemente, ocasionando perdas (HIPOLITO, 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da vitamina C como aditivo alimentar e fator antiestresse sobre o desempenho produtivo (crescimento, sobrevivência e conversão alimentar) e fisiológico de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), através da avaliação do consumo de ração, determinação do ganho de peso médio, conversão alimentar, sobrevivência, determinação dos valores de corticosterona plasmática, parâmetros hematológicos (taxa de hemoglobina, hematócrito, número total de eritrócitos e números total de leucócitos) e avaliação imunológica através da ativação de macrófagos.

Esta dissertação encontra-se dividida em capítulos representados por artigos científicos que serão submetidos ao periódico *Aquaculture* (classificação A2 - CAPES). O capítulo I é intitulado: “Avaliação fisiológica da suplementação de níveis crescentes de vitamina C como fator antiestresse à dieta de rãs-touro americana (*Lithobates catesbeianus*), criadas comercialmente”, e capítulo II é intitulado: “Desempenho produtivo de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) alimentadas com níveis crescentes de vitamina C à dieta”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONDO, A.W. 2005 Interpretação do leucograma. In: II SIMPOSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2, Porto Alegre, 2005. *Anais...*:Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 29-35.

BORBA, M.R.; FRACALLOSSI, D.M.; ALMEIDA, F. 2007 Efeito da suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* ao *Ichthyophthirius multifiliis*. *Acta Scientiarum Animal Science*, 29(1): 93-99.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. 2002 Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquaculture*, 10: 221-229.

CRESPI, E.J.; DENVER, R.J. 2004 Ontogeny of corticotropin-releasing factor on locomotion and foraging in the western spadefoot toad, *Spea hammondi*. *Hormone Behavior*, 46: 399–410.

CRESPI, E.J.; DENVER, R.J. 2005 Roles of stress hormones in food intake regulation throughout the life cycle of anuran amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141(4): 381-390.

CHEN, G.R.; SUN, L.T.; LEE, Y.H.; CHANG, C.F. 1995 Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. *Journal of Applied Aquaculture*, 5: 21-31.

DENVER, R.J.; BOORSE, G.C.; GLENNEMEIER, K.A. 2002 Endocrinology of complex life cycles: amphibians. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Moss R, Rubin R. (Eds) *Hormones, brain and behavior*, vol. 2. Academic Press, San Diego, pp. 469–51.

DIAS, D.C.; STEFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANCA, F.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SANTOS, A.A. 2009 Haematological and immunological

parâmetros of bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, fed with probiotics. *Aquaculture Research*, 1-8. DOI:10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x

FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, 33: 1-15.

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; SA, R.O.; CHANNING, A.O.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER, W.C. 2006 The amphibian tree of life. *Bulletim of American Museum of Natural History*, 297: 1–370.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C. 2003 Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte do tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(2): 283-290.

HIPOLITO, M. 1999 Prevenção, diagnóstico e tratamento de enfermidades. *Revista Brasileira de Agropecuária*, 1(3): 62-69.

KUBITZA, F. 2004 *Nutrição e Alimentação dos Peixes Cultivados*. Jundiaí, 83p.

MCDOWELL, L.R. 1989 *Vitamins in animal nutrition*, San Diego: Academic Press, 486p.

MOBERG, G.P. 2000 Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA (eds) *The biology of animal stress: basic principals and implications for animal welfare*. CABI Publishing, pp. 1-22.

O'KEEFE, T. 2001 Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds. *ASA Technical Bulletin*, 48: 1-9.

ROCHA, G.C. 2007 Avaliação da resposta fisiológica de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) submetidos aos mecanismos estressores de captura, hipóxia e transporte. São Paulo. 80p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesca.

ROTTA, M.A. 2003 Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes. Corumbá: Embrapa Pantanal, 54p.

SEIXAS FILHO, J.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; MOURA, G.S.; GARCIA, S.L.R.; LANNA, E.T.A.; SILVA, L.N. 2008 Desempenho e atividades enzimáticas em girinos de rã-touro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(11): 1617-1624.

SINDIRAÇÕES 2005 Guia de Aditivos - Ácidos Orgânicos, Aminoácidos, Enzimas, Microminerais, Vitaminas. Sindirações eds. 45p.

STÉFANI, M.V.; MARCANTONIO, A.S.; MARTINS, M.L. 2001 Suplementação com vitamina C e E sobre o desenvolvimento e sobrevivência de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Ciência Rural*, 31(5): 869-871.

STONE, I. 1997 Vitamin C against disease: from fishes to mammals. *Megascorbate Therapies: Vitamin C in Medicine (The Vitamin C Foundation)*, 1(1): 2.

TEIXEIRA, R.D.; PEREIRA MELLO, S.D.R.; LIMA DOS SANTOS, C.A.M. 2001 *The world market for frog legs. FAO/GLOBEFISH*, 68: 1-44.

TEIXEIRA, P.C. 2007 Perfil de cortisol, glicemia e de parâmetros sanguíneos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em diferentes densidades e após exposição aérea. São Paulo. 86p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP.

WADA, H. 2008 Glucocorticoids: mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and Comparative Endocrinology*, 156(3):441-453.

WENDELAAR BONGA, SE (1997) The stress response in fish. *Physiology Reviews*, 77:591-625.

# Capítulo I

---

## **Avaliação de estresse em rãs-touro**

### **Avaliação fisiológica da suplementação de níveis crescentes de vitamina C como fator antiestresse à dieta de rãs-touro americana (*Lithobates catesbeianus*) criadas comercialmente**

KNOOP, R.<sup>1</sup>; HIPÓLITO, M. <sup>5</sup>; DIAS, D.C.<sup>3</sup>; FRANÇA, F.M<sup>1</sup>.; ANTONUCCI, A.M.<sup>1</sup>; TEIXEIRA, P.C.<sup>3</sup> ; FURTADO, P.V. <sup>4</sup>; OLIVEIRA, C.A.<sup>4</sup>; FERREIRA, C.M.<sup>2</sup>

1-Pós-graduação – Instituto de Pesca, APTA-SAA. Av. Francisco Matarazzo, 455, CEP. 05001-900, São Paulo, SP, Brasil, rainer.knoop@bunge.com

2-Pesquisador Científico – Instituto de Pesca, APTA-SAA, SP, Brasil

3-Pós-graduação - CAUNESP - Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

4-Laboratório de Dosagens Hormonais – Fac. Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, Brasil

5-Pesquisador Científico – Instituto Biológico, APTA-SAA, SP, Brasil

#### **RESUMO**

O experimento foi realizado com rãs-touro americana (*Lithobates catesbeianus*), em ranário comercial, no município de Tremembé, São Paulo – Brasil - UTM: 7.466,5 N e 436,9 E. Objetivou-se avaliar a influência da vitamina C como aditivo alimentar e fator antiestresse sobre o parâmetros fisiológicos. As rãs foram mantidas em 24 tanques de alvenaria, de 2,0 x 1,0 m com uma densidade inicial de 50/m<sup>2</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis

tratamentos (níveis de suplementação na ração de 0, 250, 500, 750, 1.000 e 2.000 mg de vitamina C kg<sup>-1</sup> de ração) e quatro réplicas. Foram determinados valores de corticosterona plasmática, parâmetros hematológicos e imunológicos. Os animais eram pesados no início do experimento e a cada 30 dias. Diariamente registrou-se as temperaturas mínimas e máximas às 06:00h. Pode-se concluir que não houve influência da vitamina C sobre os parâmetros fisiológicos monitorados pelos valores de corticosterona plasmática, parâmetros hematológicos e imunológicos. Entretanto, houve diminuição da corticosterona plasmáticas ao longo do período de experimentação. Esta diminuição possivelmente ocorreu devido a uma estreita relação deste glicocorticóide com o estágio de desenvolvimento dos animais ou em virtude de uma possível adaptação ao cativeiro.

Palavras-chave: anfíbios, antioxidantes, corticosterona, estresse, fisiologia, ranicultura,

#### ABSTRACT

The experiment was conducted with american bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) at a commercial frog culture, in Tremembé city, São Paulo State, Brazil - UTM: 7.466,5 N e 436,9 E. The aim was to evaluated the vitamin C influence as a nutritional additive and anti-stress factor on the physiological performance of these animals. The frogs were kept in 24 masonry boxes (2.0 x 1.0 m) with an initial density of 50 animals per square meter. The experimental design was completely randomized with six treatments (0, 250, 500, 750, 1,000 and 2,000 mg vitamin C kg<sup>-1</sup> diet) and four repetitions. It were determined the values of weight gain, survival taxe, plasma corticosterone, hematological and

immunological values. The animals were weighed at the beginning of the experiment and every 30 days. The environmental temperature was recorded daily. It could be concluded that there was no influence of vitamin C in decreasing levels of stress, monitored by plasma corticosterone, hematological and immunological values. The decreases of plasma corticosterone levels possibly happened because of a narrow relation of this glucocorticoid with the animals life cycle, or there is possible adaptation to the captivity.

Keywords: amphibians, anti-oxidants, corticosterona, stress, physiology, frog culture.

## **INTRODUÇÃO**

A rã-touro americana, recentemente re-classificada como *Lithobates catesbeianus* (Frost et al. 2006), única espécie utilizada pelos ranários comerciais brasileiros, apresenta ótima capacidade de adaptar-se aos diferentes regimes climáticos, bem como aos diferentes manejos físicos e alimentares utilizados nos sistemas intensivos de criação (Ferreira et al. 2002).

Até meados da década de 90 a maior parte da carne de rã comercializada era proveniente de caça predatória. Em virtude disto, os estoques naturais diminuíram devido a uma demanda crescente. Atualmente leis proíbem a caça, incentivando o consumo de carne de rãs criadas em cativeiro (Ferreira et al. 2002). Dias et al. (2009) afirmam que as raniculturas ganharam grande popularidade no Brasil, colocando este país como o maior produtor das Américas, com a produção de 639 toneladas no ano de 2006.

Na ranicultura o estresse é um dos grandes entraves sendo a porta de entrada para doenças, ocasionando assim, o insucesso da atividade. Pode ser causado por

fatores como sistemas de criação não apropriados; manejos físicos, profiláticos, sanitários e alimentares inadequados; mudanças na temperatura ou na luminosidade do ambiente; alterações nos parâmetros físicos e químicos da água; bem como ruídos, presença de outros animais ou pessoas e outras situações (Rocha 2007; Teixeira 2007).

Segundo Wendelaar Bonga (1997) a resposta ao estresse ocorre em três etapas, com a participação dos sistemas nervoso (nervos simpáticos e células cromafins) e endócrino (hipotálamo – hipófise – células interrenais). Inicialmente, ocorre a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticóides, como resposta ao estímulo cerebral. A liberação destes hormônios causa constrição da musculatura lisa vascular e esplênica, com desvio de leucócitos para o compartimento circulante. Observa-se, ainda, a diminuição do número de leucócitos totais com neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitose (Biondo 2005). A diminuição dos valores do hematócrito também ocorre em animais submetidos ao estresse (Chen et al. 1995) e adicionalmente ocorre prejuízo nas funções fagocitárias das células. A etapa final caracteriza-se pela diminuição de resistência e desempenho, com a exaustão dos animais (Gomes et al. 2003).

