

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

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS NO
DESEMPENHO, RESPOSTA IMUNE E HEMATOLÓGICA DE
GIRINOS E IMAGOS DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*)**

Fernanda Menezes França

**Orientadora: Dr^a. Cláudia Maris Ferreira
Co-orientadora: Dr^a. Marta Verardino De Stéfani**

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

Agosto - 2007

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

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS NO
DESEMPENHO, RESPOSTA IMUNE E HEMATOLÓGICA DE
GIRINOS E IMAGOS DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*)**

Fernanda Menezes França

**Orientadora: Dr^a. Cláudia Maris Ferreira
Co-orientadora: Dr^a. Marta Verardino De Stéfani**

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

Agosto - 2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

F814e

França, Fernanda Menezes

Efeito da utilização de probióticos no desempenho, resposta imune e hematológica de girinos e imagos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) / Fernanda França Menezes. - 2007
93 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesca, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento. - São Paulo, 2007.
Orientador: Cláudia Maris Ferreira

Bibliografia f .73-85

1. Ranicultura 2. Rã-touro – Análises imunológicas I. Instituto de Pesca (São Paulo) II. Título

CDD 639.94

*Para realizar grandes conquistas,
devemos não apenas agir, mas também
sonhar; não apenas planejar, mas também
acreditar."*

(Anatole France)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Rubens Vieira França e Clotilde M. Menezes França
pelo incentivo e apoio.*

*Com todo meu amor,
ao meu marido André Luis F. Salgueiro
e minha filha Isabella França Salgueiro
por todo carinho e compreensão.*

E, em especial, à minha orientadora e amiga

Dr. Cláudia Maris Ferreira:

*"O professor medíocre conta.
O bom professor explica.
O professor superior demonstra.
O grande professor inspira."*

(William Arthur Ward)

Pela grande professora que foi para mim,

E espero que continue sendo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr^a. Cláudia Maris Ferreira, pelos ensinamentos, pela confiança em meu trabalho, pelo incentivo, companheirismo e pela amizade. Espero, realmente, poder retribuir tudo que você me proporcionou estes anos.

À Dr^a Marta Verardino de Stéfani, pela co-orientação, pelas dicas e sugestões.

Ao Ranicultor Rui Teixeira pela doação de animais.

À CAAT Cooperativa Agropecuária de Atibaia em nome de Eng^o Agr. Joaquim Edwander pela doação de ração.

À Kishimoto do Brasil Comercial Ltda / Calpis Co. Ltd, em nome de Lílian Tiyomi Sato pela doação de probiótico utilizado no experimento

Ao Adriano Padiglione Gerente de Desenvolvimento de Produtos da M. Cassab pela doação de probiótico.

À Vetnil, em nome de Walquiria Orrico Reinig pela doação de probiótico.

À Organnact, em nome de Dr. Bacila pela doação de probiótico.

Às minhas amigas Patrícia Coelho Teixeira e Danielle de Carla Dias que me ajudaram muito em todas as etapas deste trabalho, pela amizade e colaboração.

Aos Pós-graduandos e estagiários do Instituto de Pesca, Guilherme C. Rocha, Antonio Antonucci, Eduardo Gimenes, Robson Seriani, pela grande ajuda durante os experimentos, pela convivência e amizade.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca que contribuíram para a realização do trabalho. À Dr^a. Neuza Takahashi pelas dicas e sugestões. Ao Dr. Hércio Luiz de Almeida Marques, Dr^a Maria José Tavares Ranzani Paiva, Dr^a. Elizabeth Romagosa, Dr. Júlio Vicente Lombardi, Dr^a Cacilda Thais Mercante e Dr. Carlos Ishikawa que sempre me auxiliaram durante o trabalho.

Aos membros da banca de defesa e qualificação Dr. Márcio Hipólito, Dr. Carlos de Sousa Lucci, Dr^a. Heloísa Bueno, Dr^a. Neuza Takahashi, Dr^a. Adriana Sacioto Marcantônio, Dr. Fernando Maiorino e Dr^a Maria José Tavares Ranzani Paiva pelas sugestões que foram de grande contribuição para o enriquecimento do trabalho.

Ao Dr. Benedicto do Espírito Santo que deu grande auxílio na realização dos testes estatísticos.

Ao pessoal do Ranário de Pindamonhangaba, Adriana Sacioto Marcantônio, Andréia Pimenta e João Simões pela grande ajuda durante os experimentos.

Aos funcionários do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba (PRDTAVP), Djanil e Amauri, pela disponibilidade e fundamental ajuda na condução dos experimentos.

Ao Marcio “Perereca”, técnico responsável pelo Ranário experimental do CAUNESP, pela secagem da sobra de ração dos experimentos.

Ao CAUNESP pela parceria neste projeto.

À Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (FUNDAG) pela bolsa de estudo concedida.

Aos motoristas do Instituto de Pesca (em especial ao João Batista) que me acompanharam em muitas viagens para Pindamonhangaba.

Aos colegas de turma da Pós-graduação pelo convívio, auxílio e amizade.

Ao MSc. Antenor Aguiar Santos da Universidade Adventista de São Paulo - UNASP, por colaborar no teste piloto das análises imunológicas.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

À minha família, em especial, aos meus pais que me apoiaram e me incentivaram muito durante esta etapa.

À minha querida filha, Isabella, que chegou durante este trabalho, mas pôde acompanhar várias etapas, mesmo quando ainda estava na barriga.

Ao André, que me aturou durante este período, pela compreensão, amor e carinho, sempre me acompanhando e incentivando. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações iniciais sobre Ranicultura.....	2
1.2. Anatomia e fisiologia do aparelho digestório de girinos e rãs.....	3
1.3. Alimentos Funcionais.....	5
1.4. Probióticos.....	7
1.5. Efeitos fisiológicos.....	8
1.5.1. Imunidade.....	8
1.5.2. Hematologia.....	10
1.6. Justificativa e Objetivos.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. EXPERIMENTO I - Influência do uso de 4 probióticos sobre o desempenho de girinos de rãs-touro.....	16
2.1.1. Desempenho.....	18
2.1.2. Tratamento Estatístico.....	19
2.2. EXPERIMENTO II - Influência de 2 probióticos sobre o desempenho e fisiologia de girinos e imagos de rã-touro, em condições de laboratório.....	19
2.2.1. Desempenho.....	22
2.2.2. Análises Imunológicas.....	22
2.2.3. Análises Hematológicas.....	23
2.2.4. Tratamento Estatístico.....	24
2.3. EXPERIMENTO III - Efeito do probiótico bacillus subtilis no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (<i>Rana catesbeiana</i>).....	24
2.3.1. Desempenho.....	26
2.3.2. Análises Imunológicas.....	26

2.3.3. Análises Hematológicas.....	26
2.3.4. Tratamento Estatístico.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1. EXPERIMENTO I - Influência do uso de 4 probióticos sobre o desempenho de girinos de rãs-touro.....	29
3.1.1. Desempenho.....	29
3.2. EXPERIMENTO II - Influência de 2 probióticos sobre o desempenho e fisiologia de girinos e imagos de rã-touro, em condições de laboratório.....	32
3.2.1 - GIRINOS.....	32
3.2.1.1. Desempenho.....	33
3.2.1.2. Análises imunológicas.....	35
3.2.1.3. Análises Hematológicas.....	38
3.2.2. IMAGOS.....	43
3.2.2.1. Desempenho.....	43
3.2.2.2. Análises Imunológicas.....	45
3.2.2.3. Análises Hematológicas.....	47
3.3. EXPERIMENTO III - Efeito do probiótico <i>bacillus subtilis</i> no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (<i>Rana catesbeiana</i>).....	52
3.3.1 - GIRINOS.....	52
3.3.1.1. Desempenho.....	52
3.3.2. IMAGOS.....	53
3.3.2.1. Desempenho.....	54
3.3.2.2. Análises Imunológicas.....	57
3.3.2.3. Análises Hematológicas.....	59
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
4. CONCLUSÕES.....	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
6. ANEXOS.....	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Organograma do Teste com Probióticos resumindo os detalhes de cada etapa Experimental.....	16
FIGURA 2	Tanques utilizados no teste com probióticos em girinos de <i>R. catesbeiana</i> (Experimento I) – Ranário Experimental do PRDTAVP.....	17
FIGURA 3	Aquários utilizados no Experimento II do teste com probióticos em girinos.....	20
FIGURA 4	Caixas de manutenção dos animais em laboratório. Protótipo de micro ambientes para anuros semi-terrestres.....	21
FIGURA 5	Cochos localizados na área seca das caixas – Alimentação dos imagos no Experimento II.....	21
FIGURA 6	Baias utilizadas durante o experimento III no teste com probióticos, vista interna da estufa onde se localizavam as baias e vista interna da baia utilizada no experimento.....	26
FIGURA 7	Peso médio de girinos de <i>R. catesbeiana</i> durante o teste com probióticos.....	30
FIGURA 8	Mortalidade (%) média de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , obtidas durante o teste com probióticos.....	31
FIGURA 9	Peso médio (g) de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , por biometria em cada tratamento durante o teste com probióticos.....	33
FIGURA 10	Mortalidade média (%) de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , por biometria em cada tratamento durante o teste com probióticos.....	35
FIGURA 11	Médias da frequência percentual por tratamento da capacidade fagocítica de girinos de <i>R. catesbeiana</i> no teste com probiótico.....	36
FIGURA 12	Médias por tratamento do índice fagocítico de girinos de <i>R. catesbeiana</i> no teste com probiótico.....	37
FIGURA 13	Fotomicrografia de células fagocíticas presentes em lavado abdominal de girinos de rã-touro. Células fagocitando leveduras e célula fagocítica inativa. Microscópio de contraste de fases. Aumento de 400 X.....	38
FIGURA 14	Parâmetros hematológicos de girinos de <i>R. catesbeiana</i> em cada tratamento no teste com probiótico.....	39

FIGURA 15	Números absolutos médios dos leucócitos totais de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento no teste com probiótico.....	41
FIGURA 16	Valores em porcentagem e números absolutos da contagem diferencial de leucócitos de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , em cada tratamento no teste com probiótico.....	42
FIGURA 17	Fotomicrografia da extensão sanguínea de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico. Er = Eritrócito, Lf = Linfócito, Nt = Neutrófilo, Bs = Basófilo, Es = Eosinófilo e Mn = Monócito. Coloração Rosenfeld. Aumento de 1000 X.....	43
FIGURA 18	Peso médio de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por biometria, em cada tratamento durante o teste com probiótico.....	44
FIGURA 19	Médias da freqüência percentual por tratamento da capacidade fagocítica de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico.....	46
FIGURA 20	Médias por tratamento do índice fagocítico de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico.....	46
FIGURA 21	Parâmetros hematológicos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , em cada tratamento no teste com probiótico.....	48
FIGURA 22	Números absolutos médios dos leucócitos totais de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento no teste com probiótico.....	50
FIGURA 23	Valores em porcentagem e números absolutos da contagem diferencial de leucócitos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , em cada tratamento no teste com probiótico.....	51
FIGURA 24	Taxas de sobrevivência média (%) de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , ao final do teste com probiótico.....	53
FIGURA 25	Peso médio (g) de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento (T) durante o teste com probiótico. T1 – 2,5g/Kg de ração, T2 - 5g/Kg de ração e T3 - 10g/Kg de ração.....	54
FIGURA 26	Taxas de sobrevivência (%) média de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico.....	55
FIGURA 27	Médias da freqüência percentual por tratamento da capacidade fagocítica de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico....	58
FIGURA 28	Médias por tratamento do índice fagocítico de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico.....	58
FIGURA 29	Parâmetros hematológicos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , em cada tratamento (T) no teste com probiótico.....	60

FIGURA 30	Números absolutos médios de leucócitos totais de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento no teste com probiótico.....	62
FIGURA 31	Valores em porcentagem e números absolutos da contagem diferencial de leucócitos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , em cada tratamento no teste com probiótico.....	63
FIGURA 32	Organograma resumindo os resultados do Teste com Probióticos de cada etapa Experimental.....	65
FIGURA 33	Médias da freqüência percentual por tratamentos, em cada Experimento, da capacidade fagocítica de girinos e imagos de <i>R. catesbeiana</i> no teste com probiótico.....	92
FIGURA 34	Médias por tratamento, em cada Experimento, do índice fagocítico de girinos e imagos no teste com probiótico.....	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Princípio ativo dos probióticos utilizados no Experimento I com girinos <i>R. catesbeiana</i>	18
TABELA 2	Delineamento experimental do teste com probióticos (Experimento III).....	25
TABELA 3	Média e Desvio Padrão das variáveis físicas e químicas da água dos tanques de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , obtidas durante o Experimento I do teste com probióticos.....	29
TABELA 4	Médias do ganho de peso (g), conversão alimentar aparente (CA) e sobrevivência (%) de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento, obtidos durante o teste com probióticos.....	30
TABELA 5	Média e Desvio Padrão das variáveis físicas e químicas da água dos aquários de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , obtidas durante o Experimento II do teste com probióticos.....	32
TABELA 6	Médias de ganho de peso (g), conversão alimentar aparente (CA) e sobrevivência (%) de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento durante o teste com probióticos.....	34
TABELA 7	Médias e desvio padrão da frequência percentual da capacidade fagocítica e índice fagocítico de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico.....	36
TABELA 8	Médias e erro padrão dos parâmetros hematológicos de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , em cada tratamento no teste com probiótico....	38
TABELA 9	Médias por milímetro cúbico e erro padrão dos números absolutos de leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento no teste com probiótico.....	40
TABELA 10	Médias e erro padrão dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de girinos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento no teste com probiótico.....	41
TABELA 11	Médias de ganho de peso (g) e conversão alimentar (CA) de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento durante o teste com probióticos.....	45
TABELA 12	Médias e desvio padrão da frequência percentual da capacidade fagocítica e índice fagocítico de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico.....	45
TABELA 13	Médias e erro padrão dos parâmetros hematológicos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , em cada tratamento no teste com probiótico..	47

TABELA 14	Médias por milímetro cúbico e erro padrão dos números absolutos de leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento no teste com probiótico.....	49
TABELA 15	Médias e erro padrão dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento no teste com probiótico.....	50
TABELA 16	Médias e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água dos tanques de girinos.....	52
TABELA 17	Ganho de peso (g), conversão alimentar (CA) e sobrevivência (%) de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento durante o teste com probióticos.....	56
TABELA 18	Médias da frequência percentual da capacidade fagocítica e índice fagocítico de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , no teste com probiótico.....	57
TABELA 19	Médias e erro padrão dos parâmetros hematológicos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , em cada tratamento no teste com probiótico.....	59
TABELA 20	Médias por milímetro cúbico e erro padrão dos números absolutos de leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos de imagos de <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento, no teste com probiótico.....	61
TABELA 21	Médias e erro padrão dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de imagos <i>R. catesbeiana</i> , por tratamento no teste com probiótico.....	62
TABELA 22	Médias dos parâmetros hematológicos de girinos e imagos de <i>R. catesbeiana</i> , de cada Experimento no teste com probiótico.....	93
TABELA 23	Médias dos leucócitos totais e dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de girinos e imagos de <i>R. catesbeiana</i> , de cada Experimento no teste com probiótico.....	93

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do uso de probióticos sobre o desenvolvimento (crescimento, sobrevivência e conversão alimentar) de rãs-touro (*Rana catesbeiana*), nas fases de girinagem e metamorfose e, verificar a influência destes produtos sobre o quadro imunológico e hematológico de girinos e imagos mantidos em laboratório e no campo. Foram conduzidos três Experimentos. O Experimento I foi caracteristicamente exploratório, utilizando girinos de *Rana catesbeiana* recém eclodidos, realizado no campo, foram testados quatro diferentes produtos, sendo estes: P1 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium*, P2 - *Bacillus subtilis*, P3 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis* e P4 - *Sacharomyces cerevisiae*. No Experimento II trabalhou-se com dois probióticos (P1 e P2) durante a fase de metamorfose e, em laboratório. O Experimento III reuniu os melhores resultados dos testes anteriores elegendo-se o *Bacillus subtilis* (P2) que foi testado em três diferentes doses e, no campo. Não foram evidenciadas diferenças significativas para o ganho de peso, sobrevivência e conversão alimentar entre os tratamentos. As análises imunológicas apresentaram bons resultados nos grupos tratados com probiótico. No experimento II os girinos tratados com *Bacillus subtilis* tiveram o índice fagocítico significativamente maior. No experimento III, tanto o índice fagocítico quanto a capacidade fagocítica foram melhores nos grupos tratados com o *Bacillus subtilis*, sendo altamente significativos. A adição de probiótico à dieta dos girinos e imagos, demonstrou não influenciar nas análises hematológicas. As condições de criação podem influenciar de forma direta na eficiência dos aditivos promotores de crescimento. Práticas adequadas de manejo, como as utilizadas neste experimento, podem levar a resultados que não mostrem efeito significativo desses aditivos sobre o desempenho dos animais. Contudo, quando expostos a situações de desafio imunológico e, provavelmente, outras situações de estresse, os probióticos podem evidenciar sua ação melhorando o desempenho de girinos e imagos de rã-touro mantidas em laboratório ou em campo.

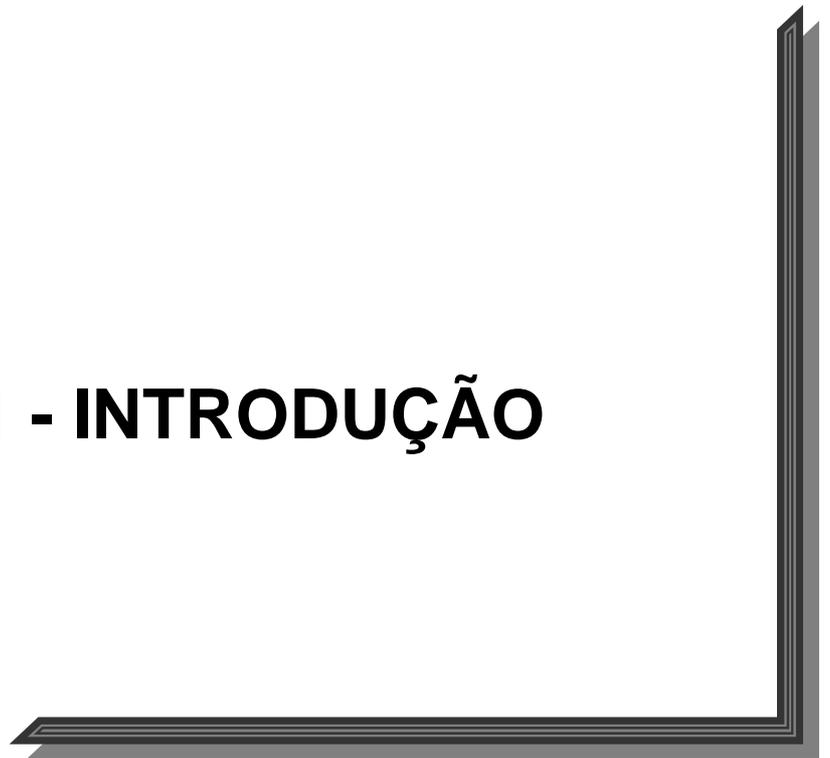
Palavras-chave: Rã-touro, *Rana catesbeiana*, girino, probiótico, imunologia, hematologia

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the influence of probiotics on the development (growth, survival and feed conversion) and on the immunological and hematological system of the bullfrog, *R. catesbeiana*, at the tadpole and metamorphic stages, maintained in laboratory and field. Three experiments were conducted; in the first one, carried out in the field, four different products were tested: P1 – *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, P2 – *Bacillus subtilis*, P3 – *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis* and P4 – *Sacharomyces cerevisiae*. In the second one, conducted in the laboratory, two probiotics (P1 and P2) were used during the metamorphose phase. In the third one, the best results obtained in the latter tests were considered, which resulted in the choice of *Bacillus subtilis* (P2), tested in three different doses in the field. No significant differences were observed on body gain, survival and feed conversion in all the treatments. The immunological analyses presented good results in the probiotics groups. In the second experiment the tadpoles that were treated with *Bacillus subtilis* showed a significantly higher fagocytic index. In the third experiment, both the fagocytic index and fagocytical capacity presented better results in the *Bacillus subtilis* groups, with highly significative results. The addition of probiotics to the tadpole and froglet diet did not influence the efficiency of growth promoters additives. Correct handling practices, as those used in this experiment, can generate results that do not show significant effects of these additives on bullfrog's performance. However when the animals are exposed to immunological challenge and others stress situations, probiotics can evidence its action on bullfrog tadpoles and froglets performance, maintained in the laboratory and field.

Key-words: Bullfrog, *R. catesbeiana*, tadpole, probiotic, immunology and hematology

1 - INTRODUÇÃO



1.1 Considerações iniciais sobre Ranicultura

A Ranicultura no Brasil teve início na década de 30 com a introdução dos primeiros 300 animais da espécie *Rana catesbeiana* Shaw (1802), popularmente conhecida como rã-touro. Originária do Norte dos EUA e Sudeste do Canadá, a espécie se adaptou muito bem às condições climáticas brasileiras, o que privilegiou seu aspecto de reprodução e engorda, passando a atingir peso de abate e maturidade sexual com maior precocidade (FERREIRA *et al.*, 2002).

O Brasil, mesmo estando na vanguarda da criação de rãs, necessita que esta atividade sofra ainda, alguns ajustes. Faz-se necessário o aumento do incentivo governamental (fiscal e financeiro), maior atenção dos órgãos públicos, ativação de pesquisas e técnicos especializados (FERREIRA, 2001). Nos últimos anos, esta área no Brasil vem crescendo de forma mais acelerada que em outros países. Atualmente, a rã-touro é a única espécie criada nos ranários brasileiros, apesar de haver em nosso país, várias espécies nativas (autóctones) (MELLO, 1997).

Em termos de produção, a criação de girinos e imagos saudáveis é uma etapa fundamental para o bom andamento de qualquer ranário. Segundo RIBEIRO FILHO (1998), na maioria dos ranários comerciais observa-se a ocorrência de mortalidade de girinos relacionada a vários fatores, como por exemplo: problemas de manejo, deficiência alimentar, instalações inadequadas, má qualidade de água e doenças provocadas por bactérias e fungos. Para obter sucesso na criação de girinos, é necessário conhecer a biologia do animal, incluindo a anatomia e fisiologia do aparelho digestório, para que possam formular rações compatíveis com as suas necessidades, proporcionando maior aproveitamento dos alimentos oferecidos, já que girinos bem nutridos irão, conseqüentemente, originar imagos mais saudáveis, que atingirão a fase adulta em menor tempo.

Segundo WIRZ *et al.*, (1992) a fase crítica da produção de *R. catesbeiana* é a fase pós-metamorfose, momento em que os animais encontram-se mais vulneráveis às variações ambientais, ocorrendo altas taxas de mortalidade. O girino nessa fase sofre mudanças fisiológicas e anatômicas muito complexas. Trocam o regime alimentar, de onívoro para carnívoro e apresentam mudanças fisiológicas que envolvem uma queda de resistência. Mesmo com manejo adequado, muitas vezes chega-se a atingir perda de 20% dos animais durante essa fase (FERREIRA *et al.*, 2002).