Em anfíbios o principal glicocorticóide envolvido na resposta ao estresse é a corticosterona (GC) (Denver et al. 2002). Os glicocorticóides influenciam ações comportamentais ligadas à reprodução (Wilczynski et al. 2005), ingestão de alimento (Crespi e Denver 2005), atividade locomotora (Crespi e Denver 2004b) e processos de fuga e luta (Wada 2008). Ao mesmo tempo o excesso de glicocorticóides retarda o crescimento, diminui a função imune e pode causar morte neural além de altas taxas de mortalidade (Wada 2008). Esse padrão de resposta é observado com frequência em criações de várias espécies animais incluindo rãs onde se pode observar

empilhamento nos cantos das baias, excesso de peles soltas e maior susceptibilidade a doenças (Rocha 2007; Teixeira 2007).

Estes estressores impõem aos organismos um metabolismo composto por dois componentes: a demanda de energia exigida frente ao distúrbio, e a energia para corrigir o balanço iônico (Carneiro e Urbinati 2002), sendo que a GC afeta o balanço energético e a ingestão dos alimentos nos diferentes estágios de vida nos anfíbios (Crespi e Denver 2005).

Sabe-se que na criação de rãs deve-se eliminar os fatores estressantes que podem retardar o crescimento, como as competições por alimento e espaço, além da não presença de predadores, contrariamente ao que existe na natureza. Desse modo, na criação, pode-se direcionar a energia do animal, por meio de manejos adequados e uso de alimento balanceado e nutritivo para o crescimento e reprodução (Ferreira et al. 2002).

A vitamina C ou ácido ascórbico desempenha importante papel em muitas reações bioquímicas. Seu principal papel biológico é como agente redutor, participando como co-fator nas oxidações e promovendo a incorporação do oxigênio molecular em vários substratos. Atua nas hidroxilações de lisina e prolina no protocógeno através da redução do ferro para a forma ferrosa que atua como co-fator da enzima hidroxilase. Participa, portanto, na manutenção do tecido conectivo, na cicatrização e formação dos ossos (Kaneko et al. 1997). O ácido ascórbico é rapidamente absorvido nas áreas de formação do colágeno, ou seja, pele e cartilagens. Atua como agente redutor na desintoxicação do fígado contra contaminantes dietéticos como metais pesados e pesticidas organoclorados, além de participar também nas hidroxilações e na biossíntese de carnitina e hidroxilação da tirosina para a

formação de catecolaminas. Mantém os metais ferro e cobre na forma reduzida, favorecendo a absorção gástrica (Mcdowell 1989; Rotta 2003; Borba et al. 2007). Desta forma, previne os efeitos negativos do estresse e incrementa o sistema imunológico na defesa contra doenças infecciosas e parasitárias. Em peixes a deficiência de vitamina C, geralmente apresenta sinais clínicos como escoliose, cifose, lordose, lesões nos tecidos conectivos, deformações, estresse metabólico, letargia, fadiga, queda de resistência e aumento de mortalidade (Tacon 1995).

Algumas espécies animais, como primatas, porcos da Índia, alguns répteis e pássaros e muitas espécies de peixes necessitam de uma fonte dietética de vitamina C para prevenir ou reverter os sintomas do escorbuto (O'Keefe 2001).

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da vitamina C adicionada à dieta de rãs-touro americana (*Lithobates catesbeianus*) como fator antiestresse, por meio da avaliação dos níveis de corticosterona plasmática, bem como parâmetros hematológicos e imunológicos através da ativação de macrófagos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido na Fazenda Marta, localizada no município de Tremembé, São Paulo – Brasil - UTM: 7.466,5 N e 436,9 E, conduzido durante 120 dias, no período de fevereiro a junho, que compreendem o final do verão e o outono, no hemisfério Sul.

Foram utilizados 2.400 rãs (*Lithobates catesbeianus*) com peso médio inicial de  $13,77g \pm 0,72$ , distribuídas ao acaso em quantidades iguais para cada

tratamento em tanques de alvenaria, medindo 2,00 x 1,00 m, contendo uma área seca (70%) e uma área úmida (30%), dispostas sob uma tela de sombrite de 50% e película de polietileno transparente de 150  $\mu\text{m}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, sendo um controle e quatro repetições. Os animais foram pesados no início do experimento (Momento Zero - MZ) e a cada 30 dias. Os níveis de concentração de vitamina C testados foram: Tratamento 1/Controle - 0  $\text{mg kg}^{-1}$  de ração; Tratamento 2 - 250  $\text{mg kg}^{-1}$  de ração; Tratamento 3 - 500  $\text{mg kg}^{-1}$  de ração; Tratamento 4 - 750  $\text{mg kg}^{-1}$  de ração; Tratamento 5 - 1.000  $\text{mg kg}^{-1}$  de ração e Tratamento 6 - 2.000  $\text{mg kg}^{-1}$  de ração.

A ração farelada utilizada foi fornecida por uma empresa privada do setor, contendo 40% de proteína bruta (mín.), 8% de extrato etéreo (mín.) e 6% de matéria fibrosa (máx.). A este produto adicionou-se vitamina C à base de sal monofosfato éster de ácido L-ascórbico (ROVIMIX<sup>®</sup> STAY-C<sup>®</sup> 35 da Empresa DSM Nutritional Products), nos níveis pré-estabelecidos antes do processo de extrusão. O alimento foi ministrado duas vezes ao dia (07:00h e 16:00h), sendo oferecido 3% da biomassa do lote com reajustes diários conforme o consumo, para que houvesse o mínimo de sobras. Na ração foi acrescido, ainda um indutor biológico (larva de mosca doméstica), na proporção de 10% de larvas para 90% de ração.

A densidade inicial foi de 50 rãs por metro quadrado e as temperaturas mínimas e máximas foram registradas diariamente às 06:00h.

Foram avaliados o ganho de peso e a sobrevivência dos animais, através da pesagem total dos mesmos a cada biometria, e controle da mortalidade e canibalismo.

Para as avaliações fisiológicas de corticosterona plasmática (GC) e dos parâmetros hematológicos, foram coletadas, aleatoriamente, amostras sanguíneas de 24 rãs antes da experimentação (MZ) e, de oito animais por tratamento, totalizando 48 exemplares a cada biometria. As amostras foram obtidas a partir da punção do vaso do membro posterior esquerdo após anestesia local com pomada de lidocaína, e posteriormente centrifugadas.

Para dosagem da GC foi utilizada a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase líquida, de duplo anticorpo, por meio do conjunto diagnóstico comercial (MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY, USA). Este conjunto diagnóstico utiliza como elemento traçador o hormônio marcado com  $^{125}\text{I}$  e apresenta pouca reação cruzada, com outros hormônios de acordo com o fabricante. As análises e a validação laboratorial foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

A avaliação hematológica foi realizada por meio da determinação dos valores de hematócrito (Ht), contagem total de eritrócitos (Er) em câmara de Neubauer, taxa de hemoglobina (Hb), índices hematimétricos absolutos, como volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem total de leucócitos (CTL) (Allender e Fry 2008), a cada biometria.

Para as análises imunológicas foram coletados oito animais no início (MZ) e 36 animais no final do experimento (seis animais por tratamento). As rãs foram inoculadas com 2mL de solução de levedura (*Sacharomyces cerevisiae*) na cavidade abdominal, com concentração aproximada de  $11.000 \text{ cel/mm}^3$  por um período de duas horas. Após o período de incubação, os animais foram

anestesiados por banho, em solução de benzocaína (1g de benzocaína/L de água) e sacrificados. Em seguida, foi feita lavagem da cavidade abdominal com solução de Ringer para anfíbios, através de corte lateral do abdome. O material foi centrifugado a 251 x *g* por cinco minutos, sendo coletado o precipitado, ressuspendido e colocado entre lâmina e lamínula e contado o número de fagócitos ativos e o número total de células de leveduras fagocitadas. A capacidade fagocítica (CF) foi calculada pelo do número de fagócitos fagocitando/100 fagócitos, e o índice fagocítico (IF) através do número total de leveduras fagocitadas/número de fagócitos fagocitando (Silva et al. 2002; 2005; Dias et al. 2009).

Para verificar a normalidade e homocedasticidade dos dados foram aplicados os testes de Shapiro-Wilks e Bartlett. Para a avaliação das diferenças das médias de ganho de peso aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Para determinar as diferenças das médias entre os tratamentos e entre os períodos de cada biometria utilizou-se para GC e sobrevivência o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman-Keuls. Para os valores sanguíneos transformou-se os dados pela raiz ( $x$ ) e aplicou-se ANOVA seguida do teste de Tukey. Para o imunológico aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (Zar 1999).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Durante os quatro meses experimentais as temperaturas mínimas médias variaram de 22°C ± 4,63; 20°C ± 2,46; 14°C ± 3,11 e 14°C ± 2,50 respectivamente. A temperatura média foi de 23,6°C.

O valor médio dos pesos obtido ao longo da experimentação foi de 80,86g ± 1,60 e a sobrevivência final média observada foi de 75,97%. Todos os parâmetros de desempenho analisados não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Os valores das análises de GC mostraram através do teste de Kruskal-Wallis que não houve diferenças significativas entre os tratamentos nas biometrias (Tabela 1), porém, houve diferenças entre as biometrias ( $p < 0,05$ ), com redução dos teores de GC ao longo do período (Figura 1). A sensibilidade do ensaio foi de 1,76 ng/mL, sendo que os coeficientes de variação intra-ensaio baixo e alto foram respectivamente, 5,12% e 1,71%; e os valores interensaio baixo e alto foram respectivamente 2,80% e 0,01%.

Tabela 1 – Teores medianos de corticosterona (ng/mL) nos tratamentos com as rãs-touro alimentadas com diferentes níveis de vitamina C, durante o período experimental (n=141)

Tratamento	Momento Zero	30 dias	90 dias	120 dias
T1 - 0 mg*		2.538,40	1618,15	156,23
T2 - 250 mg*		2.639,70	1706,35	533,23
T3 - 500 mg*		2.419,50	1125,15	438,42
T4 - 750 mg*	2.011,00	2.462,25	1113,30	343,68
T5 - 1000 mg*		1.965,00	1309,50	886,04
T6 - 2000 mg*		2.233,60	1687,90	424,67

\*vitamina C kg<sup>-1</sup> de ração

Em geral, nos anfíbios, os níveis inicialmente baixos dos valores de GC aumentam durante o processo de metamorfose (Denver et al. 2002; Glennemeier e Denver 2002a; Wada 2008). No presente trabalho, os valores médios de GC encontrados reduziram de 2364,99 ± 390,90 ng/mL no MZ para 567,48 ± 65,92 ng/mL aos 112 dias de experimentação (Figura 1).

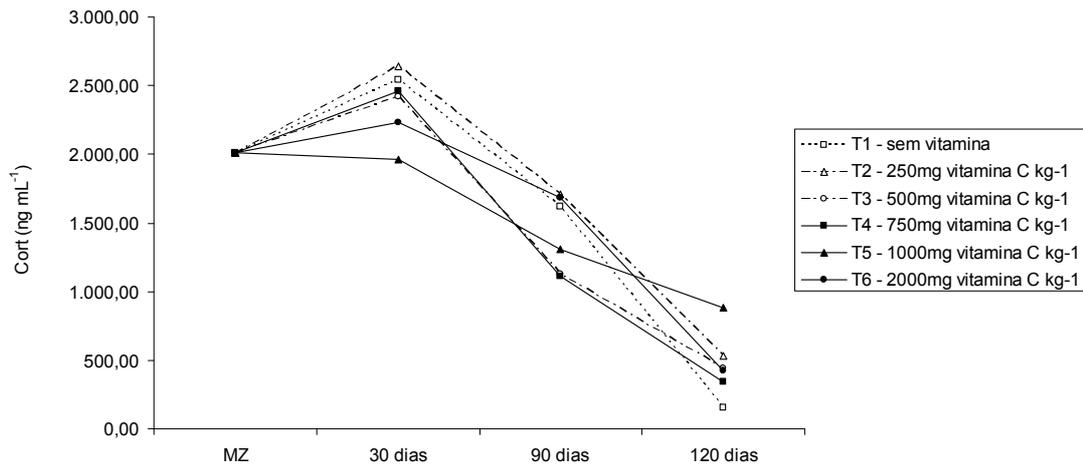


Figura 1 - Teores medianos de corticosterona (ng/mL) nos diferentes tratamentos com vitamina C, durante o período experimental (n = 141). MZ = Momento Zero

Os anfíbios podem apresentar elevação dos valores de GC em condições de confinamento, manipulação, competição intra-específica e privação alimentar, no entanto essa resposta depende do tipo de desafio e da idade dos animais (Belden et al. 2003; Crespi e Denver 2005; Glennemeier e Denver 2002a; 2002b). Crespi e Denver (2005) trabalhando com imagos de sapo (*Spea hammondi*) encontraram redução dos valores de GC plasmática quando submetidos à privação de alimentos, entretanto, observaram aumento desses valores girinos nas fases pré e pró-metamórficas, com magnitude significativamente superior na fase pré-metamórfica. Foram encontradas concentrações de GC plasmática relativamente constantes em imagos de *Xenopus laevis*, submetidos à privação alimentar por 31 dias (Crespi e Denver 2004a). Kloas et al. (1997) citaram que os valores de GC são indetectáveis nos primeiros estágios de vida de *X. laevis*, e os teores de GC atingem o pico na fase de pré-metamorfose.

Comprovadamente os valores de glicocorticóides em anfíbios apresentam padrões específicos para espécies distintas dentro da mesma ordem filogenética (Crespi e Denver 2004a; Crespi e Denver 2005).

No presente estudo, as diminuições dos níveis de corticosterona possivelmente ocorreram devido a uma estreita relação deste glicocorticóide com o estágio de desenvolvimento dos animais, ou há uma possível adaptação ao cativeiro.

As análises dos parâmetros hematológicos por período encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias e erro padrão, entre todos os tratamentos, dos parâmetros hematológicos de rãs-touro alimentadas com diferentes níveis de vitamina C, durante o período experimental (n=216)

Parâmetro	MZ	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Ht	19,82±1,28 <sup>a</sup>	18,77±0,51 <sup>a</sup>	23,55±0,77 <sup>b</sup>	28,91±0,85 <sup>c</sup>	27,16±0,54 <sup>c</sup>
Hb	5,34±0,28 <sup>a</sup>	5,61±0,18 <sup>a</sup>	13,92±0,42 <sup>c</sup>	7,85±0,25 <sup>b</sup>	7,70±0,27 <sup>b</sup>
Er	37,06±1,90 <sup>a</sup>	31,87±1,21 <sup>a</sup>	35,18±1,16 <sup>a</sup>	33,98±1,06 <sup>a</sup>	35,38±1,28 <sup>a</sup>
VCM	541,48±33,29 <sup>a</sup>	618,21±24,17 <sup>ab</sup>	687,87±24,45 <sup>b</sup>	874,14±27,65 <sup>c</sup>	802,75±26,36 <sup>c</sup>
CHCM	28,33±2,14 <sup>a</sup>	30,00±0,62 <sup>a</sup>	59,58±0,80 <sup>b</sup>	27,65±0,86 <sup>a</sup>	28,41±0,92 <sup>a</sup>

Ht = hematócrito (%), Hb = taxa de hemoglobina (g/100 mL), Er = número de eritrócitos ( $10^4 \text{ mm}^{-3}$ ), VCM = volume corpuscular médio (fL), CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%), MZ = Momento Zero. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Apesar do aumento dos valores de hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e volume corpuscular médio (VCM) durante o período experimental estes não diferiram significativamente entre os tratamentos.

Coppo et al. (2005) analisaram parâmetros hematológicos de rãs-touro americana adultas submetidas a cinco sistemas de alimentação em ranários do noroeste argentino, e observaram que com o avanço da idade há tendência de aumento dos valores de Ht, Er, Hb, contudo, com relação à temperatura, estes valores tendem a diminuir significativamente durante o inverno, onde as temperaturas são bem mais extremas do que as do presente trabalho. Fioranelli et al. (2004) também analisando as alterações hematológicas de *L. catesbeianus* em ranários no noroeste argentino, verificaram diferenças significativas para Ht, Hb e Er para rãs com peso vivo variando entre 100-149g, 250-299g e 200-249g, respectivamente.

Fenerick Junior et al. (2006) analisaram os parâmetros hematológicos de rãs-touro submetidas a quatro rações com níveis de proteína e energia diferentes, sem se observar efeito expressivo destes parâmetros conforme a dieta oferecida. França et al. (2008) analisaram o efeito do probiótico *Bacillus subtilis* testando diferentes doses no desempenho (sobrevivência, ganho de peso e fisiologia) de rãs-touro recém metamorfoseadas, e também não observaram influência deste aditivo alimentar sobre o quadro hematológico.

A média dos números absolutos dos leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos por período encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Médias e erro padrão dos números absolutos de leucócitos entre todos os tratamentos, dos parâmetros hematológicos de rãs-touro alimentadas com diferentes níveis de vitamina C, durante o período experimental (n=216)

Parâmetro	MZ	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
LcT/mm <sup>3</sup>	15212,2±1147,6	14729,2±811,7	16536,5±755,9	13825,4±659,5	15630,3±778,9
Lf/mm <sup>3</sup>	9817,8±717,3	10335,1±551,5	11440,0±596,4	9748,0±502,5	10995,6±563,2
Nt/mm <sup>3</sup>	4728,1±581,1	2994,4±226,5	3317,8±211,6	2650,6±216,8	3029,3±246,1
Bs/mm <sup>3</sup>	530,8±101,7	1107,6±110,2	1440,8±117,2	1078,6±104,2	1084,8±96,8
Es/mm <sup>3</sup>	135,5±26,7	292,0±39,1	331,5±39,5	342,9±43,5	520,7±104,9
Mn/mm <sup>3</sup>	0,0±0,0	0,0±0,0	6,4±3,7	5,3±2,8	0,0±0,0

LcT= Leucócitos Totais, Lf = Linfócitos, Nt = Neutrófilos, Bs = Basófilos, Es = Eosinófilos, Mn = Monócitos, MZ = Momento Zero

Os valores de leucócitos e linfócitos totais não sofreram variações significativas entre tratamentos e entre os períodos e estes valores foram semelhantes aos encontrados por França et al. (2008) em imagos (13.929,16 a 21.498,59mm<sup>3</sup>), e superiores aos observados por Dias et al. (2009) na fase adulta (8.026,97 a 11.222,99 mm<sup>-3</sup>), ambos trabalhos realizados com *L. catesbeianus*.

A comparação dos valores hematológicos obtidos a partir de rãs-touro aparentemente saudáveis criadas intensivamente, parece indicar que, assim como os valores de GC plasmática, estes variaram de acordo, principalmente com a temperatura e fase da vida do animal (adulto, jovem, metamorfose ou girino).

Iwama (1993) afirma que as células mononucleares (linfócitos e monócitos) predominam na reação de defesa do organismo, porém em situações de estresse, o número de linfócitos circulante diminui. Azevedo et al. (2006) comparando peixes mantidos em piscicultura consorciada com peixes de pesque-pague no sul do Brasil observaram que com a intensificação da criação, e em condições adversas de qualidade de água, a tilápia apresentou elevação dos valores de Ht sugerindo uma situação estressante.

A capacidade fagocítica (CP) e o índice fagocítico (IF) das rãs-touro não foram influenciados pela adição de vitamina C, porém os tratamentos apresentaram maiores valores de CP ao final do experimento, quando comparados ao MZ ( $p=0,0002$ ). Neste trabalho a capacidade fagocítica aumentou de 44,88% no MZ para 72,77% (média dos tratamentos), enquanto o IF aumentou de 2,76 para 3,66, não diferindo muito dos resultados relatados por França et al. (2008) sendo o aumento da CP de 37,17% para 58,17 a 68,17% e do IF de 3,28 para 4,34 a 4,76 com a mesma espécie. O *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 promoveu imunização contra patógenos intestinais em camundongos, com aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoniais e da produção *in vitro* de células peritoniais e de células esplênicas (Neuman 1998).

A resposta ao estresse é uma interação entre diversos fatores e eventos biológicos que se sucedem e/ou atuam em conjunto para manter o bem estar animal (Moberg 2000) O esperado neste estudo era que houvesse aumento dos níveis de GC causados pela situação de confinamento e que, as diferentes quantidades de vitamina C adicionadas à dieta dos animais atuassem na diminuição dos níveis de estresse causados pelo cativeiro. Em relação aos

parâmetros hematológicos e imunológicos esperava-se que houvesse leucopenia e imunossupressão. Entretanto, o encontrado foi um padrão de resposta da GC plasmática correlacionado com o estágio de vida em que se encontravam os animais, e um padrão hematológico altamente influenciado pelos extremos de temperatura ambiente encontrados ao longo do experimento e uma resposta imunológica não influenciada pela vitamina C.

Este estudo foi planejado com a intenção primordial de fornecer subsídios zootécnicos às criações comerciais de rãs que lidam rotineiramente com situações de estresse dos animais. Mas, a complexidade fisiológica dos parâmetros analisados leva a crer que os mesmos devam ser analisados em condições controladas, em um primeiro momento, para depois serem testados em campo. A mensuração dos níveis de estresse dos animais em cativeiro seria dada pelo monitoramento destes parâmetros.