Da mesma forma, CASTRO e PINTO (2000) afirmam que a mortalidade de girinos e imagos pode constituir um ponto de estrangulamento na ranicultura. Instalações apropriadas e técnicas de manejo adequadas para esta fase são de fundamental importância para o desenvolvimento da atividade (LIMA e AGOSTINHO, 1989).

O desempenho dos girinos depende diretamente da oferta de alimentos balanceados em quantidade e qualidade adequada. Não são poucas às vezes em que a ocorrência de desenvolvimento anormal ou mortalidade são sinais prováveis de desordens nutricionais (ALBINATI, 2001).

As principais modificações que ocorreram na ranicultura, com relação à alimentação, surgiram a partir da década de 80. Atualmente são utilizadas rações comerciais, formuladas e balanceadas, na sua maioria, a partir do conhecimento das exigências nutricionais de peixes, uma vez que ainda não se dispõe de informações suficientes sobre as necessidades nutricionais das rãs (STÉFANI, 2001).

1.2. Anatomia e fisiologia do aparelho digestório de girinos e rãs

Assim que absorvem a vesícula vitelina, as larvas de rãs interiorizam as brânquias e começam a nadar livremente pela água, à procura de alimento. Dependendo da espécie, o girino terá um hábito alimentar característico, de

acordo com o aparelho bucal, a estratégia de captura e o ambiente que coloniza, podendo ser carnívoro, planctófago, iliófago, bentônico, consumindo também resíduos vegetais e animais e, até mesmo, as próprias fezes (ALBINATI, 1995). Desta forma, o tubo digestório dos girinos, na maioria das espécies, é indiferenciado, ou seja, pouco se distingue a região do estômago do intestino, que é alongado. Quando passam pela metamorfose, o tubo digestivo das rãs torna-se essencialmente carnívoro, com estômago grande e bem diferenciado do intestino, pois com este hábito, irão se alimentar de insetos, crustáceos e moluscos entre outros (DUELLMAN e TRUEB, 1986 e LIMA e AGOSTINHO, 1992).

Segundo KENNY (1969) existem três mecanismos básicos de estratégia alimentar de girinos: 1) raspagem bucal, com retirada de materiais aderidos a substratos, utilizando a mandíbula; 2) filtração à meia água, em que aspiram água até a faringe, sendo nesse segmento separadas as partículas de maior tamanho. A água, carreando partículas finas, atinge a câmara de filtração branquial, na qual acontece a separação das partículas, considerando a sua granulometria, havendo retenção das que possuem de 5 a 100 micrômetros que, misturadas com o muco, são transportadas por batimentos ciliares até o esôfago; 3) filtração na superfície, na qual proteínas, gorduras e bactérias aglutinadas a matérias flutuantes são captadas.

FONTANELLO *et al.* (1988) relatam que os girinos de rã-touro preferem apreender o alimento na superfície da água. Os girinos têm o hábito de se alimentar continuamente. Além de raspar os alimentos, os girinos concentram, por filtração, bactérias, protozoários e detritos orgânicos presentes em suspensão na água e na coluna superficial (ALBINATI, 1995).

No decorrer da metamorfose, o trato gastrointestinal dos girinos passa por uma série de modificações anatomo-fisiológicas. ALBINATI (1995) verificou redução significativa do tubo digestório de girinos de rã-touro durante a

metamorfose, refletindo a mudança do hábito alimentar dos girinos, de onívoros, na fase inicial, para carnívoros, após a metamorfose.

As rãs em sua fase terrestre apresentam um comportamento alimentar (consumo, conversão e crescimento) irregular, que varia principalmente em função da temperatura, tipo de alimento ofertado e acesso ao alimento. Para análise e estabelecimento de índices neste período, são necessários longos períodos de observações diárias. Entretanto, é nos primeiros meses após a metamorfose que estes animais apresentam as melhores taxas de ganho de peso (CULLEY JR. E GRAVOIS, 1971; WIRZ *et al.*, 1992 e CASTRO, 1995).

1.3. Alimentos Funcionais

São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde através de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito está associado à redução do risco a certas doenças e não à sua cura. São produtos alimentícios que produzem benefícios específicos, ou que contém níveis significantes de componentes biologicamente ativos, para melhoria da saúde, além dos seus nutrientes básicos tradicionais (SANDERS, 1998).

Contudo, alimentos funcionais sozinhos não garantem boa saúde, eles fazem parte do conjunto total incluindo boa nutrição com alimentos balanceados, boas práticas de manejo e genética. Desta maneira pode-se produzir animais com mais saúde, que reverte em ganhos produtivos à atividade pecuária e oferta de produtos animais com maior segurança ao consumidor final. Esta é a tendência mundial na produção de alimentos mais saudáveis, com menos resíduos químicos, conseqüentemente, com menos riscos para o consumidor. Os alimentos funcionais podem vir a ser uma alternativa viável e saudável à substituição dos promotores de crescimento e à redução dos antibióticos e quimioterápicos disponíveis à nutrição e terapêutica animal (CASTRO, 2003).

Nos últimos anos, o conceito de alimentos funcionais passou a concentrar-se de maneira intensiva nos aditivos alimentares que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal. Os prebióticos e os probióticos são aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais (ZIEMER e GIBSON, 1998).

Prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. O prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. (GIBSON e ROBERFROID, 1995; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002).

A principal ação dos prebióticos é estimular o crescimento e/ou ativar o metabolismo de algum grupo de bactérias benéficas do trato intestinal. Alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras álcoois de açúcares e oligossacarídeos são considerados substâncias prebióticas (CASTRO, 2003).

Já os probióticos são microorganismos vivos (o que inclui bactérias lácticas e leveduras) que exibem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após ingestão, devido à melhoria das propriedades da microbiota intestinal (SANDERS e KLAENHAMMER, 2001).

Um produto referido como simbiótico é aquele no qual um probiótico e um prebiótico estão combinados. A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico. O consumo de probióticos e de prebióticos selecionados apropriadamente pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato-microrganismo ideais (HOLZAPFEL e SCHILLINGER,

2002; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Desta maneira, os prebióticos agem intimamente relacionados aos probióticos e constituem o alimento das bactérias probióticas (CASTRO, 2003).

1.4. Probióticos

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida”, e tem sido empregado das maneiras mais diversas ao longo dos últimos anos. Tal termo foi inicialmente proposto como descritivo de compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano (LILLY e STILLWELL, 1965). Posteriormente, PARKER (1974) definiu probiótico como relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Esta definição era, no entanto, pouco satisfatória uma vez que a palavra “substância” poderia incluir suplementos tais como antibióticos (cuja função é virtualmente oposta).

Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é que eles são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS e KLAENHAMMER, 2001).

Segundo CASTRO (2003) os probióticos são aditivos alimentares compostos por microorganismos vivos, em estado de latência, que afetam benéficamente o desenvolvimento dos organismos por propiciar-lhe um balanço microbiano gastrointestinal desejável.

As culturas probióticas são suplementos microbianos que aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos (GUZMÁN, 1992).

Estes produtos precisam ser capazes de exercer efeitos benéficos no hospedeiro. Um organismo probiótico deve necessariamente sobreviver às

condições adversas do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER e GIBSON, 1998; LEE *et al.*, 1999). Para GUZMÁN (1992), a ação benéfica do uso de probióticos ocorre de duas formas: a primeira, determina melhores índices zootécnicos (maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar) e a segunda, reduz a colonização intestinal por alguns patógenos.

O mecanismo de ação dos probióticos ainda não está inteiramente elucidado. São atribuídas a eles várias ações positivas como: o auxílio na digestão e absorção de nutrientes; ação inibitória no crescimento de bactérias patogênicas (produção de bacteriocinas); produção de ácido lático que reduz o pH do meio, exercendo efeito antibacteriano (FULLER, 1977); produção de metabólitos que inibem bactérias Gram negativas e positivas patogênicas; produção de vitaminas do grupo B (FULLER, 1989); estímulo do sistema imune através da ativação dos macrófagos; ativação do sistema imune contra células malignas e restauração da microbiota intestinal após tratamento com antibiótico (CASTRO, 2003).

FULLER (1989) enumerou três possíveis mecanismos de ação dos probióticos, sendo o primeiro deles a competição por sítios de adesão. O segundo, seria a alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática, e o terceiro, seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos.

1.5. Efeitos fisiológicos

1.5.1. Imunidade

Bons níveis zootécnicos dependem diretamente da homeostase do sistema imune, garantindo que o animal se mantenha livre de patógenos,

oportunistas ou não. Assim, manter a imunocompetência dos animais de produção é extremamente desejável, uma vez que, fatores exógenos que desencadeiam nesses animais a imunossupressão e, conseqüentemente, a ocorrência de processos infecciosos, podem resultar em queda dos índices zootécnicos e prejuízos econômicos relevantes ao produtor (MORGULIS, 2002).

Embora haja diversos estudos voltados para a prevenção de doenças e o aumento da resposta imune com a utilização de probióticos principalmente na medicina humana, os mecanismos específicos de ação ainda não estão bem esclarecidos (ERICKSON e HUBBARD, 2000).

Os macrófagos são células fagocíticas consideradas como sendo primeira frente de defesa contra antígenos invasores. São células brancas que se originam de monócitos, fazem parte do sistema imunológico e são capazes de realizar a fagocitose, sendo essa a capacidade de ingerir microrganismos. Além da atividade fagocítica, estas células exercem inúmeras outras funções, dentre elas: o reconhecimento antigênico e processamento destes antígenos no interior dos fagossomos para posterior apresentação antigênica para linfócitos, quimiotaxia e produção de mediadores químicos importantes, as citocinas, para a ativação adequada do sistema imune adquirido (mediado por linfócitos). As funções dessas células podem ser moduladas de acordo com fatores nutricionais, genéticos e ambientais (QURESHI, 2003). A fagocitose não é um processo simples, nela estão envolvidas várias etapas nas quais ocorrerão: ingestão, morte e digestão do antígeno.

Uma resposta imune eficiente está intimamente relacionada com a presença de nutrientes imunomoduladores na dieta (QURESHI, 2003), estes vão atuar diminuindo o estresse imunológico e, desta forma, impedindo a mobilização de nutrientes para atividades que não estejam ligadas com a produção animal, não prejudicando o desempenho zootécnico do mesmo (FERKET, 2003).

Relatos de literatura indicam que vários tipos de probióticos existentes possuem algum efeito imunomodulador (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004). Acredita-se que as alterações imunológicas induzidas pelos probióticos não estão limitadas à imunidade local da mucosa intestinal, há também relatos de efeitos sobre a resposta imune sistêmica (ERICKSON e HUBBARD, 2000). Segundo estes autores, há hipóteses de que são os produtos da parede celular das bactérias (peptídeosglicanos e lipopolissacarídeos) que compõem os probióticos que co-estimulam a indução da resposta imune. Células endoteliais, macrófagos, células da musculatura lisa e neutrófilos são ativados por estes componentes da parede celular e, em resposta, liberam outros mediadores químicos, por exemplo: as citocinas.

Por ser considerada uma primeira ativação de toda a resposta imune subsequente, julga-se importante a mensuração da atividade fagocítica dos fagócitos. É após a fagocitose que uma grande variedade de mediadores químicos é liberada, resultando em recrutamento de células imunocompetentes e com isso uma resposta imunológica sistêmica (ISOLAURI *et al.*, 2001).

As técnicas de análise para determinação do índice fagocítico e capacidade fagocítica são de fácil execução, baixo custo e apresentam resultados precisos.

1.5.2. Hematologia

Através do estudo do sangue em seus aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos, podem ser obtidas informações sobre o estado geral do animal (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Entretanto, principalmente por serem animais ectotérmicos, o quadro hematológico dos anfíbios pode variar de acordo com as condições em que se encontram, como clima, alimentação, idade, peso e sexo (HARRIS, 1972; PENHA *et al.*, 1996; PALENSKE e SAUNDERS, 2003; FIORANELLI *et al.*, 2003; 2004; COPPO *et al.*, 2005).

As variáveis da série vermelha, eritrograma, são de grande valia na identificação de processos anemiantes (MAHONEY e MCNULTY, 1992), enquanto o leucograma pode ser empregado como auxílio no diagnóstico dos processos infecciosos (RANZANI-PAIVA e EIRAS, 1992) e outros estados de desequilíbrio homeostático.

O sangue dos anfíbios é composto por plasma, eritrócitos, leucócitos e trombócitos (DUELLMAN e TRUEB, 1986). DIAS (1992) relatou a carência de informações sobre a composição celular do sangue de anfíbios. Mas, artigos recentes como FERREIRA *et al.* (2003), COPPO *et al.* (2005) e FIORANELLI *et al.* (2004) vem abordando cada vez mais este assunto.

Nos anfíbios os glóbulos vermelhos, também chamados eritrócitos, são nucleados e se apresentam quase que universalmente ovais. Segundo DUELLMAN e TRUEB (1986) existem diferenças morfológicas entre os glóbulos vermelhos de formas adultas e larvais de anuros. Singularmente, os eritrócitos dos girinos são maiores que os de rãs metamorfoseadas.

Os glóbulos brancos, ou leucócitos são de dois tipos: os agranulócitos, sem granulações visíveis no citoplasma, que são produzidos nos lóbulos linfáticos e no baço e constituem os linfócitos e os monócitos; e os granulócitos, que se formam na medula óssea e se classificam em neutrófilos, basófilos e eosinófilos, cujos citoplasmas apresentam granulações visíveis com diferentes afinidades pelos corantes de Romanowisk, corando-se pelas cores neutras, básicas ou ácidas respectivamente. A principal função dos glóbulos brancos é a defesa do organismo contra a ação de corpos estranhos que penetrem nos tecidos (TURNER , 1988).

Segundo COOPER (1967) os granulócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos apresentam atividade fagocitária, estando intimamente relacionados com os mecanismos de defesa do hospedeiro, particularmente contra

bactérias. Os agranulócitos, monócitos apresentam marcante atividade macrofágica, enquanto os linfócitos estão relacionados com a estimulação do crescimento dos tecidos e à síntese de anticorpos.

A função e a ocorrência dos trombócitos ainda permanece controversa. Os trombócitos têm sido geralmente considerados como responsáveis pelo processo de coagulação sangüínea. São células nucleadas, com função similar às plaquetas dos mamíferos. Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são fragmentos de células anucleadas, os trombócitos de anfíbios são células completas, predominantemente elípticas, arredondadas ou fusiformes, com núcleo fusiforme (PENHA *et al.*, 1996). A atividade fagocitária em trombócitos foi descrita em anfíbios por DIAS e SINHORINI (1991) e PENHA *et al.*, (1996).

A Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL), é um método que permite ao pesquisador ter um panorama da porcentagem dos tipos de células existentes no sangue (RANZANI-PAIVA, 1995).

O método do microhematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971) é o mais utilizado em laboratórios clínicos de medicina humana, para medir o volume dos eritócitos sedimentados. Este teste é de simples realização, utilizando-se apenas uma centrífuga de alta velocidade, tubos capilares e cartão de leitura. É também bastante utilizado em organismos aquáticos por requerer pequenas quantidades de sangue e ser de fácil realização em campo. O princípio deste método é compactar os eritrócitos na parte inferior do tubo e o volume por eles ocupado em relação ao sangue total.

A determinação da concentração de hemoglobina é um dos meios mais simples e usuais como indicador de anemias. O método empregado para organismos aquáticos é o cianometahemoglobina. Este método consiste em adicionar sangue em uma solução contendo ferricianeto de potássio e cianeto de potássio (COLLIER, 1944).

Outra análise realizada em hematologia é a contagem de eritrócitos. O número de eritrócitos, bastante usados em pesquisas hematológicas de mamíferos, é uma análise que vem sendo utilizada em organismos aquáticos pelo método visual na câmara hematimétrica de Neubauer (RANZANI-PAIVA, 1995).

Em hematologia são calculados os índices hematimétricos a partir do número de eritrócitos por mm^3 de sangue, da hemoglobina e do hematócrito. São eles: Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Esses índices são utilizados na caracterização morfológica do sangue dos animais e das anemias. O VCM, que expressa o volume médio dos eritrócitos em fentolitro (fL), é maior em peixes, anfíbios, répteis e aves do que em mamíferos, devido à presença de núcleo nas células desses animais (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). A CHCM indica o valor médio da porcentagem em peso da hemoglobina por eritrócito e varia pouco entre as espécies. BASTOS (1966) sugere que a CHCM dos peixes pode ser menor do que a dos mamíferos, devido ao menor volume do citoplasma nos eritrócitos nucleados dos animais.

1.6. Justificativa e Objetivos

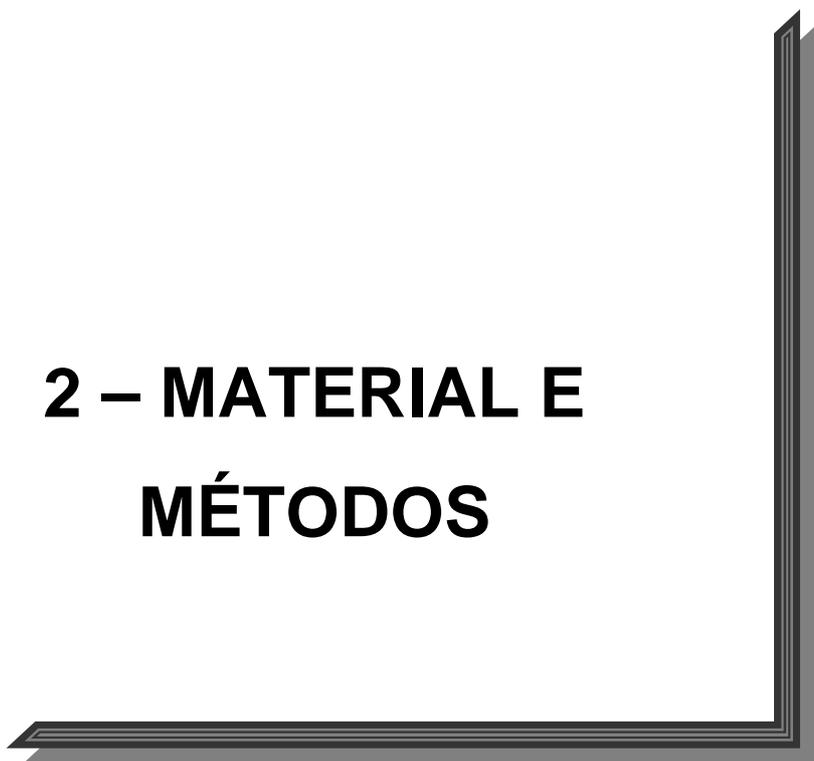
A exigência com a qualidade de produtos de origem animal é cada vez maior. Alguns autores questionam o uso indiscriminado de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal. Isto vem sendo questionado devido à possível relação existente entre o uso destes medicamentos e o aumento da resistência bacteriana nos animais e no homem (FULLER, 1989 e FERKET, 2003). Ainda, o alto custo de produção, devido principalmente ao elevado preço das rações comerciais tem levado os pesquisadores a

estudarem formas de aumentar a eficiência alimentar e a taxa de crescimento dos girinos e rãs.

Neste cenário, muitas pesquisas estão voltadas para a busca de alternativas que mantenham a alta produtividade e que sejam economicamente viáveis, sem prejudicar a saúde humana e animal, atendendo, desta forma, às novas exigências do consumidor e do mercado externo. Dentre estas, destaca-se o uso de probióticos que, quando suplementados na dieta, garantem isenção de resíduos medicamentosos nos produtos de origem animal e contribuem para a melhoria do desempenho e da saúde do animal (JIN, 1997, ZULKIFLI, 2000).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do uso de probióticos sobre o desenvolvimento (crescimento, sobrevivência e conversão alimentar) de rãs-touro (*Rana catesbeiana*), nas fases de girinagem e metamorfose, verificando a influência destes produtos sobre o quadro imunológico e hematológico de girinos e imagos mantidos em laboratório e no campo.

2 – MATERIAL E MÉTODOS



Foram conduzidos três Experimentos para o teste com probióticos (Figura 1). O Experimento I foi caracteristicamente exploratório, testando quatro diferentes produtos em girinos de *Rana catesbeiana* recém eclodidos e realizado no campo. No Experimento II trabalhou-se com dois probióticos durante a fase de metamorfose e em laboratório. O Experimento III reuniu os melhores resultados dos testes anteriores elegendo-se um único probiótico que foi testado em três diferentes doses e no campo.

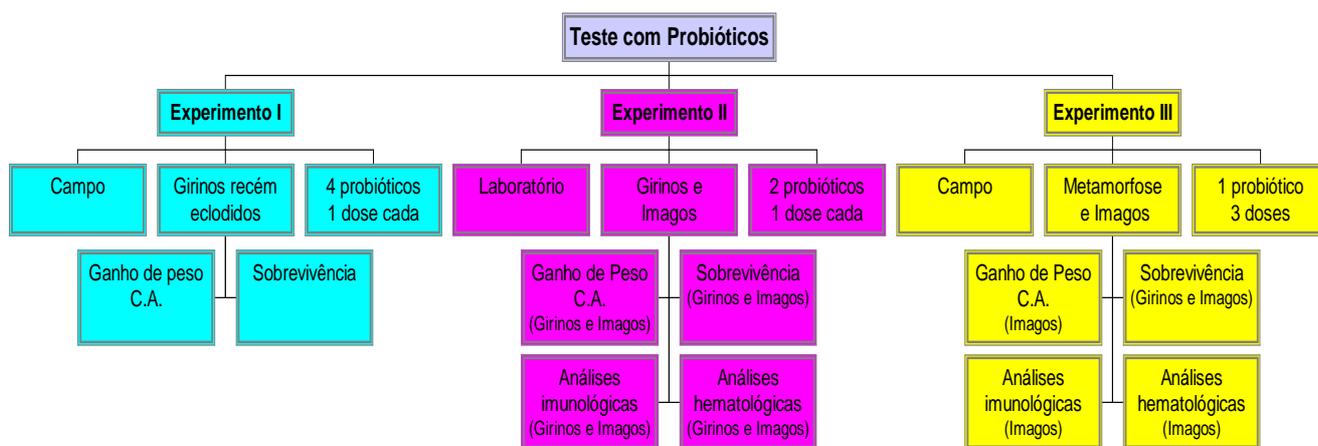


FIGURA 1 – Organograma do Teste com Probióticos resumindo os detalhes de cada etapa Experimental

A seguir encontram-se detalhadas cada uma das etapas experimentais.

2.1. EXPERIMENTO I - INFLUÊNCIA DO USO DE 4 PROBIÓTICOS SOBRE O DESEMPENHO DE GIRINOS DE RÃS-TOURO

O teste foi conduzido no ranário experimental do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba (PRDTAVP), em Pindamonhangaba – SP / Brasil.

Utilizou-se 3.000 girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) recém eclodidos, procedentes de desovas ocorridas no próprio ranário, com peso médio inicial de 0,01g, na densidade de 1 girino/L.

Os animais foram colocados em tanques de alvenaria de 1,0 x 1,0 x 0,2 m, com fluxo contínuo de água, totalizando 15 tanques, com capacidade de 200 L cada (Figura 2), localizados dentro de um galpão de alvenaria, com janelas laterais teladas, coberto com telhas de amianto.



FIGURA 2 - Tanques utilizados no teste com probióticos em girinos de *R. catesbeiana* (Experimento I) – Ranário Experimental do PRDTAVP

O experimento foi conduzido com 5 tratamentos, utilizando 4 probióticos comerciais diferentes (C - Controle, P1 - Probiótico 1, P2 - Probiótico 2, P3 - Probiótico 3 e P4 - Probiótico 4) e 3 réplicas simultâneas. A composição de cada probiótico encontra-se na Tabela 1.