Como afirma Moberg (2000) os animais sob situação de estresse utilizam diferentes combinações de respostas de defesa para manter sua homeostase e os fatores modificadores do estresse (genética, idade, condição fisiológica, experiência antecipada e interações sociais) permitindo aos organismos modificarem e reordenarem a natureza de suas respostas. Acrescente-se a isto o fato dos anfíbios apresentarem grande plasticidade e serem altamente dependentes da temperatura ambiente. Somente sob condições laboratoriais será possível identificar estes agentes modificadores.

## **CONCLUSÕES**

Pode-se concluir que não houve influência dos níveis de vitamina C na ração para rãs-touro através da avaliação dos níveis de corticosterona plasmática, parâmetros hematológicos e ativação de macrófagos.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Bunge Fertilizantes S/A e à Mogiana Alimentos S/A pela aquisição de insumos e análises laboratoriais, à Universidade Estadual Paulista (campus de Jaboticabal) pelo processamento das rações e à Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, pela parceria e dosagens hormonais.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Allender MC, Fry MM (2008) Amphibian Hematology. Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Tennessee, 2407 River Drive, Knoxville, TN 37996, USA. Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Tennessee, 2407 River Drive, Knoxville, TN 37996, USA

Azevedo TMP, Martins ML, Yamashida MM, Francisco CF (2006) Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura

consoiciada com suínos e em Pesque-Pague no Vale do Rio Tijucas. Santa Catarina, Brasil. B Inst Pesca 32(1):41-49

Belden LK, Moore IT, Mason RT, Wingfield JC, Blaustein AR (2003) Survival, the hormonal stress response and UV-B avoidance in Cascades Frog tadpoles (*Rana cascadae*) exposed to UV-B radiation. Funct Ecol 17:409-416

Biondo AW (2005) Interpretação do leucograma. In: II Simpósio de patologia clínica veterinária da região Sul do Brasil, 2, Porto Alegre, 2005. *Anais...*:Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp 29-35

Borba MR, Fracalossi DM, Almeida F (2007) Efeito da suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* ao *Ichthyophthirius multifiliis*. Acta Sci Anim Sci 29(1):93-99

Carneiro PCF, Urbinati EC (2002) Transport stress in matrinxã, *Brycon ceplalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. Aquaculture 10:221-229

Chen GR, Sun LT, Lee YH, Chang CF (1995) Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. J Applied Aquaculture 5: 21-31

Coppo JA, Mussart NB, Fioranelli SA, Barboza NN, Koza GA (2005) Variaciones fisiológicas atribuibles al crecimiento, alimentación y temperatura ambiental en sangre de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). Rev Veterinaria 16(2):74-83

Crespi EJ, Denver RJ (2004a) Roles of corticotropin-releasing factor, neuropeptide-Y, and corticosterone in the regulation of food intake in *Xenopus laevis*. J Neuroendocrinol 16:279–288

Crespi EJ, Denver RJ (2004b) Ontogeny of corticotropin-releasing factor on locomotion and foraging in the western spadefoot toad, *Spea hammondi*. *Horm Behav* 46:399–410

Crespi EJ, Denver RJ (2005) Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative Biochemical Physiology A* 141:399-410

Denver RJ, Boorse GC, Glennemeier KA (2002) Endocrinology of complex life cycles: amphibians. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Moss R, Rubin R. (Eds) *Hormones, brain and behavior*, vol. 2. Academic Press, San Diego, pp469–513

Dias DC, Stefani MV, Ferreira CM, Franca FM, Ranzani-Paiva MJT, Santos AA (2009) Haematological and immunological parâmetros of bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, fed with probiotics. *Aquaculture Research*, 1-8. DOI:10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x

Fenerick J Jr, Stefani MV, Martins FM (2006) Parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, alimentada com diferentes rações comerciais. *Inst Pesca* 32(2):173-181

Dias DC, Stéfani MV, Ferreira CM, França FM (2008) Use of probiotics in the ration of bullfrog (*Rana catesbeiana*): productive performance. *Arch Zootec* 57(220): 449-455

Ferreira CM, Pimenta AGC, Paiva-Neto JS (2002) Introdução à Ranicultura. *B Téc Inst Pesca* 33:1-15

Fioranelli SA, Mussart NB, Coppo JA (2004) Efeito do sistema de criação, alimentação e mudanças estacionais sobre o peso vivo e valores do hemograma da rã touro gigante (*Rana catesbeiana*). *Rev Veterinaria* 15(1):9-16

- França FM, Dias DC, Teixeira PC, Marcantonio AS, Stéfani MV, Antonucci A, Rocha G, Ranzani-Paiva MJP, Ferreira CM (2008) Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). B Inst Pesca 34(3):403-412
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, Sa RO, Channing AO, Wilkinson M, Donnellan SC, Raxworthy CJ, Lynch JD, Green DM, Wheeler WC (2006) The amphibian tree of life. Bulletin of American Museum of Natural History 297:1–370
- Glennemeier KA, Denver RJ (2002a) Developmental changes in interrenal responsiveness in anuran amphibians. Integr Comp Biol 42:565– 573
- Glennemeier KA, Denver RJ (2002b) Role of corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. J Exp Zool 292:32–40
- Gomes LC, Araujo-Lima CARM, Roubach R, Urbinati EC (2003) Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte do tambaqui. P Agropec Brasileira 38(2):283-290
- Iwama GK (1993) Intensive Fish Production: Course Manual UBC Access Guided Independent Study. The University of British Columbia. Vancouver, p 130
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (1997) Clinical biochemistry of domestic animals. 5 ed San Diego: Academic Press, p 907 Cap 24: The vitamins
- Kloas W, Reinecke M, Hanke W (1997) Stage-Dependent Changes in Adrenal Steroids and Catecholamines during Development in *Xenopus laevis*. Gen Comp Endocrinol 108:416-426

Mcdowell LR (1989) Vitamins in animal nutrition, San Diego: Academic Press, p 486

Moberg GP (2000) Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA (eds) The biology of animal stress: basic principals and implications for animal welfare. CABI Publishing, pp 1-22

Neumann E, Oliveira MAP, Cabral CM, Moura LN, Nicoli JR, Vieira EC, Cara DC, Podoprigora GI, Vieira LQ (1998) Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 31(12):1565-1573

O'Keefe T (2001) Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds. ASA Technical Bulletin 48:1-9

Rocha GC (2007) Avaliação da resposta fisiológica de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) submetidos aos mecanismos estressores de captura, hipóxia e transporte. São Paulo. p80. Dissertação de Mestrado. Inst Pesca

Rotta MA (2003) Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes. Corumbá: Embrapa Pantanal, p 54

Silva JRMC, Porto-Neto LR, Borges JCS, Jensch Jr BE (2005) Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. P Biology 28(4):326-328

Silva JRMC, Staines NA, Hernandez-Blazquez FJ, Porto-Neto LR, Borges JCS (2002) Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. J Fish Biology 60:466-478

Tacon AGJ (1995) Ictiopatología nutricional: signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados. Cap Transtornos nutricionales relacionados con las vitaminas, Roma: FAO, p 77

Teixeira PC (2007) Perfil de cortisol, glicemia e de parâmetros sanguíneos de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, em diferentes densidades e após exposição aérea. São Paulo. P 86. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da UNESP

Wada H (2008) Glucocorticoids: mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *Gen and Comp Endocrinology* 156(3):441-453

Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiol Reviews* 77:591-625

Wilczynski W, Lynch KS, O'Bryant EL (2005) Current research in amphibians: studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Horm Behav* 48(4):440-450

Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*, New Jersey, USA: Prentice-Hall p 663

## Capítulo II

---

## **Desempenho produtivo de rãs com alimentação suplementada com vitamina C**

### **Desempenho produtivo de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) com a incorporação de níveis crescentes de vitamina C à dieta**

KNOOP, R.<sup>1</sup>; FERREIRA, C.M.<sup>2</sup>, TAKAHASHI, N.S.<sup>2</sup>; FRANÇA, F.M.<sup>1</sup>; ANTONUCCI, A.M.<sup>1</sup>; TEIXEIRA, P.C.<sup>3</sup>; SUGOHARA, A.<sup>5</sup>; DIAS, D.C.<sup>3</sup>; TACHIBANA, L.<sup>2</sup>; HIPÓLITO, M.<sup>4</sup>

1-Pós-graduação – Instituto de Pesca, APTA-SAA. Av. Francisco Matarazzo, 455, São Paulo, SP, Brasil, rainer.knoop@bunge.com

2-Pesquisador Científico – Instituto de Pesca, APTA-SAA, SP, Brasil

3-Pós-graduação - CAUNESP - Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

4-Pesquisador Científico – Instituto Biológico, APTA-SAA, SP, Brasil

5-Prof. Assistente Doutor - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

## **RESUMO**

O experimento foi realizado com rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), na ranicultura da Fazenda Marta, localizada no município de Tremembé no Estado de São Paulo – Brasil - UTM: 7.466,5 N e 436,9 E. Foi avaliada a influência da vitamina C como aditivo alimentar sobre o desempenho produtivo (crescimento, sobrevivência e conversão alimentar) de rãs-touro. Os animais foram mantidos em 24 baias de 2,0 x 1,0m com uma densidade inicial de 50 animais por metro quadrado. Foram testados os seguintes níveis de suplementação na dieta: controle, 250, 500, 750, 1.000 e 2.000 mg de

vitamina C/kg de ração. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições. Os parâmetros avaliados foram: consumo de ração, ganho de peso médio, conversão alimentar aparente e taxa de sobrevivência. Os animais foram pesados no início do experimento e a cada 30 dias e diariamente registrou-se a temperatura ambiente. Pode-se concluir que não houve influência da vitamina C sobre o desempenho produtivo de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) pós-metamorfoseadas.

Palavras-Chave: ácido ascórbico, antioxidante, desempenho, estresse, ranicultura

#### ABSTRACT

The experiment was conducted with bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) in Marta Farm, Tremembé located in the State of São Paulo, Brazil, in a commercial frogculture. The effect of vitamin C as a food additive on the performance (growth, survival and feed conversion) of bullfrogs were evaluated. The animals were kept in 24 boxes of (2.0 x 1.0 m) with an initial density of 50 animals per square meter. We tested the following levels of supplementation in the diet: 0, 250, 500, 750, 1,000 and 2,000 mg vitamin C / kg of diet. The experimental design was completely randomized with six treatments and four repetitions. The parameters evaluated were: feed intake, the determination of weight gain, feed conversion, evaluation of the survival taxes. The animals were weighed at the beginning of the experiment and every 30 days and recorded daily to room temperature. It was concluded that there was no influence of vitamin C on the performance (growth, survival and feed conversion) of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) in the pos-metamorphic fase.

Keywords: ascorbic acid, antioxidant, performance, stress, frogculture

## INTRODUÇÃO

Os primeiros exemplares de rã-touro americana, recentemente re-classificada como *Lithobates catesbeianus* (Frost et al. 2006) chegaram ao Brasil na década de 30, oriundos do Canadá. Até a década de 70 utilizavam-se tanques múltiplos para criação e engorda de rãs, com diversos tipos de alimentos, como tecido pulmonar bovino e restos de carcaças em decomposição para a atração de insetos e desenvolvimento de suas larvas. Sucedeu-se a essa estrutura os sistemas de engorda conhecidos como tanque-ilha; confinamento; anfigranja; gaiolas; ranabox; inundado, e sistemas híbridos construídos ou não sob estufas agrícolas (Ferreira et al. 2002).

A rã-touro americana apresenta ótima capacidade de adaptar-se aos diferentes regimes climáticos, bem como aos diferentes manejos físicos e alimentares tornando-se, desta forma, a única espécie utilizada pelos ranários comerciais brasileiros (Ferreira et al. 2002; 2003; Dias et al. 2009).

Com o declínio dos estoques naturais de rãs devido à caça predatória, com a proibição legal da mesma e com a demanda crescente, as raniculturas ganharam popularidade no Brasil, posicionando o país como o maior produtor das Américas (Teixeira et al. 2001; Dias et al. 2009).

Um dos principais desafios da criação de rãs em ranários comerciais é eliminar os fatores estressantes (predadores, competição por alimento e espaço), que tanto na natureza como no cativeiro retardam o crescimento do animal, que por sua vez poderia direcionar toda sua energia para a engorda e/ou a reprodução, através de manejo e instalações adequadas e uso de alimento balanceado e nutritivo (Rocha 2007; Teixeira 2007).

Em condições de cativeiro, a alimentação é feita com ração peletizada ou extrusada, para rãs e juvenis (i.e. imagos) e farelada para girinos. As rações

comerciais utilizadas para a ranicultura, são formuladas e balanceadas para atender às necessidades nutricionais de peixes carnívoros, pois não se dispõe de informações suficientes sobre as necessidades nutricionais desses animais (Seixas Filho et al. 2008). Rãs-touro apresentam melhor desempenho quando alimentados com dietas com níveis de proteína bruta próximos a 40%, tanto na fase de girinagem (Stéfani et al. 2001) como na fase de engorda (Braga e Lima 2001, Castro et al. 2001, Stéfani et al. 2002, Olvera-Novoa et al. 2007), pois os anfíbios são carnívoros na fase pós-metamórfica.

As vitaminas são classificadas como aditivos nutricionais conforme a Instrução Normativa nº13 de 30/11/04 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, segundo orientações do Codex Alimentarius (Sindirações 2005). Dentre os aditivos a vitamina C ou ácido ascórbico destaca-se como componente essencial para algumas espécies, como primatas, porcos da Índia, peixes, camarões, morcegos, pássaros e alguns insetos (O'Keefe 2001). O ácido ascórbico é obtido através da UDP-glicose, que pela ação de duas enzimas promove o aumento de D-glicuronato, componente essencial em certos processos de desintoxicação e na síntese da vitamina C. O D-glicuronato é convertido para a L-gulonolactona, que é desidrogenado pela ação da enzima L-gulonolactona oxidase formando o ácido ascórbico (Nelson e Cox 2000). A essencialidade para as espécies citadas se deve pela falta ou insuficiência da enzima L-gulonolactona oxidase. Nos peixes, anfíbios e répteis o ácido ascórbico quando produzido ocorre nos rins. As espécies endotérmicas, como aves e mamíferos, sintetizam a vitamina no fígado, órgão mais amplo e com capacidade de atender a demanda maior devido à mudança dos mecanismos de regulação da temperatura (Stone 1997). A absorção intestinal ocorre por difusão facilitada simples e transporte ativo, realizada por transportadores específicos altamente dependentes de Na<sup>+</sup>. O ácido

ascórbico é armazenado nas células na forma reduzida pela ação da enzima ascorbato redutase, prevenindo as perdas. Peixes e outros animais dependentes também absorvem a forma oxidada (ácido desidroascórbico) por mecanismo independente de  $\text{Na}^+$  (Rose e Choi 1990).

A vitamina C desempenha importante papel em muitas reações bioquímicas. Seu principal papel biológico é como agente redutor, participando como co-fator, nas oxidações e promovendo a incorporação do oxigênio molecular em vários substratos (Kaneko et al. 1997). Atua nas hidroxilações de lisina e prolina no colágeno através da redução do ferro para a forma ferrosa. Participa, portanto, na manutenção do tecido conectivo, na cicatrização e formação dos ossos (Kaneko et al. 1997). O ácido ascórbico é rapidamente absorvido nas áreas de formação do colágeno, ou seja, pele e cartilagens. Atua também como agente redutor na desintoxicação do fígado contra contaminantes dietéticos como metais pesados e pesticidas organoclorados, além de participar nas hidroxilações na biosíntese de carnitina e tirosina para a formação de catecolaminas. Mantém os metais ferro e cobre na forma reduzida, favorecendo a absorção gástrica. Como antioxidante permite a regeneração da forma reduzida da vitamina E, prevenindo a peroxidação lipídica (Mcdowell 1989; Rotta 2003; Borba et al. 2007). Desta forma, previne os efeitos negativos do estresse e incrementa o sistema imunológico na defesa contra doenças infecciosas e parasitárias. A deficiência de vitamina C, geralmente apresenta sinais clínicos como escoliose, cifose, lordose, lesões nos tecidos conectivos, deformações, estresse metabólico, letargia, fadiga, queda de resistência e aumento de mortalidade (Tacon 1995).

Objetivou-se com este trabalho verificar a influência da vitamina C como aditivo alimentar sobre o desempenho produtivo (crescimento, sobrevivência e

conversão alimentar) de rãs-touro pós-metamorfoseadas (*Lithobates catesbeianus*).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido na Fazenda Marta, localizada no município de Tremembé no Estado de São Paulo - Brasil, em uma ranicultura comercial. Foram utilizados 2.400 juvenis de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) com peso médio inicial de 13,77g  $\pm$  0,72, distribuídos ao acaso em 24 tanques de alvenaria, medindo 2,00 x 1,00 m, contendo uma área seca (70%) e uma piscina (30%), dispostos sob uma tela sombrite 50% e película de polietileno transparente de 150  $\mu$ m. A densidade inicial foi de 50 rãs/m<sup>2</sup>.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos sendo um controle, com quatro réplicas simultâneas. O experimento foi conduzido durante 120 dias, no período de fevereiro a junho, que compreendem o final do verão e o outono, no hemisfério Sul.

Os animais foram pesados no início do experimento (Momento Zero) e a cada 30 dias. Foram testados os seguintes níveis de vitamina C: Tratamento 1/Controle - sem vitamina C, Tratamento 2 - 250 mg/kg de ração, Tratamento 3 - 500 mg/kg de ração, Tratamento 4 - 750 mg/kg de ração, Tratamento 5 - 1.000 mg/kg de ração e Tratamento 6 - 2.000 mg/kg de ração.

A ração farelada foi homogeneizada e fornecida por uma empresa privada do setor, contendo os seguintes níveis de garantia: umidade (máx.) 10%, proteína bruta (mín.) 40%, extrato etéreo (mín.) 8%, matéria fibrosa (máx.) 6%, matéria mineral (máx.) 12%, cálcio (máx.) 1,6% e fósforo (mín.) 0,8%, composta por 34,35% de produtos de origem animal (farinhas de peixe, de carne, de penas

hidrolizada, de sangue e de víceras), 64,20% de produtos de origem vegetal (milho, arroz, farelos de soja e trigo e óleo de soja) e 1,45% de premix mineral e vitamínico isento de vitamina C. A esta ração basal adicionou-se vitamina C à base de sal monofosfato éster de ácido L-ascórbico (ROVIMIX® STAY-C® 35 da Empresa DSM Nutritional Products), antes do processo de extrusão, que foi realizada na fábrica de rações da UNESP/Jaboticabal. A temperatura atingida na extrusão foi de 140°C. Posteriormente as rações foram enviadas para o local do experimento, onde foram estocadas em local ventilado e seco à temperatura ambiente.

Após a extrusão foram coletadas amostras para análises bioquímicas, realizadas no laboratório RODES localizado no município de Cajati, SP. Utilizou-se a metodologia de espectrofotometria UV/VIS para fósforo, gravimetria para umidade, digestão/microdestilação para proteína bruta e espectrofotometria AA para Ca, Na, Mg e microelementos (Sindirações 2009).

Para confirmação dos teores de vitamina C ativa nas rações após a extrusão foram coletadas amostras de ração de cada tratamento e realizados testes laboratoriais pelo laboratório Labtec (Mogiana Alimentos S.A.) por cromatografia líquida acoplado ao detector de UV, utilizando-se o padrão vitamina C (L-Ascorbyl – 2 – polyphosphate Sodium) (Sindirações 2009).

O alimento foi ministrado duas vezes ao dia, às 7:00h e às 16:00h, representando aproximadamente 3% da biomassa do lote e foi reajustado diariamente conforme o consumo, para evitar sobras. A alimentação consistiu da ração acrescida de indutor biológico (larva de mosca doméstica), na proporção de 10% de larvas e 90% de ração. Diariamente procedeu-se a higienização parcial das baias, com procedimentos completos durante as biometrias. O registro das temperaturas máxima e mínima foi realizado diariamente às 6:00 horas.

Para avaliar o desempenho de produção das rãs foram analisados peso médio final, conversão alimentar e sobrevivência. Os animais foram pesados individualmente no início e na quarta biometria, e em lotes de três a cinco animais durante a primeira, segunda e terceira biometrias. Diariamente foi anotada a mortalidade e ao final de cada biometria calculou-se o canibalismo, através da diferença entre o número inicial de animais menos os números de mortes, descontando-se também os animais sacrificados na biometria.

Para o cálculo de consumo, as rações foram acondicionadas em recipientes individuais para cada baia, anotando-se os valores de reposição. As sobras foram recolhidas diariamente e armazenadas em freezer. Posteriormente todo o material foi submetido à secagem em estufa ventilada a 50°C durante 48h, para a realização dos cálculos de consumo e conversão alimentar. O consumo foi obtido pela diferença entre a ração fornecida e a sobra. A conversão alimentar foi obtida pela razão entre o consumo e o ganho de peso.