TABELA 1 - Princípio ativo dos probióticos utilizados no Experimento I com girinos de *R. catesbeiana*

Probiótico	Princípio Ativo	UFC/g
Probiótico 1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> e <i>Enterococcus faecium</i>	3×10^6
Probiótico 2	<i>Bacillus subtilis</i>	1×10^9
Probiótico 3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus lactis</i>	1×10^6
Probiótico 4	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	7×10^8

Por serem comercializados na forma de pó, e com granulometria inferior a 0,21 mm, os produtos foram facilmente misturados à ração farelada e ofertados aos girinos. Apenas o Probiótico 3 foi diluído diretamente na água, conforme indicação do fabricante. As doses utilizadas foram recomendadas pelos fabricantes: 10g/Kg de ração para P1 e P2, 6g/ton de água para P3 e 5g/kg de ração para P4.

A ração comercial utilizada era própria para girinos, fornecida pela Cooperativa Agropecuária de Atibaia (CAAT), contendo 45% de proteína bruta (PB), 5% de fibra bruta (FB) e 2,7% extrato etéreo (EE). A alimentação foi fornecida duas vezes por dia (manhã e tarde) compreendendo 10% da biomassa/dia durante o primeiro mês, 5% da biomassa/dia durante o segundo mês, e 2% da biomassa/dia durante o terceiro mês de experimentação. Por ocasião da oferta de alimento a água de abastecimento dos tanques era fechada por 1 hora.

As temperaturas máximas e mínimas da água e do ar foram aferidas diariamente. As análises físicas e químicas da água foram feitas semanalmente: oxigênio, condutividade elétrica, pH e amônia total. Nesta ocasião realizava-se também a sifonagem dos tanques. O experimento foi conduzido durante 84 dias, e as biometrias foram realizadas a cada 28 dias.

2.1.1. Desempenho

Para determinar o desempenho de produção foram avaliados, ao final do experimento, o ganho de peso (GP), a taxa de sobrevivência (S) e a conversão alimentar aparente (CA) através das fórmulas:

$$GP = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

$$S = \frac{\text{total de animais final}}{\text{total de animais inicial}} \times 100$$

$$CA = \frac{\text{ração fornecida}}{\text{ganho de peso}}$$

2.1.2. Tratamento Estatístico

Para verificar diferenças das médias de desempenho e sobrevivência entre os grupos tratados com os diferentes probióticos e o controle foi realizada a análise descritiva das variáveis do estudo, apresentadas em termos de seus valores de tendência central e de dispersão. Foram realizados testes para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias (D'Agostino-Pearson e Bartlett), e para constatação de diferenças significativas entre tratamentos realizou-se análise de variância (ANOVA-1 fator) seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ (ZAR, 1996).

2.2. EXPERIMENTO II - INFLUÊNCIA DE 2 PROBIÓTICOS SOBRE O DESEMPENHO E FISIOLOGIA DE GIRINOS E IMAGOS DE RÃ-TOURO, EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Toxicologia do Instituto de Pesca/São Paulo – SP. Foram utilizados 270 girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) a partir do estágio 36 de GOSNER (1960), com peso médio inicial de $2,95 \pm 0,06g$, procedentes de um ranário comercial no Vale do Paraíba/SP.

Baseado nos resultados do Experimento I foram testados dois probióticos (P1-*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* (3

x 10^6 UFC/g) e P2-*Bacillus subtilis* (10^9 UFC/g)), adicionados à ração, na dose de 10g/kg ração para cada probiótico, mais o grupo controle conduzidos com 3 réplicas simultâneas, totalizando 9 aquários. Foram utilizados aquários de 55 x 30 x 35 cm, preenchidos com 30L de água de abastecimento declorada por pernoite (Figura 3). A densidade utilizada foi de 1 girino/L.



FIGURA 3 – Aquários utilizados no Experimento II do teste com probióticos em girinos

Os probióticos foram adicionados diretamente à ração e ofertados aos animais. Os girinos foram alimentados com a mesma ração do Experimento I (CAAT: 45% PB, 5% FB, 2,7% EE). A alimentação foi fornecida diariamente, compreendendo 1% da biomassa/dia.

Os aquários eram sifonados diariamente e completados com água declorada. As análises físicas e químicas da água foram feitas semanalmente: temperatura, oxigênio, condutividade elétrica, pH e amônia total. Nesta ocasião realizava-se também a troca total da água dos aquários.

Após a transformação dos girinos, as rãs recém metamorfoseadas foram transferidas para caixas de polipropileno, semi-secas, com área de 1.410 cm², desenvolvidas por BUENO GUIMARÃES (1999) como protótipo de micro ambientes para anuros semi-terrestres (Figura 4).



FIGURA 4 – Caixas de manutenção dos animais em laboratório. Protótipo de micro ambientes para anuros semi-terrestres. A – Vista geral. B – Detalhe da caixa

Os imagos passaram a se alimentar com ração extrusada, acrescida da respectiva dose de probiótico utilizada anteriormente. A ração utilizada para os imagos foi da marca Purina - NutriPeixe com 45% PB, 14% FB e 14% EE.

Para induzir as rãs a se alimentar foram adicionadas larvas de tenébrio à ração. A ração foi fornecida diariamente *ad libitum*, em cochos localizados na área seca das caixas (Figura 5). Diariamente as caixas eram esvaziadas e limpas.



FIGURA 5 - Cochos localizados na área seca das caixas – Alimentação dos imagos no Experimento II

2.2.1. Desempenho

Para determinar o desempenho de produção dos girinos e imagos foram avaliados, ao final do experimento, o ganho de peso (GP), a taxa de sobrevivência (S) e a conversão alimentar (CA) seguindo as mesmas fórmulas utilizadas no Experimento I.

Para quantificar o consumo de ração dos imagos, toda a sobra de ração do dia anterior, de cada caixa, foi recolhida e armazenada para congelamento. Ao final do experimento a sobra de ração foi seca em estufa com recirculação de ar com temperatura de 50°C por 24h. Com os valores de consumo de ração em matéria natural e do ganho de peso foi calculada a conversão alimentar.

2.2.2. Análises Imunológicas

Ao final do experimento foram utilizados 6 girinos e 6 imagos de cada tratamento para a realização dos testes imunológicos. Injetou-se 2 mL de uma solução de levedura com concentração de 11.000 cel/mm³ na cavidade abdominal. Após o período de 1:30h de incubação (determinado em testes preliminares) os animais inoculados com a levedura foram anestesiados profundamente em solução de benzocaína (1g de benzocaína/1L de água) até a morte. Após o sacrifício foi feito um corte na lateral do abdome, por onde foi realizado o lavado da cavidade abdominal com solução de Ringer para Anfíbios¹. Esse processo foi realizado com cuidado para que o lavado não fosse contaminado por sangue da cavidade abdominal. O líquido aspirado da cavidade abdominal foi centrifugado a 1.500 rpm, por 5 minutos, em tubo plástico. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido, colocado entre lâmina e lamínula e levado ao microscópio de contraste de fases para contagem de fagócitos.

¹ Solução fisiológica cuja concentração está próxima ao meio interno dos anfíbios, composta por: Bicarbonato de sódio (100 mg), Cloreto de Cálcio (100 mg), Cloreto de Potássio (75 mg), Cloreto de Sódio (6 g) e água destilada (1028 mL).

Com os resultados das contagens do número de fagócitos ativos e do número total de leveduras no interior das células fagocíticas foram calculados os índices de Capacidade Fagocítica (CF) e Índice Fagocítico (IF) segundo metodologia descrita por SILVA *et al.* (2002 e 2005), conforme as fórmulas:

$$CF = \frac{\text{número de fagócitos fagocitando}}{100 \text{ fagócitos}}$$

$$IF = \frac{\text{número total de leveduras fagocitadas}}{\text{número de fagócitos fagocitando.}}$$

2.2.3. Análises Hematológicas

Para as análises hematológicas foram retiradas amostras de sangue de outros 6 girinos e 6 imagos de cada tratamento. O sangue foi coletado através do rompimento do vaso caudal dos girinos e da artéria ciática dos imagos. Os animais foram anestesiados com anestésico local (lidocaína). Com o sangue coletado foi realizado: contagem de eritrócitos, em câmara de Neubauer; hematócrito, pelo método de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.*, (1971); taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944); foram feitas extensões sangüíneas, coradas pelo método de ROSENFELD (1947) para a contagem diferencial de leucócitos, contagem total de leucócitos e trombócitos. Com os valores obtidos do número de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos absolutos segundo WINTROBE (1934): volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (ANEXO 1).

2.2.4. Tratamento Estatístico

Para verificar diferenças das médias de desempenho (ganho de peso, sobrevivência e conversão alimentar), parâmetros hematológicos e imunológicos, dos grupos tratados com probiótico e o grupo controle foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ (ZAR, 1996).

2.3. EXPERIMENTO III - EFEITO DO PROBIÓTICO *Bacillus subtilis* NO CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA E FISIOLOGIA DE RÃS-TOURO (*Rana catesbeiana*)

A partir dos resultados dos Experimentos I e II realizou-se este terceiro teste que foi conduzido no ranário experimental do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba (PRDTAVP), em Pindamonhangaba – SP. Foram utilizados 1.200 girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) a partir do estágio 36 de GOSNER (1960), com peso médio inicial de $4,26 \pm 1,06$ g, procedentes de um ranário comercial no Vale do Paraíba/SP.

O probiótico utilizado foi *Bacillus subtilis* (10^9 UFC/g), testado em três doses diferentes. O teste foi conduzido com quatro tratamentos e três réplicas simultâneas, totalizando 12 tanques (Tabela 2).

Foram utilizados tanques de alvenaria, de 1,0 x 1,0 x 0,2 m, com fluxo contínuo de água e completados com 100 L cada. A densidade utilizada foi de 1 girino/L. O probiótico foi adicionado diretamente à ração para ser ofertado aos animais. Os girinos foram alimentados com ração farelada Poli-nutri (45% PB, 6% FB, 9% EE). A alimentação foi fornecida diariamente, compreendendo 2% da biomassa/dia.

TABELA 2 – Delineamento experimental do teste com probióticos (Experimento III)

Tratamentos	Princípio Ativo	Doses
Controle	Sem adição de probiótico	--
Tratamento 1	<i>Bacillus subtilis</i>	2,5g/Kg de ração
Tratamento 2	<i>Bacillus subtilis</i>	5g/Kg de ração
Tratamento 3	<i>Bacillus subtilis</i>	10g/Kg de ração

As análises físicas e químicas da água foram feitas semanalmente: temperatura, oxigênio, condutividade elétrica, pH e amônia total. Nesta ocasião realizava-se também a sifonagem dos tanques.

Os animais foram mantidos nestas condições até que 20% completassem a metamorfose durante o mesmo período, para que, desta forma, fosse obtido o maior número de imagos com o mesmo tempo de vida após a metamorfose.

As rãs recém metamorfoseadas foram transferidas para baias de pré-engorda, semi-secas, medindo 1,0 x 1,5 m (Figura 6). Nesta etapa do experimento foram utilizados 240 imagos, que já haviam sido tratados com o probiótico antes da metamorfose. Os imagos passaram a se alimentar com ração extrusada Poli-nutri (40% PB, 6% FB, 8% EE), acrescida da respectiva dose de probiótico utilizada anteriormente. Após a metamorfose os animais foram acompanhados por mais 40 dias.

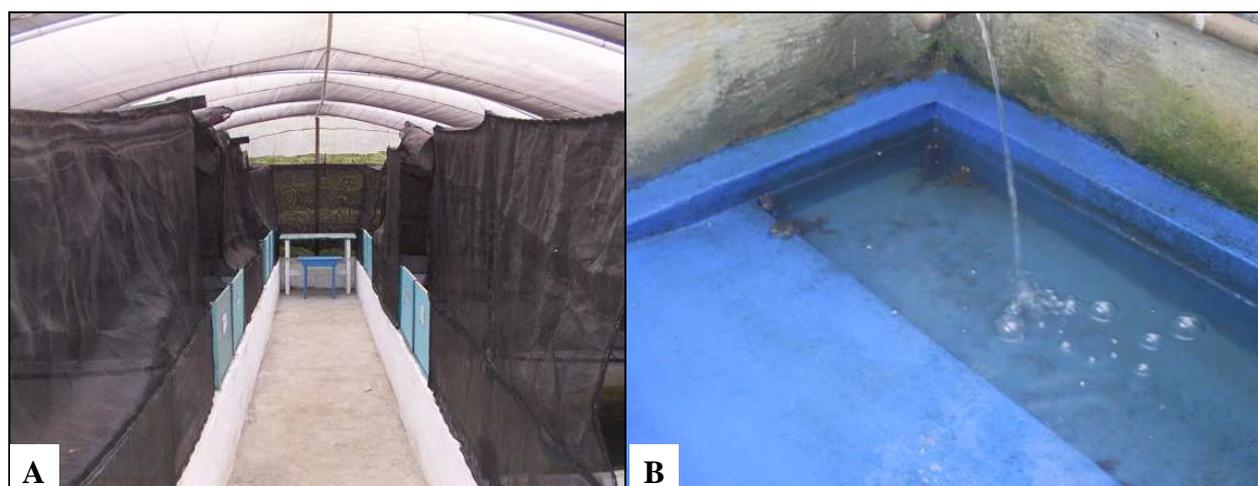


FIGURA 6 – Baias utilizadas durante o experimento III no teste com probióticos. A – vista interna da estufa onde se localizavam as baias. B – vista interna da baia utilizada no experimento

2.3.1. Desempenho

As biometrias foram realizadas a cada 7 dias. Para determinar o desempenho de produção dos imagos foram avaliados, ao final do experimento, o ganho de peso, a taxa de sobrevivência e a conversão alimentar.

2.3.2. Análises Imunológicas

Ao final do experimento foram utilizados 6 imagos de cada tratamento para a realização dos testes imunológicos. A metodologia empregada para a realização das análises foi a mesma utilizada no Experimento II.

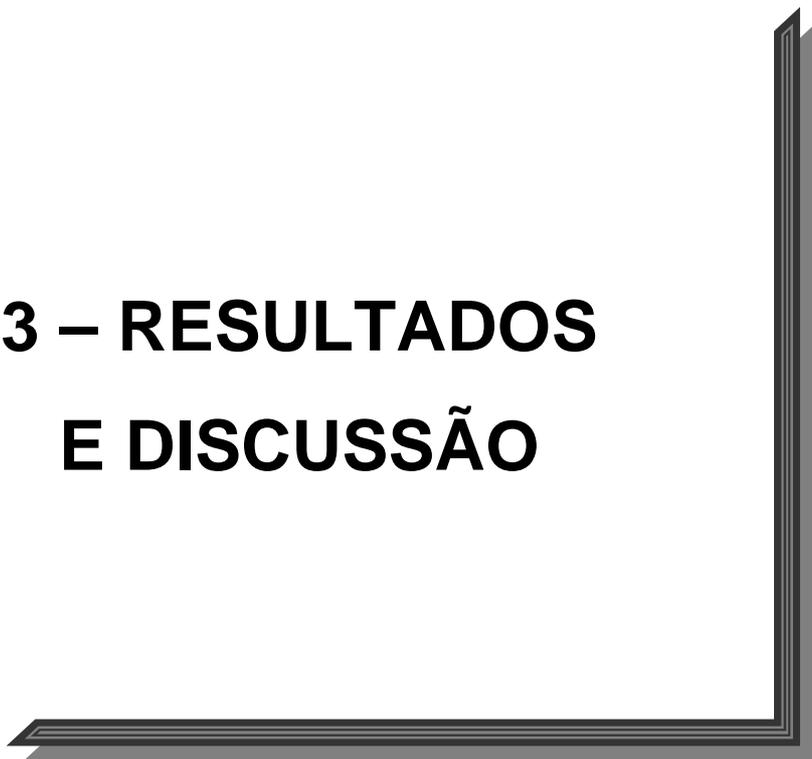
2.3.3. Análises Hematológicas

Para as análises hematológicas foram retiradas amostras de sangue de outros 6 imagos de cada tratamento. A metodologia empregada nos testes hematológicos também foi a mesma utilizada no Experimento II.

2.3.4. Tratamento Estatístico

Para verificar diferenças das médias de desempenho (sobrevivência e conversão alimentar), parâmetros hematológicos e imunológicos, dos grupos tratados com probiótico e o grupo controle foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste de Tukey. A relação entre as variáveis dependentes e independentes foi verificada através de teste de regressão. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ (ZAR, 1996).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO



3.1. EXPERIMENTO I - INFLUÊNCIA DO USO DE 4 PROBIÓTICOS SOBRE O DESEMPENHO DE GIRINOS DE RÃS-TOURO

As temperaturas máximas médias da água foram $24,2 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ e as mínimas e $20,8 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$. As demais variáveis físicas e químicas da água monitoradas estão apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 – Média e Desvio Padrão das variáveis físicas e químicas da água dos tanques de girinos de *R. catesbeiana*, obtidas durante o Experimento I do teste com probióticos

Tratamentos	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	% de saturação	pH	Condutividade Elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Amônia não ionizada NH_3 $\mu\text{g}/\text{L}$
Controle	$6,50 \pm 1,29$	$73,49 \pm 13,3$	$6,81 \pm 0,52$	$47,20 \pm 6,63$	$0,45 \pm 0,11$
Probiótico 1	$6,59 \pm 1,31$	$74,27 \pm 13,4$	$6,76 \pm 0,48$	$46,90 \pm 6,75$	$0,33 \pm 0,10$
Probiótico 2	$6,46 \pm 1,40$	$72,88 \pm 14,8$	$6,82 \pm 0,52$	$47,38 \pm 6,67$	$0,46 \pm 0,26$
Probiótico 3	$6,49 \pm 1,20$	$71,37 \pm 16,2$	$6,81 \pm 0,53$	$47,39 \pm 7,06$	$0,42 \pm 0,14$
Probiótico 4	$6,53 \pm 1,09$	$74,02 \pm 10,8$	$6,89 \pm 0,50$	$46,89 \pm 6,85$	$0,44 \pm 0,10$

Os resultados das análises físicas e químicas da água não apresentaram variações significativas não exercendo influência sobre os dados obtidos durante a experimentação.

3.1.1. Desempenho

O peso médio dos girinos durante o experimento em cada biometria encontra-se na Figura 7.

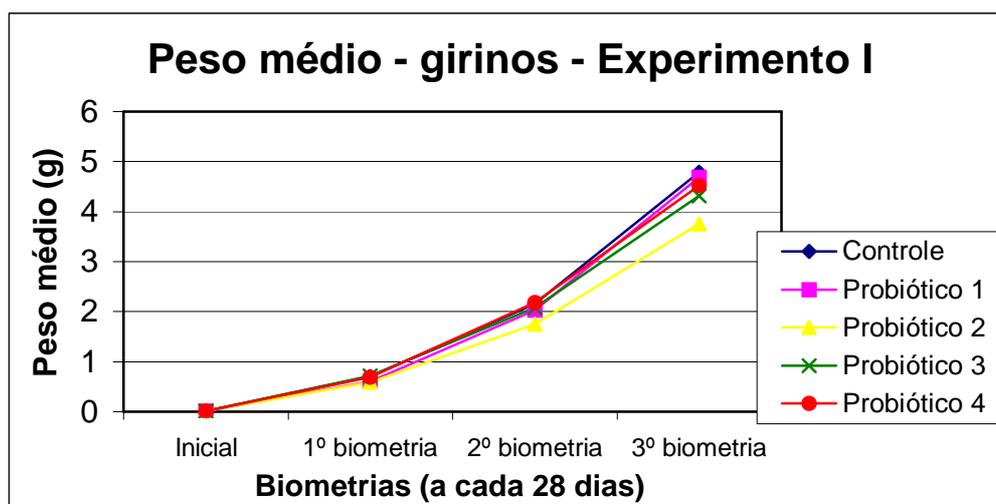


FIGURA 7 – Peso médio de girinos de *R. catesbeiana* durante o teste com probióticos

As médias do ganho de peso, conversão alimentar aparente (C.A.) e sobrevivência dos girinos ao final do experimento, em cada tratamento, encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 – Médias do ganho de peso (g), conversão alimentar aparente (CA) e sobrevivência (%) de girinos de *R. catesbeiana*, por tratamento, obtidos durante o teste com probióticos

Tratamentos	Ganho de Peso médio (g)	CA aparente	Sobrevivência (%)
Controle	4,79	0,92	69,84
Probiótico 1	4,68	0,97	73,84
Probiótico 2	3,75	0,96	82,00
Probiótico 3	4,32	1,00	73,17
Probiótico 4	4,52	0,98	70,50
F para tratamentos	0,74 ^{NS}	1,03 ^{NS}	0,27 ^{NS}
CV (%)	22,13	5,50	20,23

NS – Não Significativo CV – Coeficiente de Variação

Pode-se verificar através dos dados apresentados que o ganho de peso médio dos girinos foi muito similar entre os grupos testados, e a análise estatística realizada através do teste de Tukey indicou não haver diferenças significativas entre os tratamentos ($P= 0,57$).

As pequenas variações no ganho de peso observadas durante o experimento podem estar relacionadas às diferentes densidades encontradas nos tanques a partir do segundo mês de experimentação, devido à mortalidade ocorrida durante o primeiro mês do teste.

A conversão alimentar aparente dos girinos durante o experimento (Tabela 4) não apresentou diferenças significativas ($P=0,44$), mostrando resultados muito similares entre os tratamentos. Provavelmente, a boa conversão alimentar obtida neste experimento ocorreu devido a abundância de alimentos naturais (fito e zooplâncton) disponíveis na água de abastecimento dos tanques, complementando a alimentação dos girinos.

A mortalidade média dos girinos ao final do experimento encontra-se na Tabela 4. A Figura 8 demonstra a mortalidade média dos girinos por biometria durante o Experimento I.

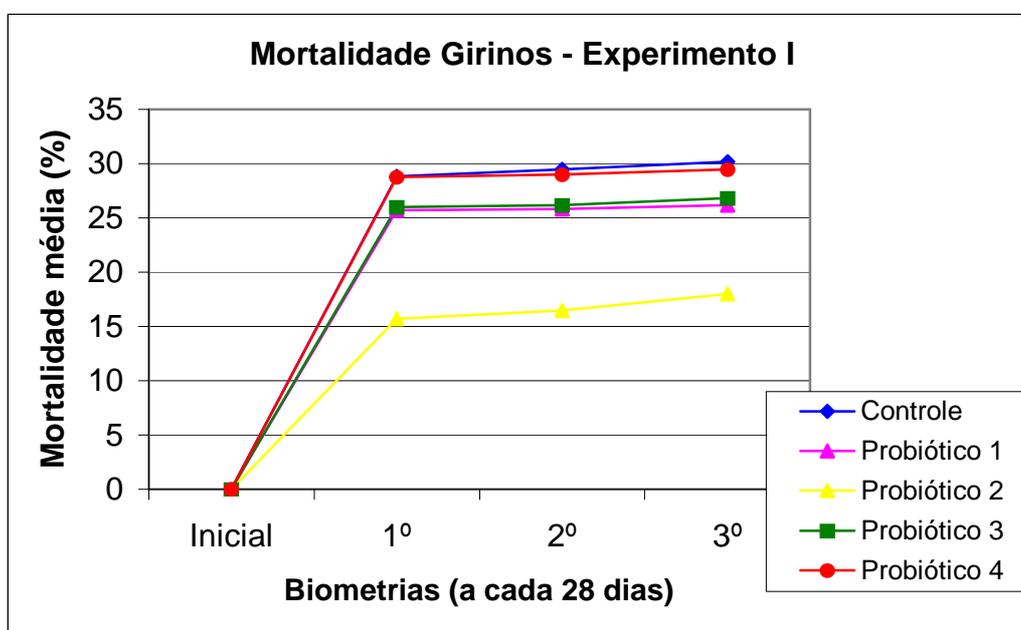


FIGURA 8 – Mortalidade (%) média de girinos de *R. catesbeiana*, obtidas durante o teste com probióticos

Embora se note que o Probiótico 2 apresentou uma sobrevivência maior durante a experimentação, a análise estatística para estes dados, realizada através do teste de Tukey, indicou não haver diferenças significativas entre os tratamentos ($P= 0,89$).