Para verificar a normalidade e homocedasticidade dos dados foram aplicados os testes de Shapiro-Wilks e Bartlett. Para a avaliação das diferenças das médias de desempenho (ganho de peso, consumo e conversão alimentar), aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Para as determinações das diferenças das médias para sobrevivência, mortalidade e canibalismo utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (Zar 1999).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados das análises químicas e bromatológicas das rações após a extrusão encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1** Análises químicas e bromatológicas das rações experimentais após o processo de extrusão

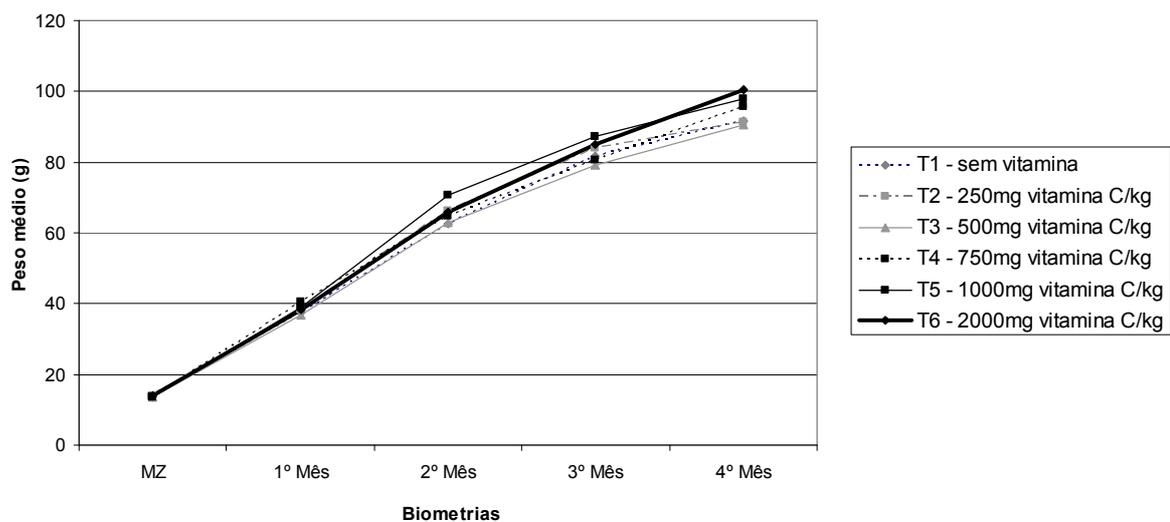
mg/kg		%				%	
Tratamentos (T)	vitamina C após extrusão	Fósforo	Cálcio	Sódio	Magnésio	Umidade	Proteína Bruta
T1- sem vitamina C	0	1,35	2,20	0,53	0,16	8,3	41,2
T2- 250 vitamina C	192	1,42	2,30	0,59	0,15	10,7	41,4
T3- 500 vitamina C	413	1,40	2,18	0,58	0,15	6,7	44,8
T4- 750 vitamina C	592	1,37	2,17	0,60	0,15	10,4	39,8
T5-1000 vitamina C	812	1,44	2,37	0,75	0,15	9,2	43,4
T6-2000 vitamina C	1468	1,55	2,48	0,52	0,14	5,5	40,7

O nível médio de vitamina C após o processamento das rações foi de 78,6%. Este valor é aceitável comercialmente e encontra-se dentro do esperado após um processo de cozimento a altas temperaturas. A escolha da vitamina C na forma monofosfatada neste estudo deveu-se à sua alta estabilidade e biodisponibilidade. O ácido ascórbico puro oxida-se facilmente em condições neutras ou alcalinas, pela ação do oxigênio, umidade, microelementos, calor, luz, temperaturas elevadas, lipídios oxidados e contaminantes (O'KEEFE 2001). Shiau & Hsu (1995) compararam a estabilidade das formas ácido *L*-ascórbico, *L*-ascorbil-2-sulfato e *L*-ascorbil-2-monofosfato em rações de tilápia híbrida, encontrando, após a industrialização, níveis que variaram de 25,4 a 27%, 76,5 a 83,4% e 74,6 a 79% dos níveis iniciais, respectivamente. Neste experimento procurou-se reproduzir as condições de armazenagem e manejo de campo, naturalmente encontradas comercialmente.

Durante os 4 meses experimentais as temperaturas mínimas médias variaram de 22°C ± 4,63; 20°C ± 2,46; 14°C ± 3,11 e 14°C ± 2,50 respectivamente, com a leitura mais baixa no terceiro mês (8°C). As máximas médias observadas foram:

34°C ± 4,36; 31°C ±2,94; 28°C ±3,46 e 26°C ± 4,51, com a leitura mais alta atingindo 39°C no primeiro mês. As temperaturas médias foram de 28,0°C; 25,1°C; 21,3°C e 20,1°C estando dentro da faixa de conforto térmico durante os dois períodos iniciais. De acordo com Figueiredo et al. (1996) a temperatura que proporciona melhor conforto térmico, ganho de peso e crescimento corporal das rãs situa-se entre 26°C e 29°C, dependendo do porte dos animais e do objetivo específico a ser alcançado. Teodoro et al. (2005) trabalhando com estufas climatizadas observaram que quando a temperatura do ar atinge valores abaixo de 10°C ou superiores a 40°C, há diminuição no consumo de ração pelos animais, com o estresse predominante, neste tipo de estrutura, principalmente às baixas temperaturas.

Os valores médios de peso obtidos ao longo da experimentação estão apresentados na Figura 1. Embora ao final do experimento os animais submetidos a diferentes tratamentos não apresentassem diferenças significativas ( $p>0,05$ ), pôde-se verificar que os animais que consumiram dietas com maiores teores de vitamina C (T4 = 750mg vitamina C/kg, T5 = 1.000mg vitamina C/kg e T6 = 2.000mg vitamina C/kg) apresentaram seu peso médio superior.



**Figura 1.** Pesos médios (g) de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) obtidos durante o experimento com vitamina C. MZ = Momento Zero

Os ganhos de pesos totais, consumo de ração, conversão alimentar e sobrevivência durante todo o período do experimento encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores médios e desvio padrão de ganho de peso total, valores médios de peso inicial, peso final, consumo de ração e conversão alimentar de rês-touro obtidos durante o experimento com vitamina C

	Peso médio inicial (g / animal)	Peso médio final (g / animal)	Ganho médio (g / animal)	Consumo de ração (g / animal)	Conversão alimentar
T1	13,70	91,81	78,11 ± 41,05	180,84	2,32
T2	13,84	91,18	77,34 ± 41,27	178,68	2,31
T3	13,50	90,70	77,20 ± 41,51	180,14	2,33
T4	13,76	95,66	81,90 ± 41,67	175,53	2,14
T5	13,67	97,89	84,22 ± 45,95	185,51	2,2
T6	14,16	100,56	86,40 ± 44,55	180,13	2,08

T1 – sem vitamina C, T2 – 250mg vitamina C/kg ração, T3 - 500mg vitamina C/kg ração, T4 – 750mg vitamina C/kg ração, T5 - 1000mg vitamina C/kg ração, T6 - 2000mg vitamina C/kg ração

O ganho de peso para as rês-touro (*L. catesbeianus*), por se tratar de animal ectotérmico, é influenciado pela temperatura ambiente (Lima et al. 2003). Em ambiente controlado, Braga e Lima (2001) avaliando ganho de peso, consumo e conversão alimentar da rã-touro na fase de engorda com animais pesando inicialmente 37,5g ± 1,5 submetidos às temperaturas de 20, 25 e 30°C durante um período de 35 dias, observaram ganhos de 32,48, 52,62 e 52,54g respectivamente, com consumos de 46,42, 75,89 e 73,59g e sem influência da temperatura sobre as conversões. Figueiredo (2001) obteve os maiores ganhos de peso de rã-touro 27,6 e 29,7°C com melhor crescimento entre 28,2 e 30,1°C; para rã-manteiga os melhores ganhos e conversão alimentar foram observados a 28,6 e 28°C,

respectivamente. Fioranelli et al. (2004) estudando animais criados em sistemas de engorda conhecidos como anfigranja (i.e. semi-seco) no nordeste argentino verificaram pesos médios de 174,4g somente aos 13 meses de idade, e 200,2g aos 15 meses. Valores superiores de ganho de peso foram encontrados por Dias et al. (2008), com média de 196,14g em período de 112 dias de engorda, com variação de temperatura entre  $16^{\circ}\text{C} \pm 3,9$  e  $28^{\circ}\text{C} \pm 3,9$ .

No presente estudo o consumo de ração foi semelhante entre os tratamentos (Tabela 3). Houve redução do percentual de alimento consumido em relação ao peso (%/g), com os seguintes valores: 3,85/38,4; 2,74/65,6; 1,70/82,9 e 1,20/94,6.

**Tabela 3.** Valores médios de consumo de ração por animal (CR/A) por período obtido durante o experimento com vitamina C

CR/A (g)	1º Mês	2º Mês	3º Mês	4º Mês
T1	46,64	54,43	46,04	33,73
T2	45,49	53,67	44,46	35,06
T3	44,42	54,22	45,66	35,84
T4	45,05	52,16	43,08	35,24
T5	47,81	56,66	46,03	35,01
T6	45,27	52,40	45,43	37,03

T1 – sem vitamina C, T2 – 250mg vitamina C/kg ração, T3 - 500mg vitamina C/kg ração, T4 – 750mg vitamina C/kg ração, T5 - 1000mg vitamina C/kg ração, T6 - 2000mg vitamina C/kg ração

Há uma tendência de consumo inversa ao valor do peso: quanto maior o peso menor será percentualmente o consumo. Condições climáticas e qualidade dos

alimentos ofertados também afetam a quantidade de ingestão. Lima e Agostinho (1988) verificaram variações de consumo diário de 12% do peso vivo na fase inicial a 5% na terminação, com reprodutores consumindo entre 3 e 5%. Quanto melhor o controle das variáveis ambientais, maior é percentual de alimento consumido em relação ao peso. Por exemplo, em laboratório com temperatura estabilizada a 25°C. Braga e Lima (2001) observaram consumo de 4,24% para animais de 40g e de 2,64% para animais de 80g. Em condições de campo, Lima et al. (2003) encontraram valores de 3,2% e de 2,5% para animais com os pesos semelhantes. Os resultados deste experimento confirmam a tendência observada.

A conversão alimentar observada foi bastante semelhante entre os tratamentos nas três primeiras biometrias (Tabela 4), variando de  $1,86 \pm 0,04$  a  $2,62 \pm 0,06$ . No último período a conversão média aumentou para  $3,21 \pm 0,36$ . Ao final do experimento observou-se que a conversão alimentar foi um pouco inferior nos três tratamentos com maiores teores de vitamina C, devido aos pesos ligeiramente superiores, porém não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ). A queda de metabolismo, o baixo consumo e baixo ganho de peso, devido principalmente às temperaturas menores com médias inferiores aos 25°C, levaram às conversões alimentares mais elevadas durante os terceiro e quarto períodos.

Tabela 4. Valores médios de conversão alimentar (CA) por período obtido durante o experimento com vitamina C

CA	1º Mês	2º Mês	3º Mês	4º Mês
T1	1,96	2,15	2,43	3,35
T2	1,86	1,91	2,55	4,77
T3	1,90	2,07	2,86	3,08
T4	1,69	2,14	2,69	2,35
T5	1,88	1,79	2,76	3,34
T6	1,88	1,89	2,42	2,36

T1 – sem vitamina C, T2 – 250mg vitamina C/kg ração, T3 - 500mg vitamina C/kg ração, T4 – 750mg vitamina C/kg ração, T5 - 1000mg vitamina C/kg ração, T6 - 2000mg vitamina C/kg ração

As rãs que pesam até 50g de peso possuem um ótimo desenvolvimento, sendo que acima de 200g a conversão naturalmente diminui muito (Fontanello et al. 1987). Lima et al. (2003) analisando o desempenho zootécnico de três ranários comerciais observaram ganhos diários variando de 0,4 a 2,2g com média de 1,2g e a conversão variando de 0,9 a 2,5 com média de 1,4. Dias et al. (2008) observaram valores de conversão alimentar variando de 1,41 a 1,84 em experimento com probióticos, onde os animais que receberam maiores dosagens apresentaram pior conversão, apesar da engorda mais rápida, antecipando o peso médio de abate (200g) de 112 para 84 dias.

A sobrevivência final observada também não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, com média de 75,97%, descontados os animais sacrificados nas biometrias ( $273,5 \pm 5,58$ ) (Tabela 2). Os tratamentos 1, 5 e 6 apresentaram

mortalidade pouco inferior ao final do experimento, porém os mesmos apresentaram canibalismo superior (Tabela 5). Ao final a menor sobrevivência foi do tratamento 2 com 73,21% e a maior do tratamento 4 com 78,33%.

Tabela 5. Mortalidade e canibalismo por período observados durante o experimento com vitamina C

	mortalidade					Canibalismo				
	1º Mês	2º Mês	3º Mês	4º Mês	total	1º Mês	2º Mês	3º Mês	4º Mês	Total
T1	5	2	20	19	46	23	9	8	1	41
T2	15	6	19	23	63	15	5	7	5	32
T3	15	3	23	14	55	9	15	6	4	34
T4	12	3	27	17	59	4	5	5	5	19
T5	14	4	11	14	43	18	14	7	3	42
T6	9	4	13	18	44	8	7	20	6	41

Obs.: foram sacrificados 40 animais de cada tratamento durante as biometrias.

O período de metamorfose, com peso inferior a 12g é o de maior mortalidade. Observa-se nos ranários comerciais grandes variações das taxas de mortalidade, devido a interferência de vários fatores como alimentação, higiene, lotação, qualidade da água, instalação e manejo. Lima et al. (2003) trabalhando com rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), observaram sobrevivência média de 88%, variando de 86,5 a 98%. Também com a mesma espécie Dias et al. (2008) obtiveram valores de sobrevivência superiores a 92,78%, para animais com peso médio inicial de 11,74g até atingirem 200g, aos 112 dias.

De acordo com Stéfani et al. (2001) a vitamina C parece ser necessária na dieta de girinos pela sua ação na redução de mortalidade e de deformações estruturais quando suplementada à dieta, apesar de não ter sido observada interferência sobre o ganho de peso. Colombano et al. (2007) trabalhando com quatro níveis de ácido ascórbico polifosfato protegido com etilcelulose (0, 1000,

1500 e 2000 mg vitamina C/kg) na dieta para girinos observaram que a suplementação com vitamina C melhora o desempenho zootécnico, e que 2.000 mg vitamina C/kg obteve-se os melhores índices para ganho de peso, crescimento específico, metamorfose e sobrevivência. Nandi et al.(1997) verificaram a presença da enzima l-gulonolactona oxidase em rãs, porém não em quantidades adequadas para a manutenção das funções fisiológicas. Yoshiyomi (2004) encontrou teores mais elevados de vitamina C em farinhas de carne de rãs quando comparadas às farinhas de peixes. Castro et al. (2001), estudando biodisponibilidade e valores energéticos de diversos ingredientes para a nutrição de rãs, concluem que os resultados obtidos na fase de terminação em geral são superiores aos encontrados na fase inicial de crescimento.

Diversos fatores ambientais e fisiológicos combinados interferem e interagem sobre o desenvolvimento e desempenho dos animais. As mudanças climáticas das estações, destacando-se as alterações de temperatura e luminosidade, provocam mudanças fisiológicas e comportamentais nos animais, ressaltando aqui as alterações hormonais e de consumo, modificando significativamente as exigências nutricionais e os desempenhos produtivo e reprodutivo. Rotta (2003) destaca, por exemplo, a necessidade de níveis mais elevados de suplementação de vitamina C para peixes nas fases iniciais de desenvolvimento e afirma que, a presença de contaminantes como os metais pesados e pesticidas organoclorados podem aumentar as necessidades desta vitamina causando deficiência funcional. Entretanto, sabe-se que existem diferenças morfológicas e fisiológicas entre espécies distintas, entre fases de desenvolvimento e até mesmo entre indivíduos.

## CONCLUSÕES

Não houve influência da vitamina C como aditivo alimentar sobre o desempenho produtivo (ganho em peso, peso final, conversão alimentar, canibalismo e mortalidade) de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), na fase de engorda. Os animais alimentados por 4 meses com ração sem vitamina C e com larvas de insetos, não apresentaram sinais clínicos de deficiência.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Bunge Fertilizantes S/A e a Mogiana Alimentos S/A pelo auxílio financeiro para aquisição de insumos e análises laboratoriais, e a UNESP (Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borba MR, Fracalossi DM, Almeida F (2007) Efeito da suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* ao *Ichthyophthirius multifiliis*. Acta Sci Anim Sci 29(1):93-99
- Braga LGT, Lima SL (2001) Influência da Temperatura Ambiente no Desempenho da Rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na Fase de Recria. Rev Bras Zootec 30(6):1659-1663
- Castro JC, Silva V, Santos RB, Modenesi VM, Almeida Filho EF (2001) Valor Nutritivo de Alguns Alimentos para Rãs. Rev Bras Zootec 30(3):605-610

Colombano NC, Fenerick Jr J, Stéfani MV, Moraes FR, Souza MA, Malheiros EB (2007) Suplementação alimentar com vitamina C e desempenho zootécnico de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). Acta Sci Anim Sci Maringá 29(3): 333-338

Dias DC, Stefani MV, Ferreira CM, Franca FM, Ranzani-Paiva MJT, Santos AA (2009) Haematological and immunological parâmetros of bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, fed with probiotics. Aquaculture Research, 1-8. DOI:10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x

Ferreira CM, Pimenta AGC, Paiva-Neto JS (2002) Introdução à Ranicultura. B Téc Inst Pesca 33:1-15

Figueiredo MRC (1996) Influência dos fatores ambientais sobre o desempenho da rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) em gaiolas. 151p. Tese de Doutorado em Fisiologia Animal. Universidade Federal de Viçosa

Figueiredo MRC, Lima SL, Agostinho CA, Baeta FC, Weigert SC (2001) Estufas Climatizadas para Experimentos Ambientais com Rãs, em Gaiolas. Rev Bras Zootec 30(4):1135-1142

Fioranelli SA, Mussart NB, Coppo JA (2004) Efeito do sistema de criação, alimentação e mudanças estacionais sobre o peso vivo e valores do hemograma da rã touro gigante (*Rana catesbeiana*). Rev Veterinaria 15(1): 9-16

Fontanello D, Arruda Soares H, Mandelli Jr J (1984) Estação de reprodução da *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, criadas em ranário comercial e a influência de fatores climáticos sobre o número de desovas. B Inst Pesca 11(único):123-33

Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, Sa RO, Channing AO, Wilkinson M, Donnellan SC, Raxworthy CJ, Lynch JD, Green DM, Wheeler WC (2006) The amphibian tree of life. B Am Museum Natural History 297:1–370

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (1997) Clinical biochemistry of domestic animals. 5 ed San Diego: Academic Press, p 907 Cap 24: The vitamins

Kubitza, F. 2004 *Nutrição e Alimentação dos Peixes Cultivados*. Jundiaí, p 83

Lima SL, Casali AP, Agostinho CA (2003) Desempenho zootécnico e percentual de consumo de alimento de rã-touro (*Rana catesbeiana*) na fase de recria (pós-metamorfose) do sistema anfigranja. Rev Bras Zootec 32(3):505-511

Mcdowell LR (1989) Vitamins in animal nutrition. San Diego: Academic Press, p 486

Nandi A, Mukhopadhyay CK, Ghosh MK, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IR (1997) Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. Free Radical Biology and Medicine, New York 22(6):1047-1954

Nelson D L, Cox M M (2000) Lehninger: principles of biochemistry. 3 ed New York: Worth Publishers, p 1152

O'Keefe T (2001) Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds. ASA Technical Bulletin 48:1-9

Rose RC, Choi JL (1990) Intestinal-absorption and metabolism of ascorbic-acid in rainbow-trout. American Journal of Physiology, Bethesda 258(5):R1238-R1241

Rostagno HS (2005) Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 2 ed, Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, p 186

Rotta MA (2003) Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes. Corumbá: Embrapa Pantanal, p 54

Seixas Filho JT, Oliveira MGA, Moura GS, Garcia SLR, Lanna ETA, Lilia Nogueira da Silva LN (2008) Desempenho e atividades enzimáticas em girinos de rã-touro. Pesq Agropec Bras 43(11):1617-1624

SINDIRAÇÕES (2005) Guia de Aditivos - Ácidos Orgânicos, Aminoácidos, Enzimas, Microminerais, Vitaminas. Sindirações eds p 45

SINDIRAÇÕES (2009) Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal – Guia de Métodos Analíticos p 383

Yoshiomi B (2004) Depletion of ascorbic and derivatives in fish feed by the production process. Fisheries Science 70:1153-1156

Zar JH (1999) Biostatistical Analysis, New Jersey, USA: Prentice-Hall p 663

## Considerações Finais

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos fatores ambientais (temperatura, umidade, qualidade de água), e fisiológicos (estágio de vida, sexo) combinados ou não interferem e interagem sobre o desenvolvimento e desempenho dos animais. Entre eles destacam-se as mudanças climáticas das estações, com alterações de temperatura e luminosidade, provocando mudanças fisiológicas e comportamentais nos animais, com alterações hormonais e de consumo, modificando significativamente as exigências nutricionais e os desempenhos produtivo e fisiológico.

Estas mudanças e alterações provocam no organismo respostas fisiológicas compensatórias e/ou adaptativas buscando a homeostase. A resposta ao estresse é uma interação entre diversos fatores e eventos biológicos que se sucedem e/ou atuam em conjunto com o objetivo de manter o bem estar animal.

O esperado neste estudo era que houvesse um aumento dos níveis de corticosterona causados pela situação de confinamento e que, as diferentes quantidades de vitamina C adicionadas à dieta dos animais diminuíssem o estresse causado pelo cativeiro. Em relação aos parâmetros hematológicos e imunológicos esperava-se que houvesse leucopenia e imunossupressão. Entretanto, o encontrado foi um padrão de resposta da corticosterona plasmática nitidamente correlacionado com o estágio de vida dos animais, um padrão hematológico altamente influenciado pelos extremos de temperatura

encontrados ao longo dos quatro meses de experimentação, e uma resposta imunológica não influenciada pela vitamina C.

Este experimento foi planejado com a intenção de fornecer subsídios zootécnicos às criações comerciais de rãs que lidam rotineiramente com situações de estresse dos animais em cativeiro. Mas, a complexidade fisiológica dos parâmetros analisados leva a crer que os mesmos devam ser analisados em condições controladas, em um primeiro momento, para depois serem testados em campo.