A média das taxas de sobrevivência apresentada demonstrou estar pouco abaixo da esperada em criações comerciais, ou seja, 80%. Mas esse fato provavelmente se deve aos constantes manuseios e biometrias durante o experimento, especialmente nos primeiros 28 dias do teste, momento em que os animais se apresentavam muito sensíveis ao manuseio (contagem e limpeza dos tanques), pois foram usados animais jovens (0,01g) com apenas um dia de vida após a eclosão dos ovos.

3.2. EXPERIMENTO II - INFLUÊNCIA DE 2 PROBIÓTICOS SOBRE O DESEMPENHO E FISIOLOGIA DE GIRINOS E IMAGOS DE RÃ-TOURO, EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

3.2.1 - GIRINOS

As temperaturas médias máximas e mínimas da água dos aquários foram de $23,82 \pm 2,06$ e $22,15 \pm 2,07^{\circ}\text{C}$, respectivamente. As demais médias das variáveis físicas e químicas da água monitoradas são apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5 – Média e Desvio Padrão das variáveis físicas e químicas da água dos aquários de girinos de *R. catesbeiana*, obtidas durante o Experimento II do teste com probióticos

Tratamentos	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	pH	Condutividade Elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Amônia não ionizada NH_3 $\mu\text{g}/\text{L}$	Nitrito NO_2^- $\mu\text{g}/\text{L}$
Controle	$6,82 \pm 1,04$	$7,26 \pm 0,32$	$95,17 \pm 10,61$	$25,99 \pm 6,44$	$154,35 \pm 69,76$
Probiótico 1	$6,98 \pm 1,09$	$7,26 \pm 0,35$	$93,20 \pm 10,02$	$24,00 \pm 4,07$	$143,35 \pm 63,20$
Probiótico 2	$6,87 \pm 1,19$	$7,30 \pm 0,41$	$97,80 \pm 11,29$	$27,66 \pm 5,46$	$149,39 \pm 69,57$

Da mesma forma que no Experimento I os resultados das análises físicas e químicas da água dos aquários não apresentaram variações significativas que pudessem exercer influência significativa sobre os dados obtidos durante a experimentação em laboratório.

3.2.1.1. Desempenho

O peso médio dos girinos, por biometria em cada tratamento, encontra-se na Figura 9.

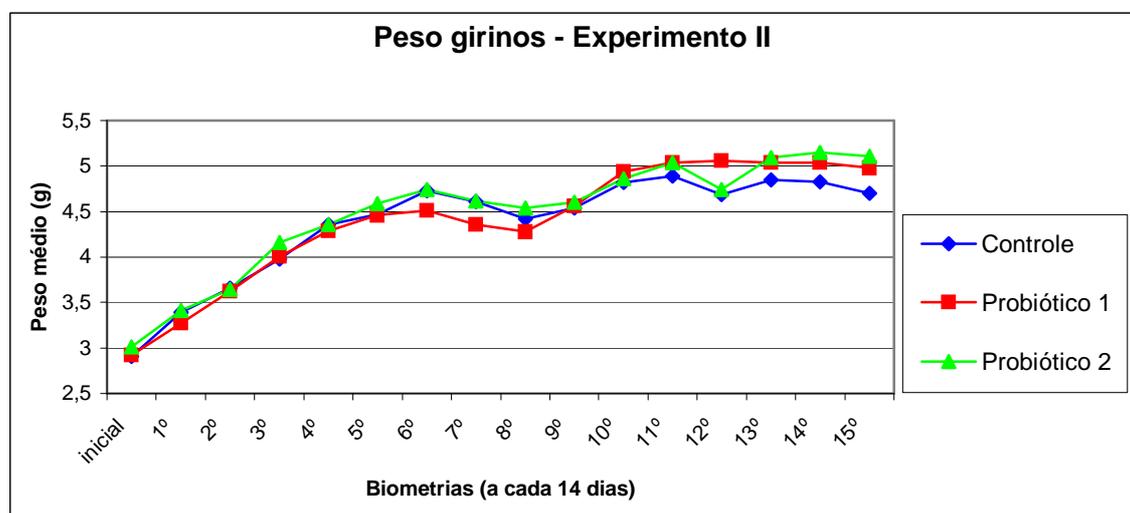


FIGURA 9 - Peso médio (g) de girinos de *R. catesbeiana*, por biometria, em cada tratamento durante o teste com probióticos

Verifica-se que os probióticos testados não influenciaram diferencialmente o crescimento dos animais, que apresentaram o mesmo padrão de crescimento. Nos primeiros 3 meses de experimentação observou-se um aumento exponencial de peso com estabilização nas semanas subseqüentes.

As médias do ganho de peso, conversão alimentar aparente e sobrevivência dos girinos ao final do experimento, em cada tratamento, encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6 – Médias de ganho de peso (g), conversão alimentar aparente (CA) e sobrevivência (%) de girinos de *R. catesbeiana*, por tratamento durante o teste com probióticos

Tratamentos	Ganho de Peso (g)	CA aparente	Sobrevivência (%)
Controle	1,80	4,81	75,60 ^{ab}
Probiótico 1	2,06	4,41	51,10 ^a
Probiótico 2	2,10	4,19	83,33 ^b
F para tratamentos	0,32 ^{NS}	0,29 ^{NS}	8,59*
CV (%)	23,00	20,70	24,16

Médias seguidas da mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

CV – Coeficiente de Variação

NS = Não significativo

* Significativo a 5%

Através dos dados apresentados pode-se verificar que o ganho de peso médio dos girinos durante o experimento II foi muito similar entre os grupos testados, apresentando melhores resultados com o Probiótico 2. A análise estatística realizada através do teste de Tukey indicou não haver diferenças significativas entre os tratamentos ($P = 0,73$).

A conversão alimentar apresentada no presente experimento foi pior em relação ao Experimento I, este fato se deu pelo baixo ganho de peso em um longo período experimental, provavelmente pela idade mais avançada dos girinos e pelas condições experimentais que restringem o espaço destes indivíduos, além de não permitir a complementação da dieta dos girinos com alimentos naturais, como o ocorrido no campo.

As taxas médias de mortalidade dos girinos durante do Experimento II, em cada tratamento encontram-se na Figura 10.

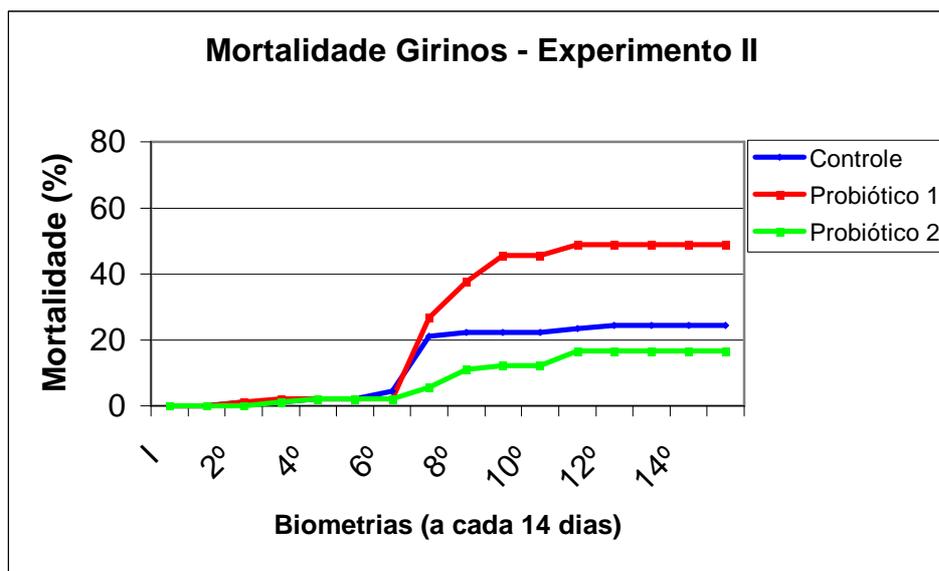


FIGURA 10 – Mortalidade média (%) de girinos de *R. catesbeiana*, por biometria, em cada tratamento durante o teste com probióticos

Durante o experimento houve sobrevivência mais elevada no grupo tratado com o Probiótico 2. A mortalidade foi significativamente mais alta no tratamento que utilizou o Probiótico 1 ($P=0,02$), quando comparado ao Probiótico 2, mas não apresentando diferenças em relação ao grupo controle.

Provavelmente esta mortalidade possa estar associada a uma paulatina elevação de temperatura e pH, neste período, com conseqüente transformação de amônia total (NH_4) em amônia não ionizada (NH_3), afetando de maneira mais acentuada os indivíduos do Tratamento 1.

A taxa de metamorfose mais elevada ocorreu no tratamento que utilizou o Probiótico 2 (20%), mas não apresentando diferenças significativas ($P=0,29$) do grupo tratado com Probiótico 1 (11,1%) e grupo controle (14,4%).

3.2.1.2. Análises imunológicas

Os resultados das análises imunológicas em girinos estão apresentados na Tabela 7 e nas Figuras 11 e 12.

TABELA 7 - Médias e desvio padrão da frequência percentual da capacidade fagocítica e índice fagocítico de girinos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico

	Capacidade Fagocítica (%)	Índice Fagocítico
Controle	72,67± 10,15	2,8± 0,58 ^a
Probiótico 1	83± 8,15	3,18± 0,45 ^a
Probiótico 2	86,83± 10,52	3,87± 0,16 ^b
F para tratamentos	3,45 ^{NS}	11,39 ^{***}
CV (%)	13,57	19,39

Médias seguidas da mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

NS – Não significativo

CV – Coeficiente de Variação

*** Significativo a 0,1%

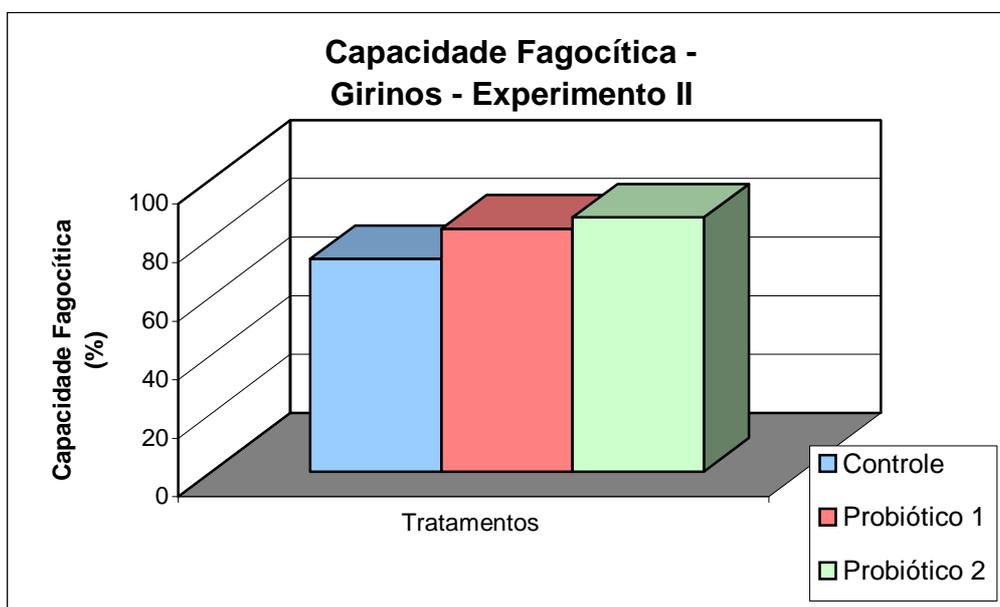


FIGURA 11 – Médias da frequência percentual, por tratamento, da capacidade fagocítica de girinos de *R. catesbeiana* no teste com probiótico

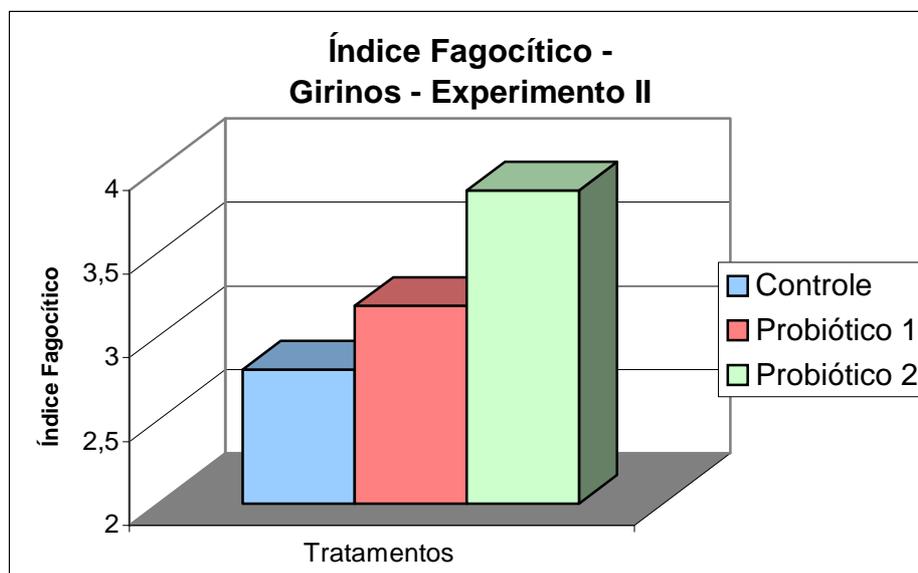


FIGURA 12 - Médias, por tratamento, do índice fagocítico de girinos de *R. catesbeiana* no teste com probiótico

A análise estatística realizada através do teste de Tukey indicou não haver diferenças significativas entre os tratamentos para a capacidade fagocítica ($P=0,058$), apesar de observar-se que os animais tratados com Probiótico 2 apresentaram melhores resultados (86,83%). O índice fagocítico também foi mais elevado no tratamento que utilizou o Probiótico 2 demonstrando-se altamente significativo ($P=0,001$).

Tanto em girinos quanto em imagos foram observadas células fagocíticas ativas no lavado abdominal (com leveduras em seu interior), e o número de leveduras no interior de cada célula, como mostra a Figura 13.

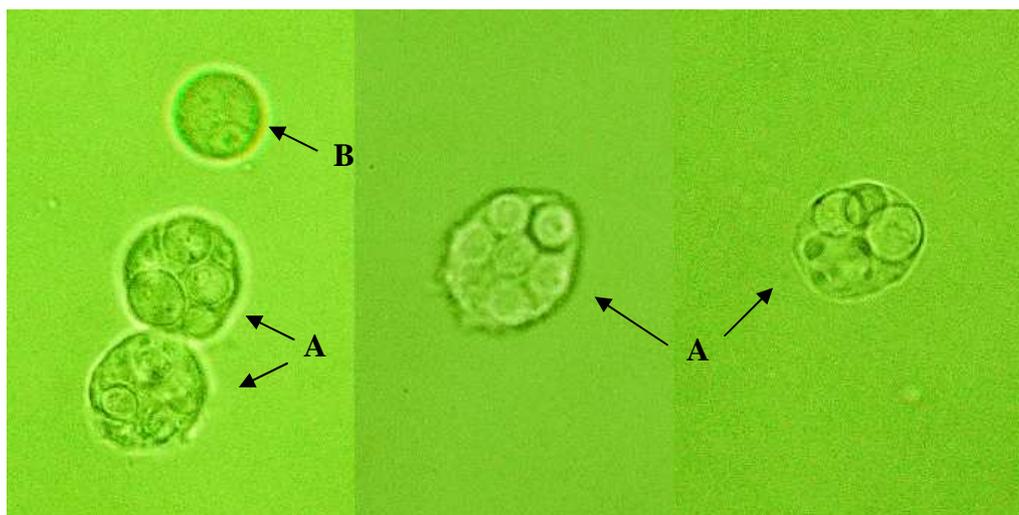


FIGURA 13 - Fotomicrografia de células fagocíticas presentes em lavado abdominal de girinos de rã-touro. (A – células fagocitando leveduras e B – célula fagocítica inativa). Microscópio de contraste de fases. Aumento de 400 X

3.2.1.3. Análises Hematológicas

Os resultados das análises hematológicas de girinos durante o Experimento II com probióticos estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 - Médias e erro padrão dos parâmetros hematológicos de girinos de *R. catesbeiana*, em cada tratamento no teste com probiótico

	Ht	Hb	Er	VCM	CHCM
Controle	15,50±0,92	3,62 ± 0,19	33,33 ± 4,22	509,31± 82,95	23,55 ± 1,33 ^a
Probiótico 1	18,00 ±1,65	3,23 ± 0,34	32,67±2,76	563,87± 55,86	18,00 ± 1,29 ^b
Probiótico 2	14,33 ±0,56	2,75 ± 0,22	22,58± 2,90	680,37± 80,30	19,14 ± 1,13 ^{ab}
F para tratamentos	2,70 ^{NS}	2,90 ^{NS}	3,22 ^{NS}	1,39 ^{NS}	5,45 [*]

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 (%).

NS = Não significativo. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey. * Significativo a 5%

A análise estatística realizada através do teste de Tukey demonstrou que os parâmetros hematológicos não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Apenas os valores de CHCM evidenciaram diferenças

estatisticamente significativas quando se compara o grupo controle com o Probiótico 1, apresentando valores intermediários para o Probiótico 2.

Gráficos detalhando estes resultados são apresentados na Figura 14.

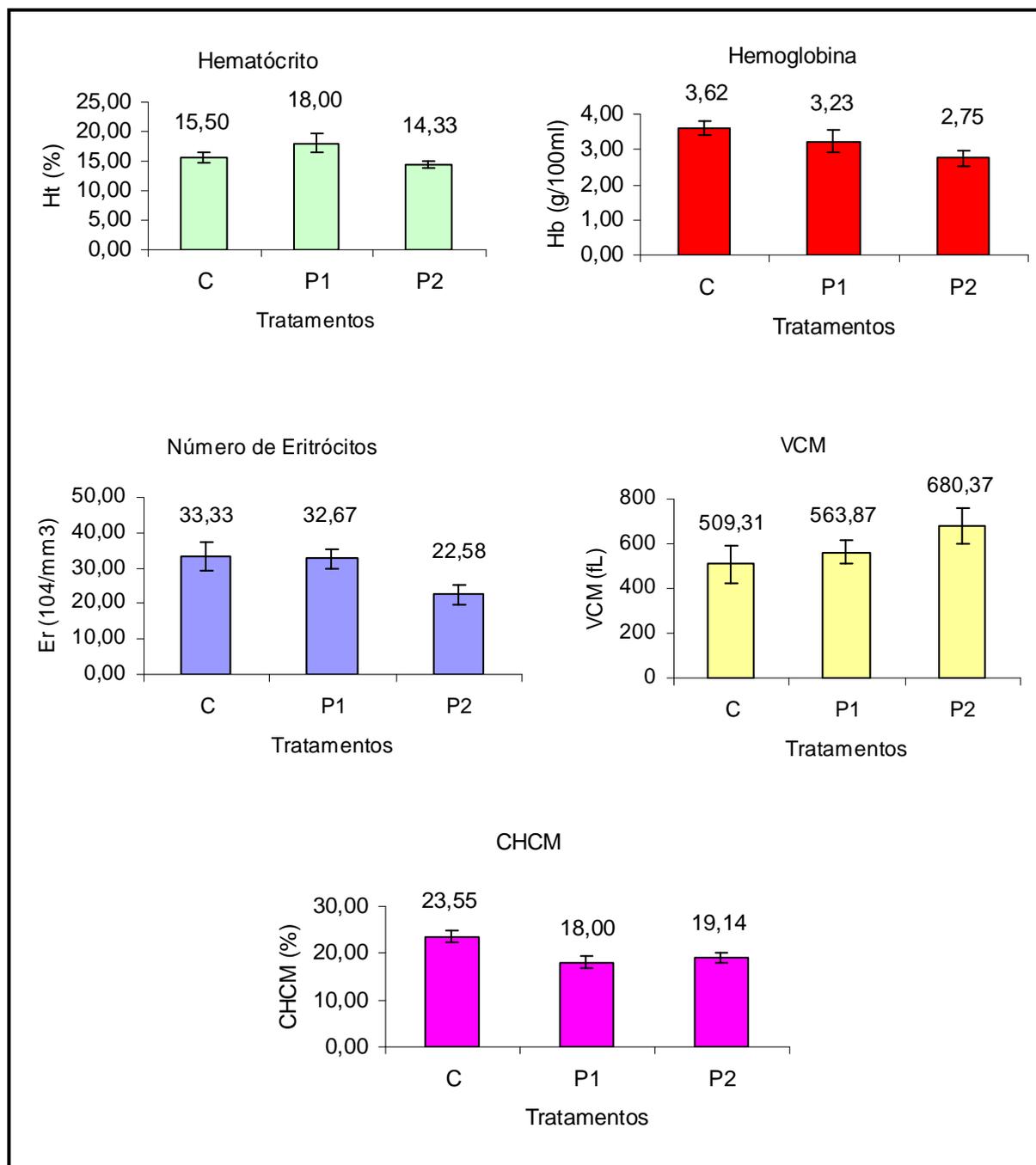


FIGURA 14 - Parâmetros hematológicos de girinos de *R. catesbeiana* em cada tratamento no teste com probiótico. C = Controle, P1 = Probiótico 1 e P2 = Probiótico 2

Os valores médios e erro padrão da contagem de trombócitos por milímetro cúbico ao final do experimento foram de $390,09 \pm 183,69$ para o controle, $259,41 \pm 81,80$ para o Probiótico 1 e, $235,71 \pm 55,82$ para o Probiótico 2.

Os resultados dos valores da contagem de trombócitos mostram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($F = 0,53$ e $P=0,60$). Os trombócitos são considerados como responsáveis pelo processo de coagulação do sangue (CASILLAS e SMITH, 1977), desempenhando papel análogo às plaquetas dos mamíferos (PENHA *et al.*, 1996).

Os números absolutos médios dos leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos (CDL) em girinos ao final do experimento encontram-se na Tabela 9, e os valores em percentual da CDL encontram-se na Tabela 10.