Os animais sob situação de estresse utilizam diferentes combinações de respostas de defesa para manter sua homeostase e os fatores modificadores do estresse (genética, idade condição fisiológica, experiência antecipada e interações sociais) permitem aos organismos modificar e reordenar a natureza de suas respostas. Ressalta-se o fato dos anfíbios serem animais com grande plasticidade e altamente dependentes da temperatura ambiente. Somente sob condições laboratoriais será possível identificar estes agentes modificadores.

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que não houve influência da vitamina C como aditivo alimentar sobre o desempenho produtivo (crescimento, sobrevivência e conversão alimentar) e fisiológico (níveis de corticosterona, parâmetros hematológicos e ativação de macrófagos) de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), na fase de engorda. Os animais alimentados por quatro meses com dieta deficiente em vitamina C, não apresentaram sinais clínicos de deficiência.

A diminuição dos teores de corticosterona plasmática ao longo do período de experimentação, sugere que há uma dependência deste glicocorticoide com o estágio de vida em que os animais se encontram ou uma possível adaptação à situação de cativeiro após a metamorfose. Desta forma, mais estudos são necessários para assegurar os efeitos do uso da vitamina C para a espécie estudada.

## Apêndice

## Normas para publicação de artigo técnico na revista “*Aquaculture International*”.

### Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of *Aquaculture International* the option of using our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible (no postal delays!), we encourage authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://aqui.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for *Aquaculture International* offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

**NOTE:** By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk.

In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on “CONTACT US” from the tool bar.

### Electronic figures

Electronic versions of your figures must be supplied. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

### Colour figures

Springer offers two options for reproducing colour illustrations in your article. Please let us know what you prefer: 1) Free online colour. The colour figure will only appear in colour on [www.springer.com](http://www.springer.com) and not in the printed version of the journal. 2) Online and printed colour. The colour figures will appear in colour on our website and in the printed version of the journal. The charges are EUR 950/USD 1150 per article.

### Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

### Reviewing Procedure

*Aquaculture International* is sent to 2 specialist reviewers who remain anonymous unless they specifically choose to confer with the author.

### Manuscript Presentation

Manuscripts should all be presented in the accepted scientific format e.a. Introduction, Materials and Methods etc. There is no separate format for short communication. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. Manuscripts should leave adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

running head (shortened title)

title

author(s)

affiliation(s)

full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

### Abstract

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Key Words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

### Abbreviations

Abbreviations and their explanations should be collected in a list.

### Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each

figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

## Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

## Section Headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

## Appendices

Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Notes and Reference sections.

## Notes

Please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the References. A source reference note should be indicated by an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

## Cross-Referencing

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

*Examples:*

Winograd (1986, p. 204)

(Winograd 1986; Flores *et al.* 1988)

(Bullen and Bennett 1990)

## Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

## References

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

2. Inclusion of issue number (optional):

Saunders DS (1976) The biological clock of insects. *Sci Am* 234(2):114–121

3. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

4. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

5. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York

6. Book, authored:

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

7. Book, edited:

Smith J, Brown B (eds) (2001) *The demise of modern genomics*. Blackwell, London

8. Chapter in a book in a series without volume titles:

Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) *Handbook of environmental chemistry*, vol 2E. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

9. Chapter in a book in a series with volume title:

Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) *Neuromuscular junction. Handbook of experimental pharmacology*, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

10. Proceedings as a book (in a series and subseries):

Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) *PRICA'96: topics in artificial intelligence*. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. *Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence)*, vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

11. Proceedings with an editor (without a publisher):

Aaron M (1999) The future of genomics. In: Williams H (ed) *Proceedings of the genomic researchers*, Boston, 1999

12. Proceedings without an editor (without a publisher):

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: *Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms*, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Paper presented at a conference:

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

14. Patent:

Name and date of patent are optional

Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

15. Dissertation:

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

16. Institutional author (book):

International Anatomical Nomenclature Committee (1966) *Nomina anatomica*. Excerpta Medica, Amsterdam

17. Non-English publication cited in an English publication:

Wolf GH, Lehman P-F (1976) *Atlas der Anatomie*, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

18. Non-Latin alphabet publication:

The English translation is optional.

Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) *Nadmolekulyarnaya struktura polimerov* (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

19. Published and In press articles with or without DOI:

19.1 In press

Wilson M et al (2006) References. In: Wilson M (ed) *Style manual*. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)

19.2. Article by DOI (with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

19.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

19.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s801090000086

20. Internet publication/Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Cited 15 Jan 1999

20.1. Online database

Healthwise Knowledgebase (1998) *US Pharmacopeia*, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998

Supplementary material/private homepage

Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000  
University site

Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999 FTP site

Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999 Organization site

ISSN International Centre (1999) *Global ISSN database*. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

## Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author. One corrected proof, together with the original, edited manuscript, should be returned to the Publisher within three days of receipt by mail (airmail overseas).

## Offprints

25 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

## Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour figures are published at the author's expense only.

## Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

## Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

## Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an

alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit <http://www.springer.com/openchoice> to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

### **Additional Information**

Additional information can be obtained from:

*Aquaculture International*

Springer

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

Fax: 78-6576377

Internet: <http://www.springer.com/>



<http://www.springer.com/journal/10499>

Aquaculture International

Journal of the European Aquaculture Society

Editor-in-Chief: G.M. Burnell

ISSN: 0967-6120 (print version)

ISSN: 1573-143X (electronic version)

Journal no. 10499

Springer Netherlands

Texto da Instrução Normativa nº13, de 30 de novembro de 2004, que aprova o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, e define seus grupos de classificação.

**Instrução Normativa Nº 13, DE 30 DE NOVEMBRO DE 2004**

**Situação: Vigente**

**Publicado no Diário Oficial da União de 01/12/2004 , Seção 1 , Página 63**

**Ementa:** Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização, constante dos anexos desta instrução normativa.

**Histórico:**  
[Alterada pela Instrução Normativa nº 15 de 26/05/2009.](#)

**Os textos legais disponíveis no site são meramente informativos e destinados a consulta / pesquisa, sendo imprópria sua utilização em ações judiciais.**

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.  
SECRETARIA DE APOIO RURAL E COOPERATIVISMO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 30 DE NOVEMBRO DE 2004

O SECRETÁRIO DE APOIO RURAL E COOPERATIVISMO, DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o inciso III, alínea "d", do art. 11, do Anexo I, do Decreto nº 4.629, de 21 de março de 2003, tendo em vista o Decreto nº 76.986, de 6 de janeiro de 1976, considerando a necessidade de estabelecer os procedimentos a serem adotados para avaliação de segurança de uso, registro e comercialização dos aditivos utilizados nos produtos destinados à alimentação animal, e o que consta do Processo nº 21000.012060/2003-04, resolve:

Art. 1º Aprovar o REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE ADITIVOS PARA PRODUTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO ANIMAL, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização, constante dos anexos desta Instrução Normativa.

Art. 2º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

MANOEL VALDEMIRO FRANCALINO DA ROCHA

## ANEXO I - REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE ADITIVOS PARA PRODUTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO ANIMAL.

### ANEXO II - GRUPOS DE ADITIVOS.

### ANEXO III - ADITIVOS ZOOTÉCNICOS COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS DIGESTIVAS E EQUILBRADORES DA FLORA DO TRATO DIGESTÓRIO UTILIZADOS NOS PRODUTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO ANIMAL.

## **ANEXO II**

### **GRUPOS DE ADITIVOS**

**1. Aditivos tecnológicos** - incluem os seguintes grupos funcionais:

- a) adsorvente: substância capaz de fixar moléculas;
- b) aglomerante: substância que possibilita às partículas individuais de um alimento aderir-se umas às outras;
- c) antiaglomerante: substância que reduz a tendência das partículas individuais de um alimento a aderir-se umas às outras;
- d) antioxidante: substâncias que prolongam o período de conservação dos alimentos e das matérias-primas para alimentos, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação;
- e) antiemectante: substância capaz de reduzir as características higroscópicas dos alimentos;
- f) conservante: substância, incluindo os auxiliares de fermentação de silagem ou, nesse caso, os microorganismos que prolongam o período de conservação dos alimentos e as matérias-primas para alimentos, protegendo-os contra a deterioração causada por microorganismos;
- g) emulsificante: substância que possibilita a formação ou a manutenção de uma mistura homogênea de duas ou mais fases não miscíveis nos alimentos;
- h) estabilizante: substância que possibilita a manutenção do estado físico dos alimentos;
- i) espessantes: substância que aumenta a viscosidade dos alimentos;
- j) gelificantes: substância que dá textura a um alimento mediante a formação de um gel;
- k) regulador da acidez: substância que regula a acidez ou alcalinidade dos alimentos;
- l) umectante: substância capaz de evitar a perda da umidade dos alimentos.

**2. Aditivos sensoriais** - incluem os seguintes grupos funcionais:

- a) corante e pigmentantes: substância que confere ou intensifica a cor aos alimentos;
- b) aromatizante: substância que confere ou intensifica o aroma dos alimentos;
- c) palatilizante: produto natural obtido mediante processos físicos, químicos, enzimáticos ou microbiológicos apropriados a partir de materiais de origem vegetal ou animal, ou de substâncias definidas quimicamente, cuja adição aos alimentos aumenta sua palatabilidade e aceitabilidade.

**3. Aditivos nutricionais** - incluem os seguintes grupos funcionais:

- a) vitaminas, provitaminas e substâncias quimicamente definidas de efeitos similares;
- b) oligoelementos ou compostos de oligoelementos;
- c) aminoácidos, seus sais e análogos;
- d) uréia e seus derivados.

**4. Aditivos zootécnicos** - incluem os seguintes grupos funcionais:

- a) digestivo: substância que facilita a digestão dos alimentos ingeridos, atuando sobre determinadas matérias-primas destinadas à fabricação de produtos para a alimentação animal;
- b) equilibradores da flora: microrganismos que formam colônias ou outras substâncias definidas quimicamente que têm um efeito positivo sobre a flora do trato digestório;
- c) melhoradores de desempenho: substâncias definidas quimicamente que melhoram os parâmetros de produtividade.

**5. Anticoccidianos**



**Figura 1.** Estufa coberta com polietileno e tela sombrite 50% utilizada no experimento com vitamina C incorporada à dieta de rã-touro (*L. catesbeianus*)



**Figura 2.** Vista das baias utilizadas no experimento com vitamina C incorporada à dieta de rã-touro (*L. catesbeianus*)



**Figura 3.** Vista interna das baias experimentais utilizadas no experimento com vitamina C incorporada à dieta de rã-touro (*L. catesbeianus*)



**Figura 4.** Extrusora da fábrica de rações da UNESP – Jaboticabal, utilizada para o preparo de rações



**Figura 5.** Local de estocagem das rações na Fazenda Marta, utilizado no experimento com vitamina C incorporada à dieta de rã-touro (*L. catesbeianus*)



**Figura 6.** Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal (FMVZ-USP)



**Figura 7.** Punção do vaso ciático do membro esquerdo após anestesia com lidocaína de exemplar de rã-touro (*L. catesbeianus*)



**Figura 8.** Lavagem da cavidade abdominal de exemplar de rã-touro (*L. catesbeianus*), para as análises imunológicas