TABELA 9 - Médias por milímetro cúbico e erro padrão dos números absolutos de leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos de girinos de *R. catesbeiana* por tratamento no teste com probiótico

	Lc T/mm ³	Lf/mm ³	Nt/mm ³	Bs/mm ³	Es/mm ³	Mn/mm ³
Controle	11.856,00 ± 2.530,78	11.073,59 ± 2.219,34	238,72 ± 120,85	505,15 ± 147,98	25,70 ± 14,37	12,85 ± 11,73
Probiótico1	17.109,51 ± 2.434,90	15.712,54 ± 2.321,32	597,77 ± 183,04	674,37 ± 140,87	31,52 ± 23,60	93,32 ± 59,68
Probiótico2	9.893,67 ± 1.730,81	9.503,16 ± 1.716,97	207,12 ± 58,06	170,98 ± 60,49	12,41 ± 8,55	0,00 ± 0,00
F para tratamentos	3,03 ^{NS}	0,24 ^{NS}	0,32 ^{NS}	0,39 ^{NS}	0,72 ^{NS}	0,18 ^{NS}

Lc T = Leucócitos Totais; Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito.
NS = Não significativo

O gráfico detalhando os resultados dos números de leucócitos totais está apresentado na Figura 15.

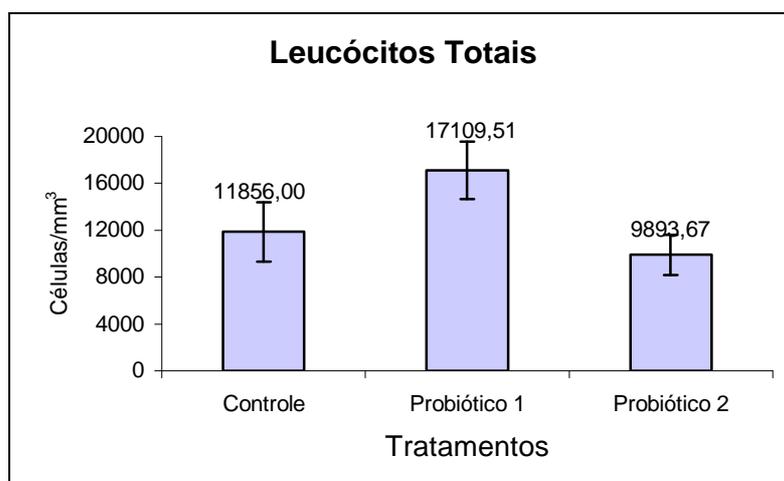


FIGURA 15 - Números absolutos médios dos leucócitos totais de girinos de *R. catesbeiana*, por tratamento no teste com probiótico

A contagem total de leucócitos não demonstrou diferenças entre os tratamentos ($P=0,08$) apesar de estar mais elevada nos animais tratados com o Probiótico 1.

TABELA 10 – Médias e erro padrão dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de girinos de *R. catesbeiana*, por tratamento no teste com probiótico

	Lf (%)	Nt (%)	Bs (%)	Es (%)	Mn (%)
Controle	93,10 ± 0,94	2,43 ± 1,08	4,09 ± 0,26	0,29 ± 0,17	0,10 ± 0,09
Probiótico 1	91,86 ± 1,70	3,33 ± 0,94	4,07 ± 0,66	0,25 ± 0,17	0,49 ± 0,31
Probiótico 2	95,63 ± 0,88	2,47 ± 0,62	1,73 ± 0,56	0,17 ± 0,11	0,00 ± 0,00
F para tratamentos	0,86 ^{NS}	3,28 ^{NS}	2,17 ^{NS}	2,64 ^{NS}	0,37 ^{NS}

Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito.
NS = Não significativo

Gráficos detalhando os resultados de CDL em porcentagem e valores absolutos são apresentados na Figura 16.

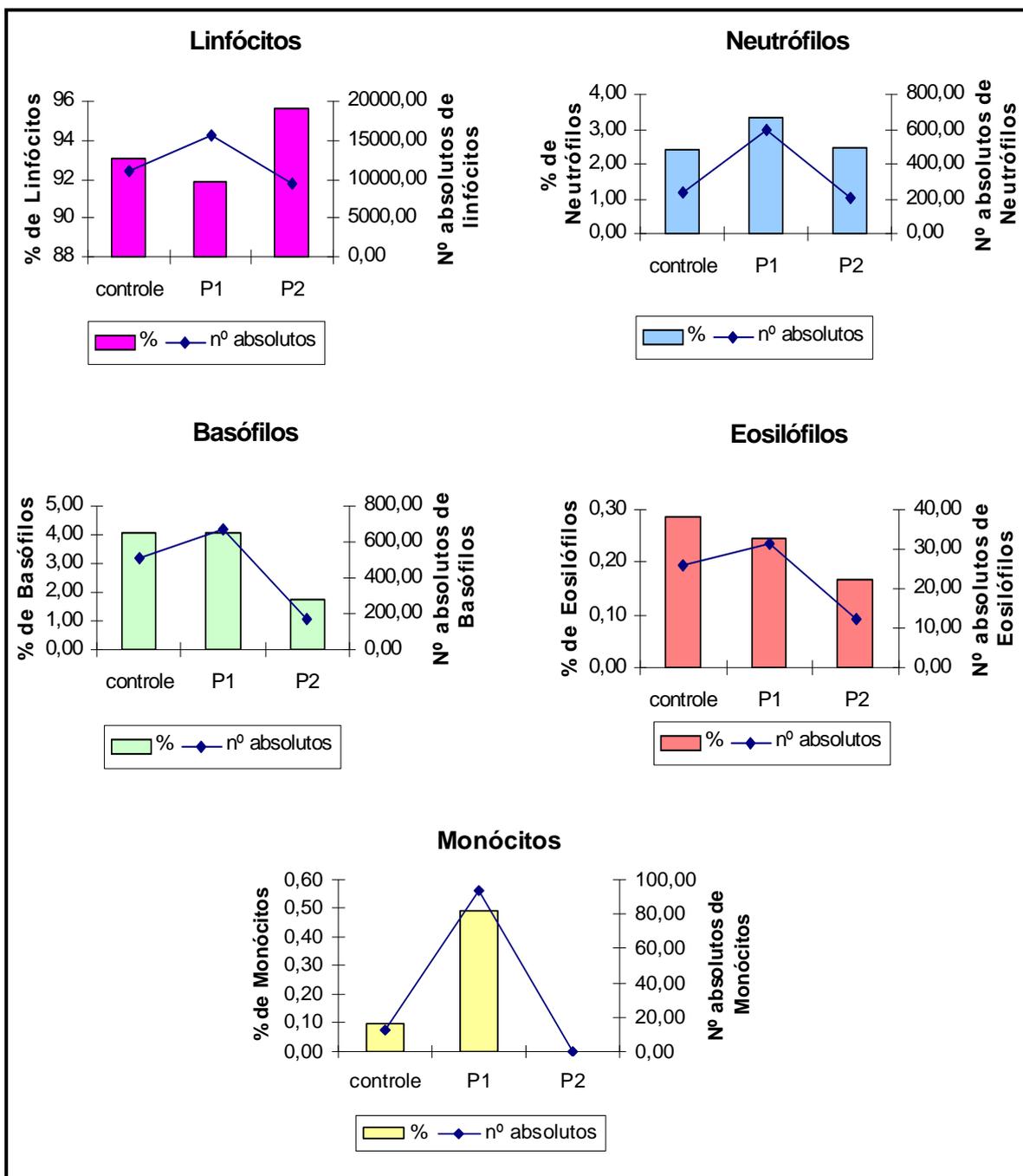


FIGURA 16 - Valores em porcentagem e números absolutos da contagem diferencial de leucócitos de girinos de *R. catesbeiana*, em cada tratamento no teste com probiótico. C = Controle, P1 = Probiótico 1 e P2 = Probiótico 2

Os valores médios dos leucócitos, tanto em valores absolutos quanto em porcentagem analisados através do teste de Tukey, não demonstraram

diferenças significativas entre os tratamentos. A ilustração dos leucócitos encontrados no sangue dos girinos durante a contagem diferencial estão apresentados na Figura 17.

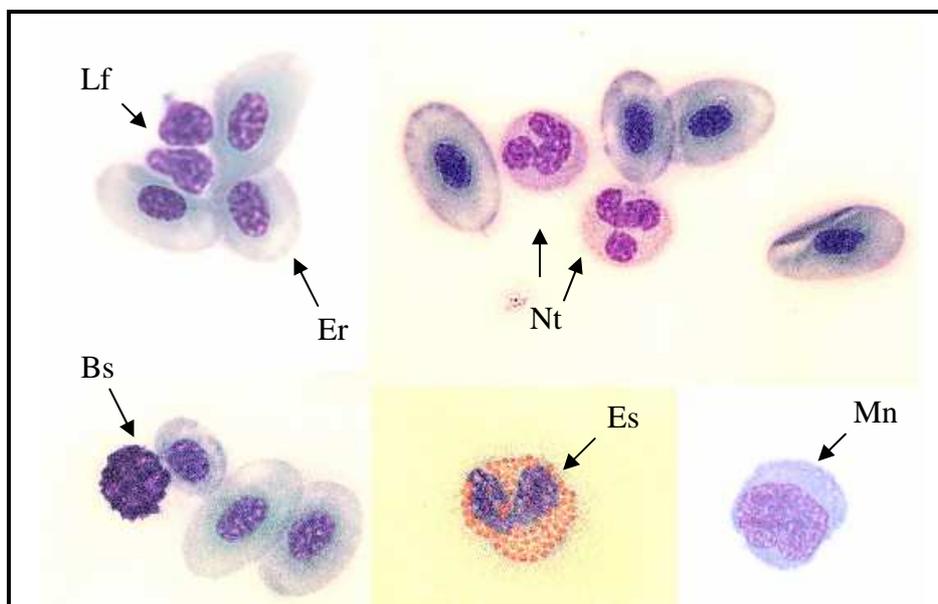


FIGURA 17 – Fotomicrografia da extensão sanguínea de girinos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico. Er = Eritrócito, Lf = Linfócito, Nt = Neutrófilo, Bs = Basófilo, Es = Eosinófilo e Mn = Monócito. Coloração Rosenfeld. Aumento de 1000 X

3.2.2. IMAGOS

Os valores médios das temperaturas máximas e mínimas do ambiente foram $24,35 \pm 2,05$ e $22,59 \pm 2,05$ °C, respectivamente.

3.2.2.1. *Desempenho*

O peso médio dos imagos em cada tratamento, durante o experimento, encontra-se na Figura 18.

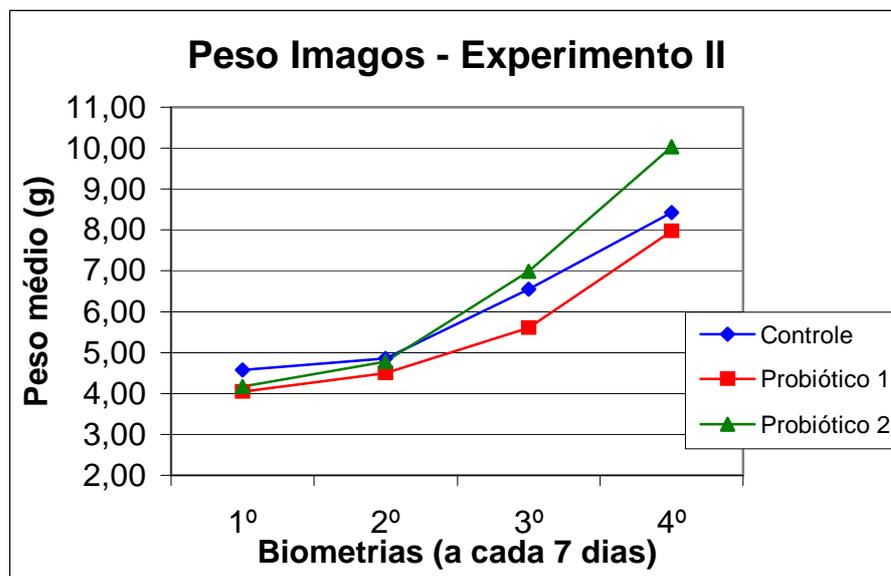


FIGURA 18 - Peso médio de imagos de *R. catesbeiana*, por biometria, em cada tratamento durante o teste com probiótico

Verifica-se que os probióticos testados não influenciaram diferencialmente o crescimento dos animais, que apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento. A partir da 1ª semana pós-metamorfose, que coincide com a formação completa do aparelho bucal e absorção total da cauda, observou-se um aumento exponencial de crescimento. Ainda, neste período, os animais precisam adaptar-se a nova forma de se alimentar, ou seja, captura (“caça”) do alimento, e não mais ingestão de partículas inertes. Estes fatores, entre outros, podem muitas vezes dificultar o ganho de peso inicial dos imagos e, muito provavelmente estão relacionados as mortalidades encontradas em produções comerciais. Entretanto, talvez devido ao controle das condições laboratoriais não houve mortalidade de imagos neste período experimental.

As médias do ganho de peso e conversão alimentar dos imagos ao final do experimento, em cada tratamento, encontram-se na Tabela 11.

TABELA 11 – Médias de ganho de peso (g) e conversão alimentar (CA) de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento durante o teste com probióticos

Tratamentos	Ganho de Peso (g)	CA
Controle	3,86	1,99
Probiótico 1	3,93	1,34
Probiótico 2	5,86	1,01
F para tratamentos	1,31 ^{NS}	0,53 ^{NS}
CV (%)	39,27	77,21

NS – Não significativo CV – Coeficiente de Variação

O ganho de peso dos imagos foi mais elevado no tratamento que utilizou o Probiótico 2, mas sem diferenças estatisticamente significativas ($P=0,34$) dos demais tratamentos.

A conversão alimentar foi pior no grupo controle, mas não demonstrou diferenças significativas ($P=0,62$).

3.2.2.2. Análises Imunológicas

Os resultados das análises imunológicas em imagos estão apresentados na Tabela 12 e nas Figuras 19 e 20.

TABELA 12 – Médias e desvio padrão da frequência percentual da capacidade fagocítica e índice fagocítico de imagos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico

	Capacidade Fagocítica (%)	Índice Fagocítico
Controle	62,20 ± 14,72	3,26 ± 0,97
Probiótico 1	76,20 ± 9,88	3,90 ± 0,55
Probiótico 2	76,00 ± 5,34	3,89 ± 0,10
F para tratamentos	2,82 ^{NS}	1,58 ^{NS}
CV (%)	16,79	18,30

NS – Não significativo CV – Coeficiente de Variação

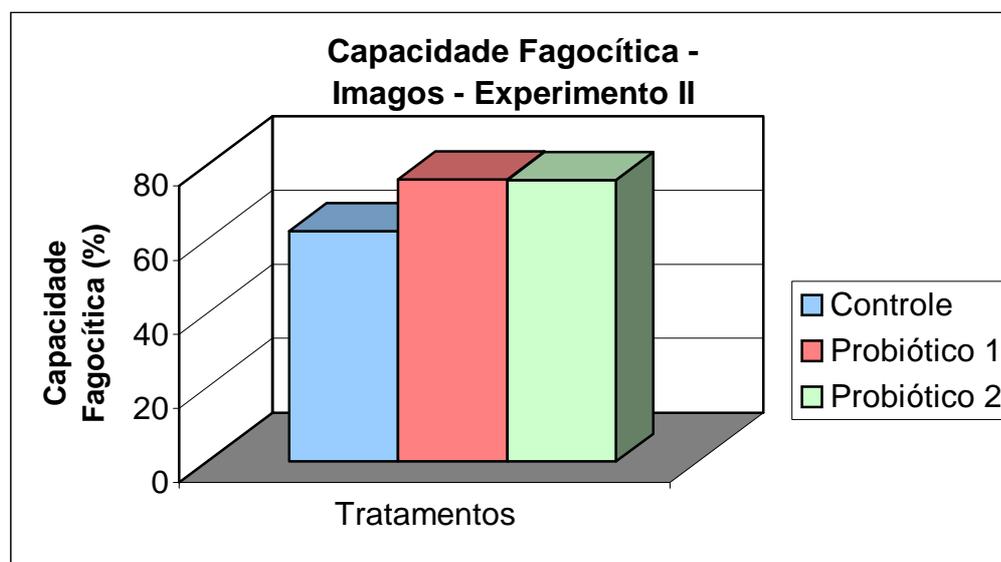


FIGURA 19 - Médias da freqüência percentual, por tratamento, da capacidade fagocítica de imagos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico

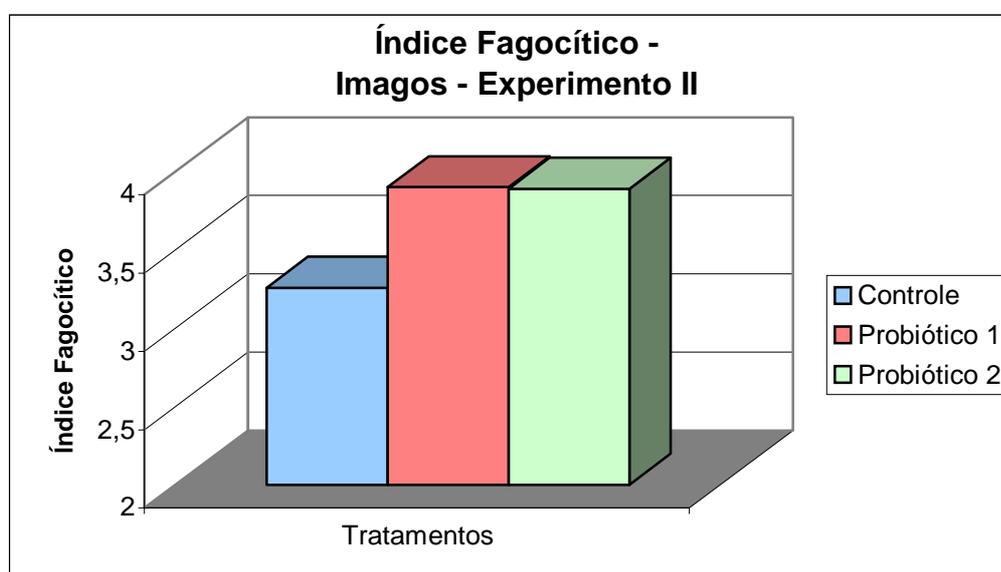


FIGURA 20 – Médias, por tratamento, do índice fagocítico de imagos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico

Apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, a capacidade fagocítica e o índice fagocítico foram mais elevados nos grupos tratados com probióticos.

3.2.2.3. Análises Hematológicas

Os resultados das análises hematológicas dos imagos durante o Experimento II com probióticos estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – Médias e erro padrão dos parâmetros hematológicos de imagos de *R. catesbeiana*, em cada tratamento no teste com probiótico

	Ht	Hb	Er	VCM	CHCM
Controle	18,20 ± 2,22	5,19 ± 0,26	26,00 ± 1,44	705,445 ± 89,6	30,89 ± 4,25
Probiótico 1	21,92 ± 1,51	5,62 ± 0,49	31,88 ± 3,77	632,504 ± 65,1	27,86 ± 0,24
Probiótico 2	19,17 ± 1,84	5,18 ± 0,48	27,25 ± 2,09	726,653 ± 99,8	25,29 ± 1,81
F para tratamentos	0,59 ^{NS}	0,25 ^{NS}	1,15 ^{NS}	0,18 ^{NS}	0,76 ^{NS}

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 (%).

NS = Não significativo

Análise estatística realizada através do teste de Tukey não evidenciou diferenças estatísticas para parâmetros hematológicos dos imagos. Gráficos detalhando estes resultados são apresentados na Figura 21.

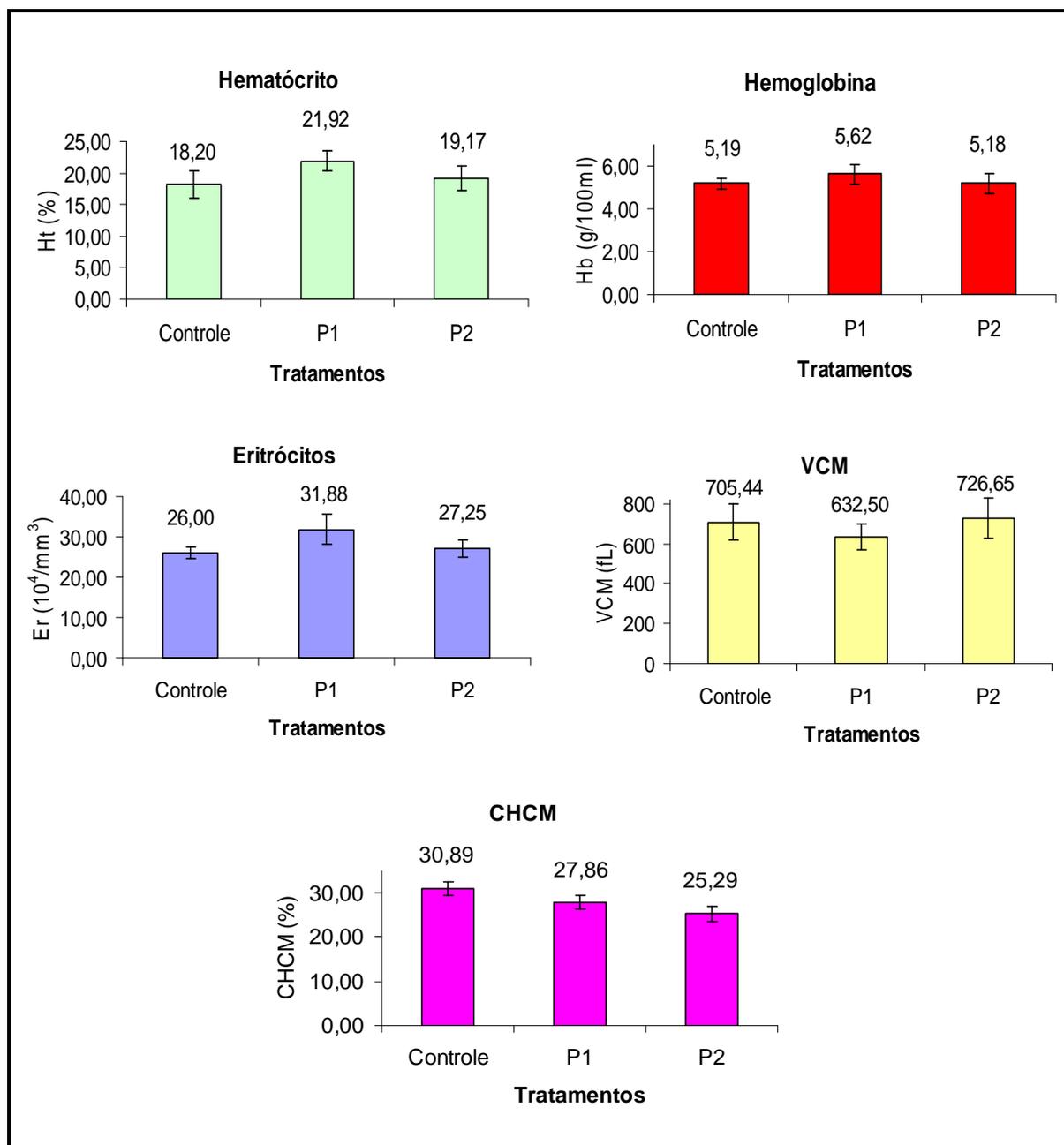


FIGURA 21 - Parâmetros hematológicos de imagos de *R. catesbeiana*, em cada tratamento no teste com probiótico. P1 = Probiótico 1, P2 = Probiótico 2

Os valores médios e erro padrão da contagem de trombócitos por milímetro cúbico ao final do experimento foram de $2.103,61 \pm 795,68$ para o controle, $2.836,79 \pm 823,77$ para o Probiótico 1 e, $1.311,10 \pm 500,99$ para o Probiótico 2.

Os resultados dos valores da contagem de trombócitos mostram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($F = 1,21$ e $P=0,33$).

Os números absolutos médios dos leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos (CDL) dos imagos ao final do Experimento II encontram-se na Tabela 14, e os valores em percentual da CDL encontram-se na Tabela 15.

TABELA 14 - Médias por milímetro cúbico e erro padrão dos números absolutos de leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento no teste com probiótico

	Lc T/mm ³	Lf/mm ³	Nt/mm ³	Bs/mm ³	Es/mm ³	Mn/mm ³
Controle	11.698,67 ± 2642,47	9.248,43 ± 2014,56	1.416,02 ± 425,06	778,17 ± 213,38	220,72 ± 86,42	35,32 ± 21,84
Probiótico1	12.845,98 ± 3419,63	10.467,30 ± 2665,92	892,24 ± 474,63	1373,90 ± 426,07	35,92 ± 26,69	76,63 ± 37,43
Probiótico 2	12.878,27 ± 1820,76	11.222,46 ± 1809,71	669,76 ± 194,26	831,97 ± 256,26	73,31 ± 56,01	80,76 ± 46,30
F para tratamentos	0,07 ^{NS}	0,24 ^{NS}	1,26 ^{NS}	1,01 ^{NS}	2,17 ^{NS}	0,43 ^{NS}

Lc T= Leucócitos Totais; Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito. NS = Não significativo

O gráfico detalhando os resultados dos números de leucócitos totais está apresentado na Figura 22.

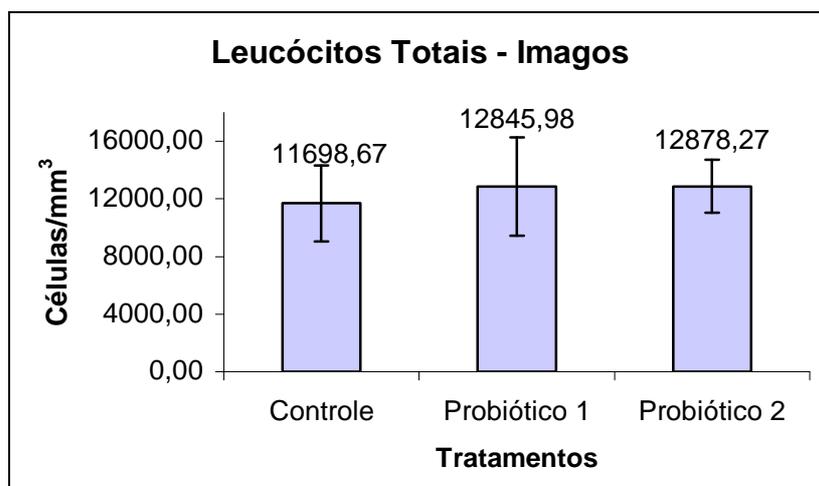


FIGURA 22 – Números absolutos médios dos leucócitos totais de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento no teste com probiótico

A contagem total de leucócitos não demonstrou diferenças estatísticas entre os tratamentos, apresentando valores bem similares ($P=0,93$).

TABELA 15 - Médias e erro padrão dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento no teste com probiótico

	Lf (%)	Nt (%)	Bs (%)	Es (%)	Mn (%)
Controle	80,62 ± 2,92	11,70 ± 2,12	5,46 ± 1,34	1,92 ± 0,42	0,29 ± 0,18
Probiótico1	82,50 ± 1,59	5,39 ± 1,68	11,14 ± 1,71	0,49 ± 0,28	0,49 ± 0,16
Probiótico 2	86,59 ± 3,94	5,41 ± 1,67	6,66 ± 1,99	0,69 ± 0,51	0,64 ± 0,38
F para tratamentos	0,24 ^{NS}	1,26 ^{NS}	1,01 ^{NS}	2,17 ^{NS}	0,43 ^{NS}

Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito.
NS = Não significativo

Gráficos detalhando os resultados de CDL em porcentagem e valores absolutos estão apresentados na Figura 23.

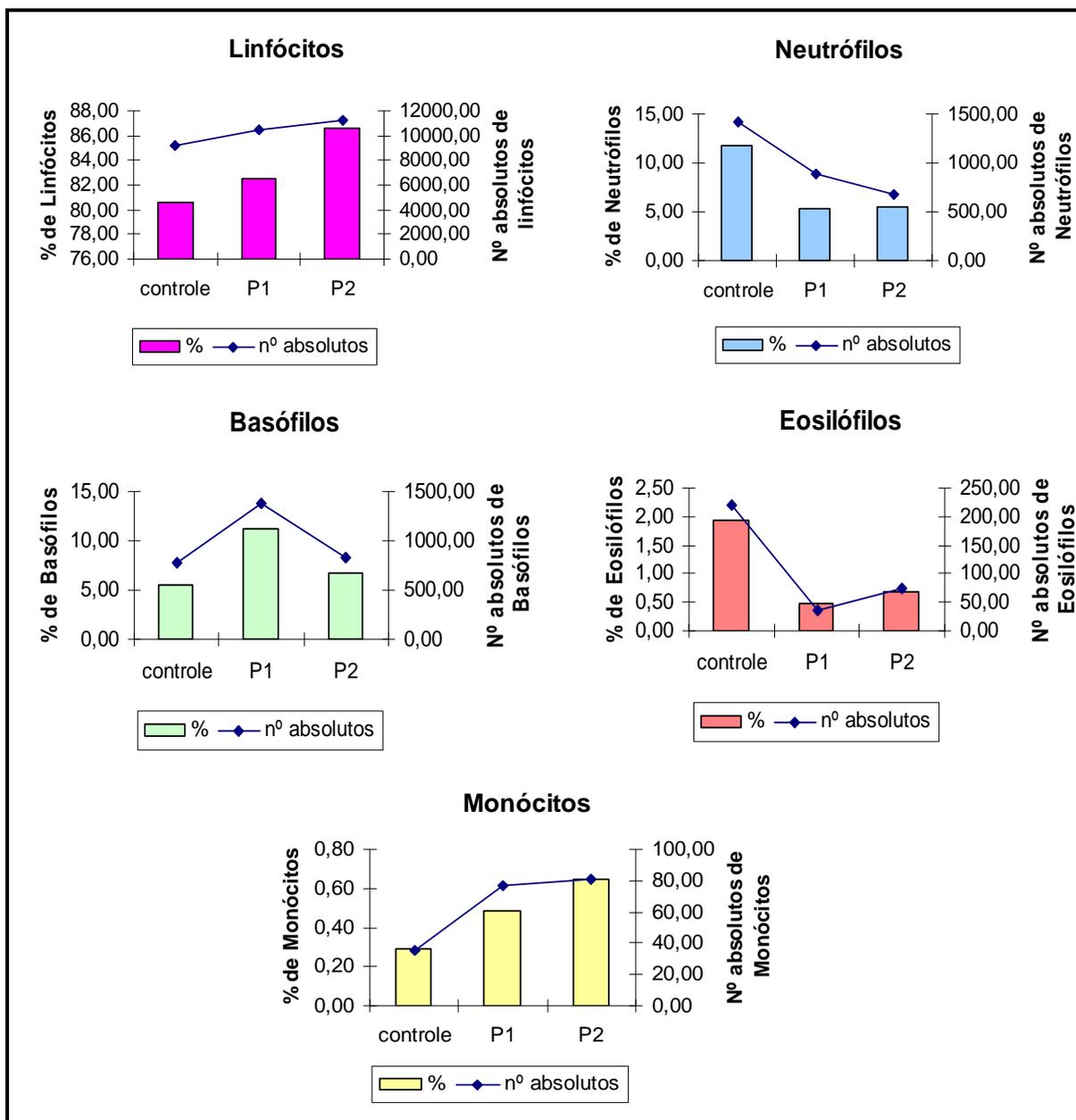


FIGURA 23 - Valores em porcentagem e números absolutos da contagem diferencial de leucócitos de imagos de *R. catesbeiana*, em cada tratamento no teste com probiótico. P1 = Probiótico 1, P2 = Probiótico 2

Os valores médios dos leucócitos, tanto em valores absolutos quanto em porcentagem analisados através do teste de Tukey, não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos.

3.3. EXPERIMENTO III - EFEITO DO PROBIÓTICO *Bacillus subtilis* NO CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA E FISIOLOGIA DE RÃS-TOURO (*Rana catesbeiana*)

3.3.1. GIRINOS

Nos tanques de girinagem as temperaturas médias da água foram de $19,4 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$. As demais médias das variáveis físicas e químicas da água monitoradas são apresentadas na Tabela 16.

TABELA 16 – Médias e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água dos tanques de girinos

Tratamentos	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	pH	Condutividade Elétrica (mS/cm)	Amônia não ionizada NH_3 $\mu\text{g/L}$
Controle	$7,46 \pm 0,46$	$7,50 \pm 0,42$	$37,76 \pm 1,42$	$0,84 \pm 0,29$
Tratamento 1	$7,64 \pm 0,23$	$7,48 \pm 0,35$	$37,98 \pm 1,74$	$0,73 \pm 0,32$
Tratamento 2	$7,38 \pm 0,41$	$7,44 \pm 0,35$	$37,84 \pm 1,76$	$0,67 \pm 0,29$
Tratamento 3	$7,44 \pm 0,46$	$7,47 \pm 0,42$	$37,70 \pm 1,47$	$0,58 \pm 0,06$

Os resultados das análises físicas e químicas da água não apresentaram variações significativas, não exercendo influência sobre os dados obtidos durante a experimentação.

3.3.1.1. *Desempenho*

As taxas médias de sobrevivência dos girinos ao final do experimento, em cada tratamento encontram-se na Figura 24.

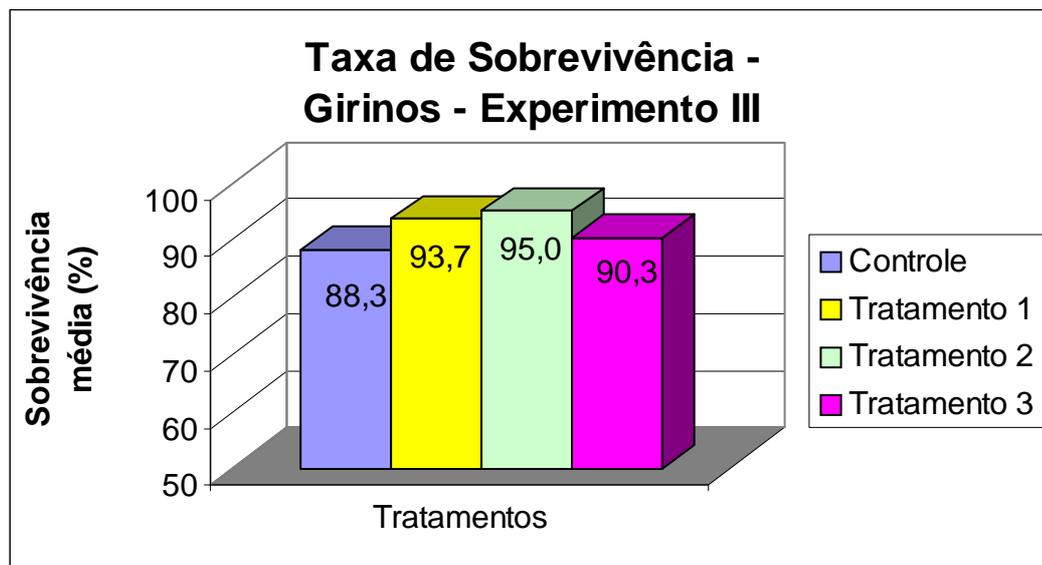


FIGURA 24 - Taxas de sobrevivência média (%) de girinos de *R. catesbeiana*, ao final do teste com probiótico

O tratamento com probiótico não influenciou as taxas de sobrevivência dos girinos. Houve uma diminuição da mortalidade no Tratamento 2, mas a análise estatística realizada através do teste de Tukey indicou não haver diferenças significativas entre os tratamentos ($P= 0,07$).

Após 15 dias do início do teste houve a maior taxa de metamorfose em um mesmo período (20%). Assim, os imagos foram transferidos para as baias de pré-engorda, iniciando-se outra fase do experimento.

3.3.2. IMAGOS

As temperaturas médias máximas e mínimas do ambiente nas baias foram de $33,3 \pm 3,4^{\circ}\text{C}$ e $16,0 \pm 2,7^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

3.3.2.1. Desempenho

O peso médio dos imagos durante o experimento, em cada tratamento, encontra-se na Tabela 17 e Figura 25.

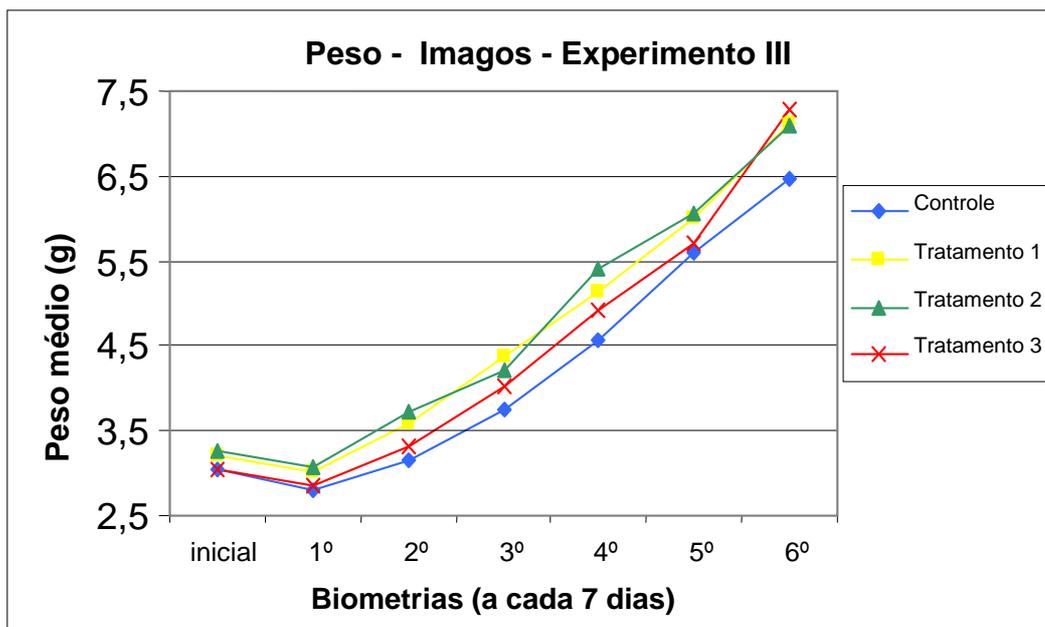


FIGURA 25 - Peso médio (g) de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento durante o teste com probiótico. T1 - 2,5 g/Kg de ração, T2 - 5 g/Kg de ração e T3 - 10 g/Kg de ração

Pode-se verificar através dos dados apresentados que o peso médio dos imagos foi similar entre os grupos testados, observando-se peso médio um pouco superior nos grupos tratados com probiótico ao final do experimento, mas que não diferiram significativamente ($P=0,74$).

A mortalidade média dos imagos em cada tratamento encontra-se na Figura 26.

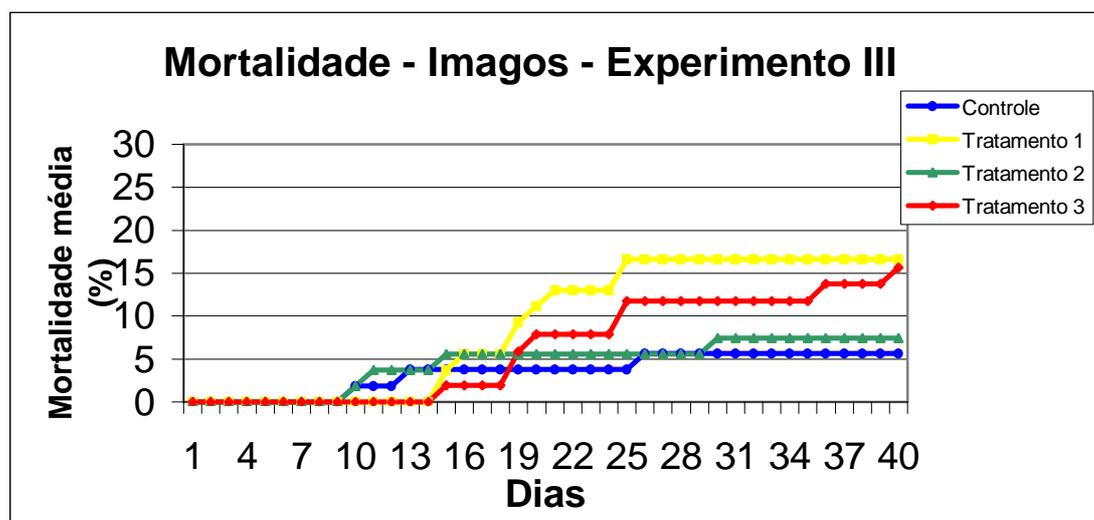


FIGURA 26 – Taxas de sobrevivência (%) média de imagos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico

As taxas de sobrevivência dos imagos ao final do experimento foram de 94,34% no grupo controle, 83,33% no Tratamento 1, 92,59% no Tratamento 2 e 84,31% no Tratamento 3. O grupo controle e o Tratamento 2 apresentaram sobrevivência discretamente maior durante a experimentação, embora a análise estatística para estes dados indicar não haver diferenças significativas entre os tratamentos ($P= 0,75$).

O ganho de peso médio, conversão alimentar e sobrevivência dos imagos ao final do experimento, em cada tratamento, encontram-se na Tabela 17.

O ganho de peso foi mais elevado no Tratamento 3 (10 g/Kg), com a dose mais elevada de probiótico, mas não diferiu estatisticamente dos demais.

TABELA 17 – Ganho de peso (g), conversão alimentar (CA) e sobrevivência (%) de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento durante o teste com probióticos

Tratamentos	Ganho de Peso (g)	CA	Sobrevivência (%)
Controle	3,45	4,85	94,34
Tratamento 1	3,92	8,03	83,33
Tratamento 2	3,82	5,57	92,59
Tratamento 3	4,25	4,65	84,31
F para tratamentos	0,14 ^{NS}	0,71 ^{NS}	0,41 ^{NS}
CV (%)	34,12	53,23	15,77

NS - Não significativo CV - Coeficiente de variação

DIAS (2006) trabalhando com *Rana catesbeiana* em fase de engorda tratadas com dois probióticos (P1 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* e P2 - *Bacillus subtilis*) observou aumento do ganho de peso nas rãs alimentadas com probiótico até atingirem 200g.

Durante este experimento não foi obtida boa conversão alimentar em nenhum dos grupos. Este resultado se deu, provavelmente, pela dificuldade de coleta dos restos de rações para o cálculo da conversão, em virtude das instalações (pouca profundidade dos cochos) e, por se tratar de um período em que os animais ainda estão se adaptando à alimentação fora da água (caça e condicionamento). Estes fatores, somados a presença de uma cauda rudimentar (clímax da metamorfose) ocasionou perda de peso dos animais na primeira semana após a metamorfose e, perda de ração na água de escoamento.

Segundo LIMA *et al.* (1988) os valores médios de conversão alimentar para rãs (*R. catesbeiana*) em crescimento variam de 4,99 a 6,80 para experimentos no campo. Já BARBALHO (1991) trabalhando com rãs em fase

de terminação observou valores médios de conversão alimentar de 1,67 em experimentos de laboratório. DIAS (2006) trabalhando com *R. catesbeiana* em fase de engorda (12 a 200 g) tratadas com dois probióticos diferentes: Probiótico 1 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium*; Probiótico 2 - *Bacillus subtilis*, obteve sua pior conversão alimentar (1,84) em tratamento utilizando o Probiótico 2 na dose de 10 g/Kg de ração.

Esta diferença nos valores médios de conversão alimentar, provavelmente deve-se ao fato de não haver uma padronização durante a coleta das rações para o cálculo de conversão, e também porque a mesma varia com o tipo de instalação utilizada, a eficiência do cocho, bem como a qualidade da ração.

3.3.2.2. Análises imunológicas

Os resultados das análises imunológicas em imagos estão apresentados na Tabela 18 e nas Figuras 27 e 28.

TABELA 18 – Médias da frequência percentual da capacidade fagocítica e índice fagocítico de imagos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico

	Capacidade Fagocítica (%)	Índice Fagocítico
Controle	37,17 ± 11,91 ^b	3,28 ± 0,67 ^b
Tratamento 1	58,17 ± 18,86 ^a	4,34 ± 0,88 ^{ab}
Tratamento 2	65,33 ± 9,37 ^a	4,65 ± 0,72 ^a
Tratamento 3	68,17 ± 8,73 ^a	4,76 ± 0,6 ^a
F para tratamentos	7,12 ^{***}	5,24 ^{***}
CV (%)	30,14	21,19

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

CV - Coeficiente de variação

*** Significativo a 0,1%

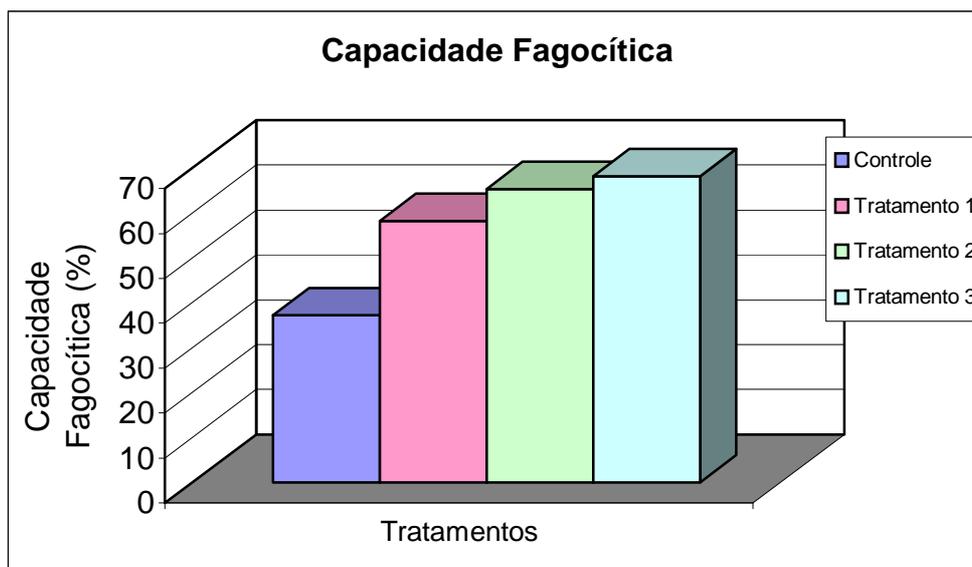


FIGURA 27 – Médias da frequência percentual, por tratamento, da capacidade fagocítica de imagos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico

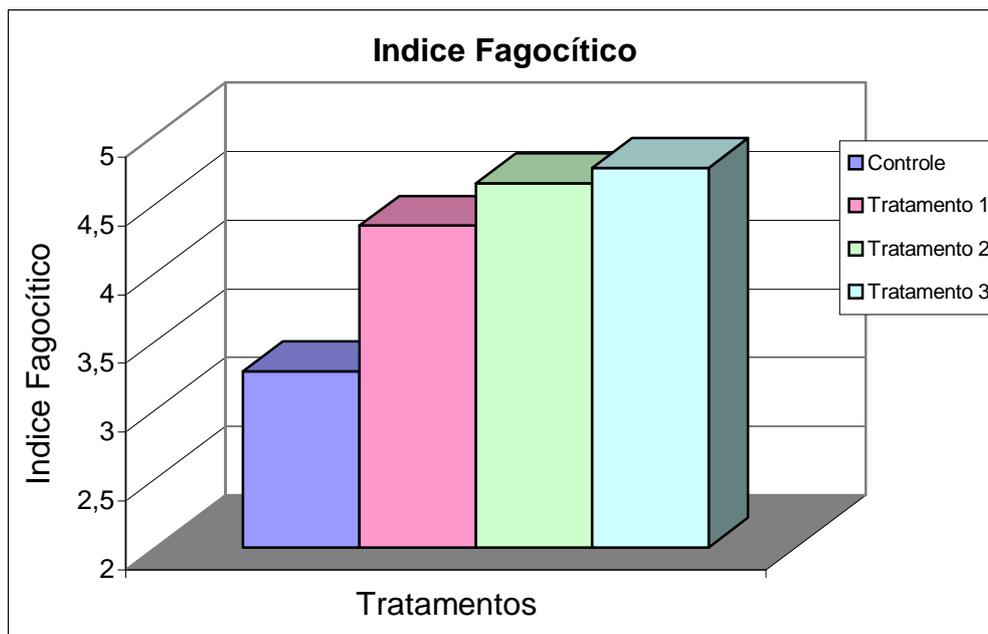


FIGURA 28 – Médias, por tratamento, do índice fagocítico de imagos de *R. catesbeiana*, no teste com probiótico

Com os resultados obtidos pode-se observar que a capacidade fagocítica dos animais foi influenciada positivamente pelo probiótico, sendo altamente significativa ($P=0,0019$). Os animais tratados com este produto apresentaram melhor capacidade fagocítica quando comparados com o grupo controle, mas a

dose utilizada não influenciou significativamente os resultados. O índice fagocítico também foi influenciado pelo probiótico ($P=0,0078$), apresentando melhores resultados quanto maior a dose utilizada (Tratamento 2 e Tratamento 3), mas não apresentando diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes doses de probióticos (Tabela 18).

A análise de regressão revelou efeitos significativos para as variáveis dependentes (capacidade fagocítica e índice fagocítico) para o componente quadrático gerando as equações: $CF = 37,98 + 8,60 \text{ dose} - 0,56 \text{ dose}^2$ e $IF = 3,32 + 0,43 \text{ dose} - 0,03 \text{ dose}^2$. Através do cálculo da derivada dessas equações encontramos o ponto de máxima resposta da capacidade fagocítica e do índice fagocítico, indicando as doses de probiótico ministrado que apresentariam melhores resultados, sendo 7,68g/Kg de ração para CF e 7,17g/Kg de ração para IF.

3.3.2.3. Análises hematológicas

Os resultados das análises hematológicas estão apresentados na Tabela 19 e Figura 29.

Tabela 19 – Médias e erro padrão dos parâmetros hematológicos de imagos de *R. catesbeiana*, em cada tratamento no teste com probiótico

	Ht	Hb	Er	VCM	CHCM
Controle	20,08 ± 1,57	4,97 ± 0,55	33,83 ± 4,53	642,6 ± 89,5	24,75 ± 1,72 ^{ab}
Tratamento 1	21,25 ± 1,09	6,04 ± 0,58	41,42 ± 2,46	523,9 ± 45,3	28,22 ± 1,65 ^a
Tratamento 2	23,67 ± 2,26	4,65 ± 0,61	39,25 ± 3,69	606,0 ± 32,0	19,84 ± 1,88 ^b
Tratamento 3	24,50 ± 0,89	6,23 ± 0,40	46,42 ± 3,40	538,0 ± 33,3	25,29 ± 0,80 ^{ab}
F para tratamentos	1,77 ^{NS}	2,06 ^{NS}	2,09 ^{NS}	1,04 ^{NS}	4,90 [*]

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 (%). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade NS = Não significativo

* Significativo a 5%

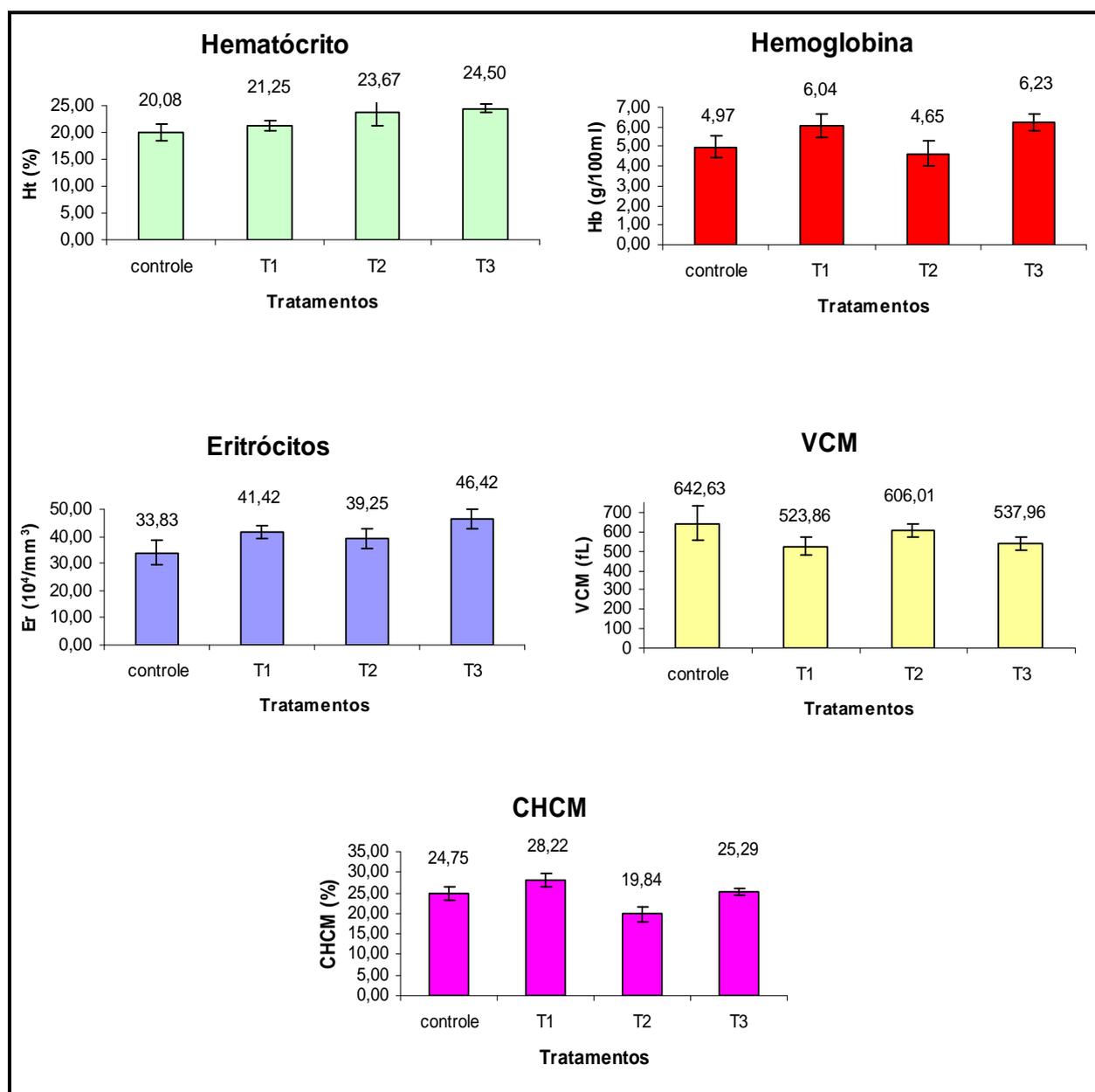


FIGURA 29 - Parâmetros hematológicos de imagos de *R. catesbeiana*, em cada tratamento (T) no teste com probiótico. T1 – 2,5 g/Kg de ração, T2 – 5 g/Kg de ração e T3 – 10 g/Kg de ração

Os resultados apresentados mostram que os parâmetros hematológicos dos imagos dos diferentes tratamentos não diferiram estatisticamente. Apenas os valores de CHCM evidenciaram diferenças quando se compara o Tratamento 1 com o Tratamento 2 ($P=0,01$) apresentando valores inferiores neste último, demonstrando que este resultado não está relacionado com o uso

do probiótico. Apesar de não apresentar diferenças significativas, pode-se observar discreto aumento nos valores de hematócrito e número de eritrócitos à medida que se elevou a dose do probiótico.

Os valores médios e erro padrão da contagem de trombócitos por milímetro cúbico ao final do experimento foram de $613,76 \pm 479,93$ para o controle, $210,19 \pm 94,92$ para o Tratamento 1, $1180,83 \pm 471,15$ para o Tratamento 2 e, $359,97 \pm 230,90$ para o Tratamento 3. Os resultados dos valores da contagem de trombócitos mostram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($F = 1,42$ e $P=0,27$).

Os números absolutos médios dos leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos (CDL) em imagens ao final do experimento encontram-se na Tabela 20, e os valores em percentual da CDL encontram-se na Tabela 21.

TABELA 20 - Médias por milímetro cúbico e erro padrão dos números absolutos de leucócitos totais e da contagem diferencial de leucócitos de imagens de *R. catesbeiana*, por tratamento no teste com probiótico

	Lc T/mm ³	Lf/mm ³	Nt/mm ³	Bs/mm ³	Es/mm ³	Mn/mm ³
Controle	20.214,26 ± 5.669,82	17.736,23 ± 5.104,20	1.139,32 ± 320,00	1.210,64 ± 454,33	249,64 ± 66,01	24,67 ± 20,59
Tratamento 1	21.498,59 ± 3738,00	16.830,21 ± 2.893,57	2.484,57 ± 673,07	1.382,76 ± 369,66	633,48 ± 242,87	167,56 ± 43,37
Tratamento 2	18.104,03 ± 3.180,66	15.168,69 ± 2.755,41	1.372,40 ± 424,80	1.156,48 ± 318,21	343,20 ± 68,45	63,26 ± 40,31
Tratamento 3	13.929,16 ± 2.420,75	11.372,84 ± 2.322,90	1.359,92 ± 483,53	894,49 ± 180,61	216,54 ± 66,65	85,38 ± 33,80
F para tratamentos	0,71 ^{NS}	0,67 ^{NS}	1,52 ^{NS}	0,36 ^{NS}	1,98 ^{NS}	2,87 ^{NS}

Lc T = Leucócitos totais; Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito.
NS = Não significativo

O gráfico detalhando os resultados dos números de leucócitos totais está apresentado na Figura 30.

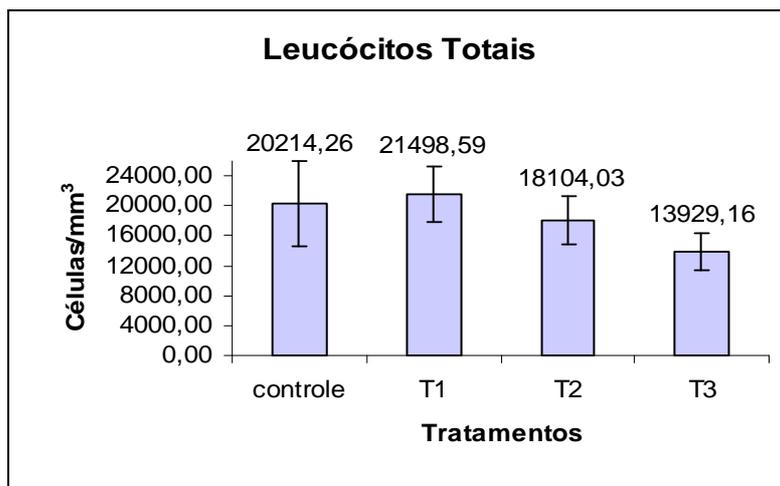


FIGURA 30 - Números absolutos médios dos leucócitos totais de imagos de *R. catesbeiana*, por tratamento no teste com probiótico. T1 - 2,5 g/Kg de ração, T2 - 5 g/Kg de ração e T3 - 10 g/Kg de ração

Os valores de leucócitos totais encontrados em imagos durante o Experimento III variaram de 13.929,16 a 21.498,59/mm³. Estes valores encontram-se superiores aos observados em girinos e imagos durante o Experimento II.

TABELA 21 - Médias e erro padrão dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de imagos *R. catesbeiana*, por tratamento no teste com probiótico

	Lf (%)	Nt (%)	Bs (%)	Es (%)	Mn (%)
Controle	87,10 ± 1,69	6,12 ± 0,85	5,23 ± 1,62	1,31 ± 0,11	0,24 ± 0,17
Tratamento 1	79,17 ± 3,16	10,59 ± 2,10	6,64 ± 1,46	2,65 ± 0,93	0,96 ± 0,28
Tratamento 2	83,58 ± 2,63	7,96 ± 1,86	6,29 ± 1,02	1,84 ± 0,28	0,32 ± 0,20
Tratamento 3	80,69 ± 3,97	9,78 ± 3,11	7,35 ± 1,70	1,46 ± 0,31	0,72 ± 0,32
F para tratamentos	1,37 ^{NS}	0,89 ^{NS}	0,36 ^{NS}	1,37 ^{NS}	1,82 ^{NS}

Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito
NS = Não significativo

Os resultados de CDL em porcentagem e valores absolutos estão apresentados na Figura 31.

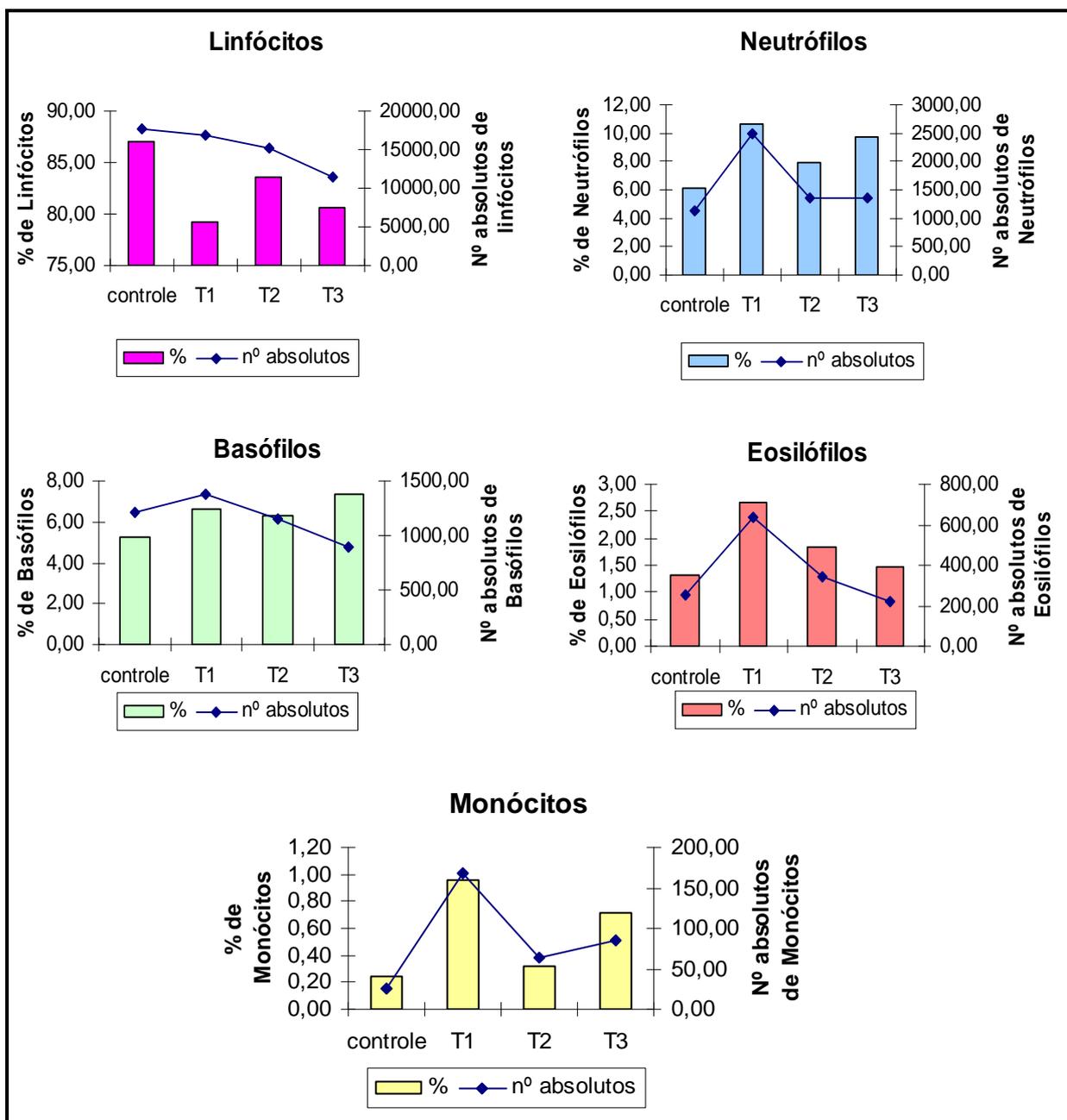


FIGURA 31 - Valores em porcentagem e números absolutos da contagem diferencial de leucócitos de imagos de *R. catesbeiana*, em cada tratamento no teste com probiótico. T1 - 2,5 g/Kg de ração, T2 - 5 g/Kg de ração e T3 - 10 g/Kg de ração

Os valores médios dos leucócitos, tanto em valores absolutos quanto em porcentagem não demonstraram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

3.4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Altos índices zootécnicos na produção de rãs estão intimamente relacionados com a saúde desses animais (FONTANELLO *et al.*, 1987). É de extrema importância que o sistema imunológico esteja atuando de forma adequada e eficiente para possibilitar um bom desempenho produtivo e impedir a introdução de doenças e, conseqüentemente, a mobilização de nutrientes para atividades que não estejam relacionadas com a produção (FERKET, 2003).

O probiótico é um suplemento alimentar, constituído de microorganismos vivos que, no organismo do animal, atuam de forma benéfica melhorando o equilíbrio da microbióta intestinal (FULLER, 1989). Em equilíbrio, o trato intestinal consegue, de forma mais eficiente, absorver nutrientes e impedir a fixação e multiplicação de agentes patogênicos na mucosa intestinal, prevenindo, desta forma, a instalação de doenças entéricas e, conseqüentemente, melhorando a produtividade, diminuindo a mortalidade e a contaminação dos produtos de origem animal.

Pretendia-se, com a incorporação de probióticos à dieta dos girinos, diminuir a mortalidade ao longo de seu ciclo de vida e maximizar o desenvolvimento ponderal destes animais. Entretanto, nos três experimentos realizados, no presente estudo, não foram evidenciadas diferenças significativas para o ganho de peso e sobrevivência entre os tratamentos, podendo-se concluir que, os probióticos testados não influenciaram positivamente estes valores para girinos e imagos de rã-touro (Figura 32).

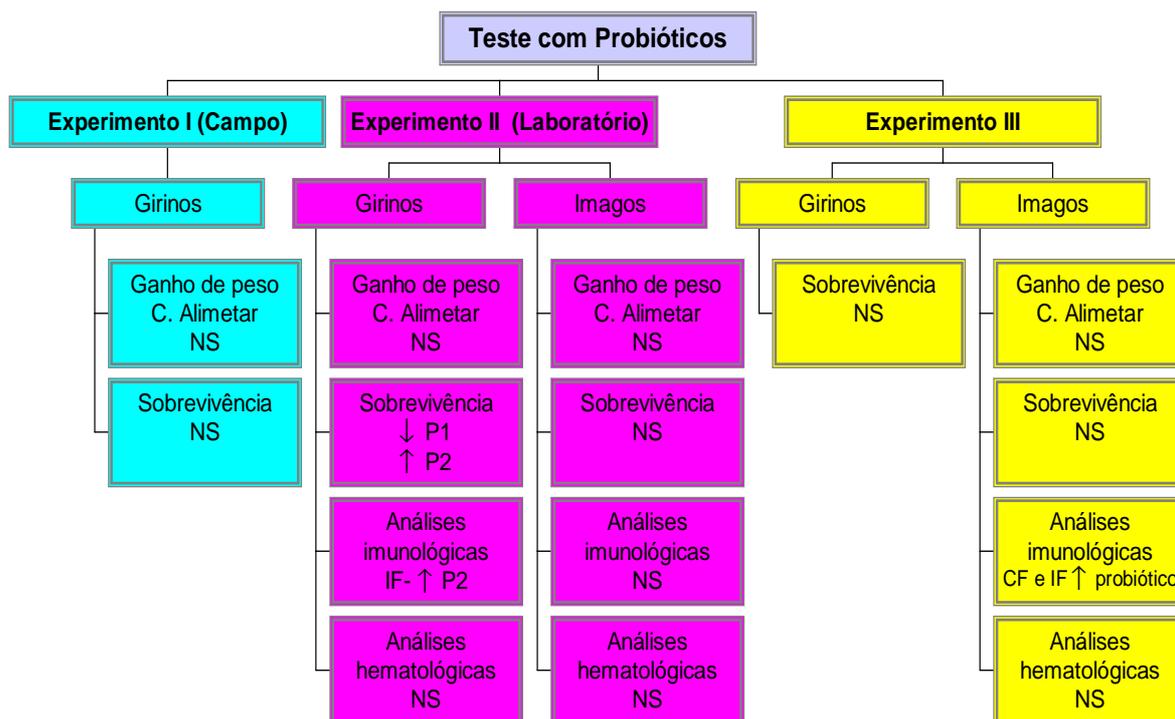


FIGURA 32 – Organograma resumindo os resultados do Teste com Probióticos de cada etapa Experimental.
NS = Não significativo

Apesar de não haver diferenças significativas das médias de desempenho (peso e sobrevivência) entre o grupo controle e os grupos tratados, deve-se lembrar que os probióticos têm sua ação evidenciada em períodos de baixa resistência, tais como estresse, vacinações e contaminação por bactérias prejudiciais aos organismos, o que não aconteceu neste trabalho. Em outras palavras, como afirmam CANADELL e GARCIA (1992), é crítico manter-se a flora intestinal “saudável” durante tais períodos de instabilidade, fato este constatado nesta experimentação.

No presente estudo, as taxas de sobrevivência observadas variaram bastante entre os experimentos. No Experimento I, a sobrevivência dos girinos no grupo tratado com o *Bacillus subtilis* foi mais elevada que nos demais tratamentos. No Experimento II, a sobrevivência dos girinos também foi mais elevada neste grupo, com mortalidade significativamente mais alta no grupo

tratado com o Probiótico 1, mas sem diferença estatística do controle. Neste experimento não foram registradas mortalidades para os imagos. No Experimento III os girinos tiveram sobrevivência elevada, e os imagos apresentaram valores parecidos entre os tratamentos.

FLORES *et al.* (2002) trabalhando com juvenis de *Oreochromis niloticus* verificaram que os animais tratados com probióticos e antibióticos apresentaram maior sobrevivência comparada ao grupo controle e ainda, os animais tratados apenas com probiótico obtiveram maior ganho de peso comparado aos demais tratamentos.

Já DIAS *et al.* (2005) em experimento realizado com rãs-touro na fase de engorda, utilizando três probióticos diferentes: P1 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium*; P2 - *Bacillus subtilis*; e P3 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus lactis*, observaram taxa de sobrevivência menor no grupo controle (11,85%), que nos demais grupos tratados (P1=41,48%, P2=42,22% e P3=33,33%).

Ainda, experimentos utilizando larvas de *Scophthalmus maximus* realizados por HUYS *et al.* (2001) mostraram uma sobrevivência de 35% em 11 dias de experimentação nos organismos tratados com bactérias potencialmente benéficas. Para essa mesma espécie de peixe, GATESOUBE (1994) verificou aumento na sobrevivência ao administrar bactérias que produzem ácido láctico, substância esta que age como um bactericida para algumas bactérias patogênicas. Utilizando-se levedura na alimentação da ostra *Crassostrea gigas*, DOUILLET e LANGDON (1994) obtiveram também alta sobrevivência nas larvas.

Segundo WIRZ *et al.* (1992) a fase crítica da produção de rãs-touro é a fase pós-metamorfose, momento em que os animais encontram-se mais vulneráveis às variações ambientais, ocorrendo altas taxas de mortalidade. O período de metamorfose caracteriza-se por modificações na morfologia e

fisiologia das rãs, para possibilitar a sua sobrevivência no ambiente terrestre (LIMA e AGOSTINHO, 1992). Trata-se de um processo fisiológico contínuo em que os animais se tornam imunologicamente mais sensíveis e susceptíveis as agressões ambientais (HORTON, 1994). Neste período é imprescindível evitar-se contaminações por agentes patológicos.

Entretanto, as mortalidades nesta fase e nos primeiros 40 dias após a metamorfose, em criações comerciais (cerca de 30%) relatadas por vários autores (FONTANELLO *et al.*, 1987; WIRZ *et al.*, 1992; FONTANELLO e FERREIRA, 1999; FERREIRA *et al.*, 2002) não se repetiram nos experimentos realizados. Provavelmente ocorreram melhorias nas condições experimentais de criação impedindo uma maior “expressão” da ação dos probióticos.

Embora os resultados da primeira etapa dos testes sejam pouco conclusivos, muitos estudos relatam efeitos imunoestimulantes relacionados com o uso de probióticos nas dietas de diferentes espécies animais, justificando a continuidade de estudos para que se obtenham maiores esclarecimentos do modo de ação deste suplemento alimentar, principalmente sobre o sistema imunológico das rãs. Para se obter estes esclarecimentos, realizaram-se os testes imunológicos, avaliando os animais na presença de situações de desafio sanitário.

As análises imunológicas realizadas nos Experimentos II e III apresentaram bons resultados nos grupos tratados com probiótico. No Experimento II os girinos tratados com *Bacillus subtilis* tiveram o índice fagocítico significativamente melhor. Os imagos deste experimento também tiveram melhores resultados nos grupos tratados, mas sem diferença estatística. No Experimento III, tanto o índice fagocítico quanto a capacidade fagocítica foram significativamente melhores nos grupos tratados com o *Bacillus subtilis*, com efeitos diretamente proporcionais às doses utilizadas (ANEXO 2).

DIAS (2006) analisando a capacidade e o índice fagocítico de rãs-touro na fase de engorda, tratadas com dois probióticos: P1 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium*; P2 - *Bacillus subtilis*, também observou influência positiva da capacidade fagocítica em rãs alimentadas com este produto. Este autor verificou no grupo controle capacidade fagocítica de $48,2 \pm 4,19$ %, enquanto que nos tratamentos que utilizaram probióticos, observou média de $80,83 \pm 3,8$ %. Para o índice fagocítico, entretanto, não foram observadas influências significativas, obtendo resultados variando entre 3,39 a 3,93.

Em estudos realizados em camundongos, por PERDIGON *et al.* (1991), foi possível observar a proteção contra patógenos intestinais através da indução do aumento da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais nos animais tratados com probiótico.

Segundo CROSS (2002) tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune, apesar dos mecanismos pelos quais os probióticos estimulam a imunidade dos animais ainda não estarem esclarecidos. Segundo COPPOLA e GIL-TURNES (2004), bactérias do gênero *Bacillus* podem estimular a resposta imune e serem utilizadas como imunomoduladores. Esta habilidade das bactérias probióticas em modular a imunidade e aumentar o balanço microbiano de microrganismos entéricos comensais, oferece uma alternativa biologicamente efetiva para melhorar a saúde sem recorrer ao consumo de drogas alopáticas (KAILASAPATHY e CHIN, 2000).

A adição de probiótico à dieta dos girinos e imagos, demonstrou não influenciar nas análises hematológicas (ANEXO 3). DIAS (2006) testando diferentes probióticos em rãs-touro também não observou influência destes produtos nos valores hematológicos.

Os resultados observados no presente trabalho encontram-se próximos aos valores encontrados por COPPO (2003) e DIAS (2006), que avaliaram os parâmetros hematológicos de *Rana catesbeiana* com peso médio de 200 g. COPPO (2003) obteve valores de hematócrito variando de 28,6 a 31,6%, e DIAS (2006) obteve valores entre 27,25 e 30,17% para este parâmetro. Os valores de hemoglobina encontrados na literatura para *R. catesbeiana* foram de 6,41 a 7,20 g/100mL (COPPO, 2003), 8,93 a 9,90 g/100mL (DIAS, 2006) e, em rãs mais jovens, FIORANELLI *et al.* (2004) obteve valores mais baixos de hemoglobina, com média de 5,9 g/100mL, valor que se aproxima mais aos resultados do presente trabalho. Na contagem de eritrócitos DIAS (2006) obteve valores variando de 31,67 a 47,67 x 10⁴/mm³ e COPPO (2003) de 40 a 44 x 10⁴/mm³. Segundo FIORANELLI *et al.* (2004), os valores de hematócrito, eritrócito e hemoglobina aumentam à medida que se avança a idade em *Rana catesbeiana*.

Os valores de VCM e CHCM encontrados neste trabalho, também se aproximam dos valores encontrados na literatura, sendo que os valores de VCM encontrados por COPPO (2003) variavam de 686 a 732 fL e por DIAS (2006) de 713,6 a 947,6 fL; e os valores de CHCM foram de 22,6 a 24,0 % (COPPO, 2003) e 32,35 a 33,96 (DIAS, 2006).

Os valores de linfócitos também se encontram superiores aos observados por outros autores, mas que por sua vez trabalharam com rãs adultas: 52,77% (WANG e CHANG, 1994); 26,8% (FIORANELLI *et al.*, 2003); 60,1% (DIAS, 2006); aproximando-se mais dos valores encontrados para girinos: 79,9% (FERREIRA *et al.*, 2003); 72,9% (ROMERO-ARAUCO, 2006). Já a porcentagem de neutrófilos observada para imagos foi inferior à de rãs adultas para estes autores: 29,9% (WANG e CHANG, 1994) e 24,13 % (DIAS, 2006), o que é esperado para o quadro hematológico.

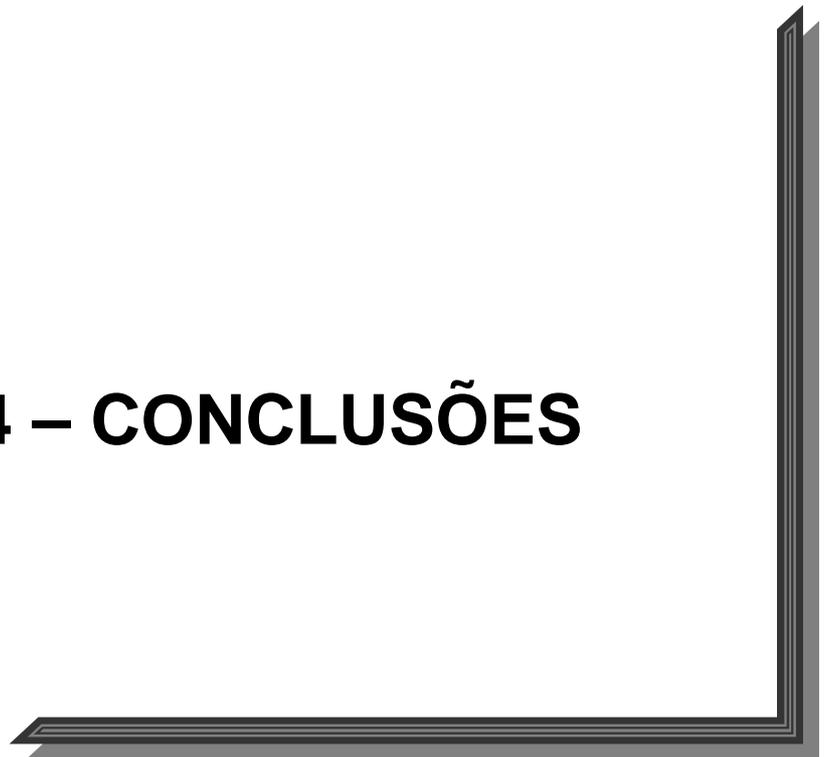
Segundo FIORANELLI *et al.* (2003) e COPPO *et al.* (2005) a concentração de glóbulos brancos e a proporção de linfócitos tendem a

diminuir com o avanço da idade em *R. catesbeiana*, enquanto a porcentagem de neutrófilos tende a aumentar, conforme tem sido constatado em várias espécies de mamíferos em crescimento, incluindo humanos (COPPO, 2003), e concordando com os resultados do presente trabalho quando comparamos com os valores apresentados por outros autores utilizando rãs adultas.

DIAS (2006) constatou diminuição dos valores absolutos de basófilos em rãs tratadas com probióticos. Os valores de eosinófilos e monócitos encontrados por este autor foram 1,37% e 1,1%, respectivamente, valores semelhantes ao do presente trabalho.

As condições de criação podem influenciar de forma direta na eficiência dos aditivos promotores de crescimento (BORATTO *et al.*, 2004). Práticas adequadas de manejo, como as utilizadas neste experimento, podem levar a resultados que não mostrem efeito significativo desses aditivos sobre o desempenho dos animais. Contudo, quando expostos às situações de desafio imunológico, bem como, provavelmente, outras situações de estresse, os probióticos podem evidenciar sua ação nos girinos e imagos de rã-touro mantidas em laboratório ou em campo.

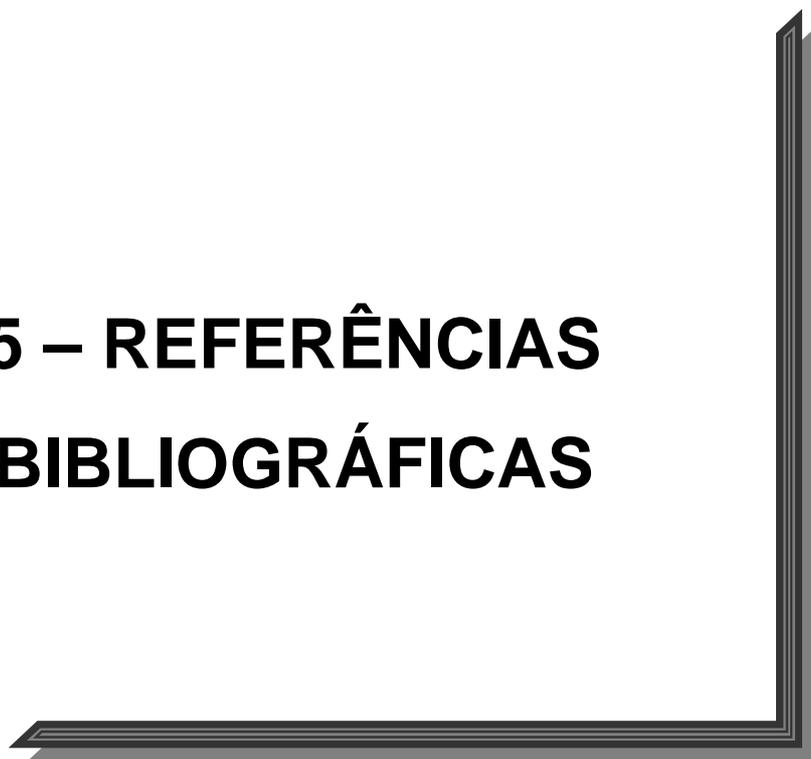
4 – CONCLUSÕES



Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- os probióticos utilizados não influenciaram positivamente o ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência dos girinos e imagos;
- estes produtos não alteraram os parâmetros hematológicos;
- a utilização do probiótico *Bacillus subtilis* produziu efeito imunoestimulante em girinos e imagos de rã-touro (*Rana catesbeiana*), o que indica que em condições de estresse imunológico, estes animais responderiam prontamente às reações inflamatórias.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ALBINATI, R. C. B. 1995 *Estudos biométricos e nutricionais com girinos de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802)*. Viçosa. 103p. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, UFV).
- ALBINATI, R. C. B. 2001 Nutrição de girinos. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA (XI ENAR). Bragança Paulista. *Anais...* São Paulo, Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, p. 64-71.
- BARBALHO, O. J. M. 1991 *Exigência de proteína bruta de rã-touro na fase de terminação*. Viçosa. 66p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa).
- BASTOS, J.R. 1966 Sobre a série vermelha do sangue de *Scomberomorus maculatus* (Mitchill). *Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará*, Fortaleza, 6(1): 39-45.
- BORATTO, A. J.; LOPES, D. C.; OLIVEIRA, R. F. M.; ALBINO, L. F. T.; SÁ, L. M.; OLIVEIRA, G. A. 2004. Uso de Antibiótico, de Probiótico e de Homeopatia, em Frangos de Corte Criados em Ambiente de Conforto, Inoculados ou não com *Escherichia coli*. *Revista Brasileira Zootecnia*, Viçosa, 33(6): 1477-1485.
- BUENO GUIMARÃES, H.M. 1999 *Avaliação da resposta de Rana catesbeiana frente às variações ambientais – determinação das condições ideais de manutenção em biotério e da resposta aos poluentes aquáticos*. São Paulo. 180p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP).
- CANADELL, J. e GARCIA, I.A. 1992 Introducción a la tecnología probiótica. *Noticeres*, Caracas, 5: 1-8.

- CASILLAS, E. e SMITH, L.S. 1977 Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*, Huntingdon, 10(5): 481-491.
- CASTRO, J.C. 1995 Nutrição e Alimentação de rãs. In: 1st. INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY E VIII ENAR – ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, Viçosa. *Anais...Minas Gerais*, Associação Brasileira dos Criadores de Rãs e Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, p. 35-57.
- CASTRO, J. C. e PINTO, A. T. 2000 Qualidade de água em tanques de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, cultivadas em diferentes densidades de estocagem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 29(6): 1903-1911.
- CASTRO, J. C. 2003 Uso de Aditivos e Probióticos em Rações Animais. In: FERREIRA, C.M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TEIXEIRA, P. C.; FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C. I. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RANICULTURA E II CICLO DE PALESTRA SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34: 12-18.
- COLLIER, H.B. 1944 The standardizations of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, 50: 550-552.
- COOPER, E. L. 1967 Lympho-mieloid organs of amphibia. I. Appearance during larval and adult stages of *Rana catesbeiana*. *Journal of Morphology*, Temuco, 122: 381-398.
- COPPO, J.A.; MUSSART, N.B.; FIORANELLI, S.A.; BARBOZA, N.N.; KOZA, G.A. 2005 Variaciones fisiológicas atribuibles al crecimiento, alimentación y temperatura ambiental en sangre de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). *Revista Veterinária*, Corrientes, 16(2): 74-83.

- COPPO, J. A. 2003 El médio interno de la “rana toro” (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). Revisión bibliográfica. *Revista Veterinária*, Corrientes, 14(1): 25-41.
- COPPOLA, M.M. e GIL-TURNES, C. 2004 Efeito do probiótico na resposta imune. *Ciência Rural*, Santa Maria, 34(4): 1297-1303.
- CROSS, M.L. 2002 Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam, 34(4): 245-253.
- CULLEY JR, D. D. e GRAVOIS JR, C. T. 1971 Recent development in frog culture. In: ANUAL CONFERENCE SOUTHERN ASSOCIATION TO GAME AND FISH COMMISSIONERS, Charleston. Proceedings... Charleston: Southern Association to Game and Fish Comissioners, p. 583-596.
- DIAS, D.C. 2006 *Influência de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro **Rana catesbeiana** Shaw, 1802*. Jaboticabal. 80p. (Dissertação de Mestrado. Centro de Aqüicultura da UNESP).
- DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M.; FERREIRA, C.M.; MARTINS, E.G.; STÉFANI, M.V. 2005 Influencia de tres probioticos en el desempeño y sobrevivencia de rana toro, *Rana catesbeina*, en la fase de engorde. *En: II Simposio internacional de acuicultura “ACUACUBA 2005”* Habana, Cuba:1-8
- DIAS, J. L. C. 1992 *Influencia da temperatura ambiente sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (**Rana catesbeiana** Shaw, 1802)*. São Paulo, 117p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP).

- DIAS, J.L.C. e SENHORINI, I.L. 1991 Qualitative evaluation of the inflammatory response modulated by temperature in tadpoles of *Rana catesbeiana*. *Ciência e Cultura*, Campinas, 43: 304-306.
- DOUILLET, P. A. e LANGDON, J. 1994 Use of a probiotic for culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, Amsterdam, 119: 25-40
- DUELLMAN, W.E. e TRUEB, L. 1986 *Biology of amphibians*, Baltimore - Maryland, The Johns Hopkins University Press. 613p.
- ERICKSON, K.L. e HUBBARD, N.E. 2000 Probiotic immunomodulation in health and diseases. *Journal of Nutrition*, Rockville Pike, Bethesda, 130: 403-409.
- FERKET, P.R. 2003 Manutenção da saúde intestinal em um mundo sem antibióticos. In: RONDA LATINO AMERICANA DA ALLTECH, Campinas. *Anais...Campinas: Alltech*, p.26-39.
- FERREIRA, C.M.; BUENO-GUMARÃES, H.M.; SOARES, S.R.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RIVERO, D.H.R.F.; SALDIVA, P.H.N. 2003 Hematological markers of cooper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). *Revista Brasileira de Toxicologia*, São Paulo, 16(2): 83-88.
- FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S. 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33: 1-15.
- FERREIRA, C.M. 2001 Anfíbios: Potencialidades, descobertas e perspectivas. In: FERREIRA, C.M. I CICLO DE PALESTRAS SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA, *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 31: 11-14.

- FIORANELLI, S. A.; COPPO, N. B.; COPPO, J. A. 2003 Los glóbulos branco de *Rana catesbeiana* (Anfibia: Ranidae) Variación según sexo edad, peso, crianza, alimentación y época del año. Universidad Nacional del Nordeste. Disponível em: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.pdf> . Acesso em 20/03/2006.
- FIORANELLI, S.A.; MUSSART, N.B.; COPPO, J.A. 2004 Efeito do sistema de criação, alimentação e mudanças estacionais sobre o peso vivo e valores do hemograma da rã touro gigante (*Rana catesbeiana*). *Revista Veterinária, Corrientes*, 15(1): 9-16.
- FLORES, M. L; BRIONES, L. E.; NOVOA, M. A. O. 2002 Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: SUÁREZ, L. E. C.; MARIE, D. R., SALAZAR, M. T., CORTÉS, M. G. G. & SIMOES, N. *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Cancún, Quintana Roo, México: 314-335.
- FONTANELLO, D. e FERREIRA, C.M. 1999 *Ranário climatizado*. In: X ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA (X ENAR) São Miguel do Iguçu: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura (ABETRA). 20p. (Manual técnico).
- FONTANELLO, D.; SOARES, H. A.; MANDELLI JR., J.; PENTEADO, L. A.; RODRIGUES, A. L.; JUSTO, C. L.; CAMPOS, B. E. S. 1987 Influência da densidade populacional na sobrevivência de rã-touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) em criação intensiva. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*, São Paulo, 24(2): 213-216.
- FONTANELLO, D.; WIRZ, R. R., PENTEADO, L. A.; CAMPOS, B. E. S.; MANDELLI JR., J.; SOARES, H. A. 1988 Ganho de peso de rãs-touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) criadas em gaiolas individuais de diferentes tamanhos. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 15(1): 45-49.

- FULLER, R. 1977 The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Science*, Abingdon, 18: 85-94.
- FULLER, R. 1989 Probiotics in man and animals: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 66: 365-378.
- GATESOUBE, F. 1994 Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquatic Living Resources*, Istanbul, 7: 277-282.
- GIBSON, G.R. e ROBERFROID, M.B. 1995 Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, Bethesda, 125: 1401-1412.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971 Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal Clinical of Pathology*, Hagerstown, 56(1): 35-39.
- GOSNER, K.L. 1960 A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, Lafayette, 16: 183-190.
- GUZMÁN, G. A. 1992 Aplicación de Probióticos en la Acuicultura. In: SUÁREZ, L. E. C.; MARIE, D. R.; ALFARO, R. M. *Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Noevo León, México: Universidade Autónoma de Nuevo León Monterrey. p.332-337.
- HARRIS, J.A. 1972 Seasonal variation in some hematological characteristics of *Rana pipiens*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, 43(A): 975-989.

- HOLZAPFEL, W.H. e SCHILLINGER, U. 2002 Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, Amsterdam, 35(2/3): 109-116.
- HORTON, J.D. 1994 Amphibians. In: TURNER, R.J. *Immunology: A comparative approach*. England: Jonh Wiley & Sons Ltd. p.102-135.
- HRUEB, T.C. e SMITH, S.A. 1998 Hematology of fish. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5^a ed., Philadelphia, 1120-1125 p.
- HUYS, L. DHERT, P. ROBLES, R. OLLEVIER, F. SORGELOOS, P. & SWINGS, J. 2001 Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 193, 25-37
- ISOLAURI, E.; SUTAS, Y.; KANKAANPAA, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. 2001 Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, Rockville Pike, Bethesda, 73 (2): 4445-4505.
- JIN, L.Z. 1997 Probiotic in poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal*, Cambrige, 53: 351-368.
- KAILASAPATHY, K. e CHIN, J. 2000 Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, Canberra, 78: 80-88.
- KENNY, J.S. 1969 Feeding mechanisms in anuran larvae. *Journal of Zoology*, Oxford, 157: 225-246.
- LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. 1999 *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 211p.
- LILLY, D.M. e STILLWELL, R.H. 1965 Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, Atlanta, 147: 747-748.

- LIMA, S.L.; AGOSTINHO; C. A.; PIRES, J. S. R. 1988 Ganho de peso e conversão alimentar de rã-touro *Rana catesbeiana*, com ração (ensaios preliminares). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 6; 1988, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...*Rio de Janeiro. p. 35-40.
- LIMA, S.L. e AGOSTINHO, C. A. 1989 *A Criação de Rãs*. 2ª ed, São Paulo: Globo. 187p.
- LIMA, S.L. e AGOSTINHO, C.A. 1992 *A Tecnologia de Criação de Rãs*. Viçosa: Folha de Viçosa. 168p.
- MAHONEY, J.B. e MCNULTY, J.K. 1992 Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan estuary. *Transactions of the American Fisheries Society, Grosvenorlane, Bethesda, 121*: 261-268.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. 2002 Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal, Amsterdam, 12*: 173-182.
- MELLO, S.C.R.P. 1997 Biologia dos anfíbios. In: IX ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA E II INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY, Santos. *Anais...*São Paulo, Associação Brasileira dos Criadores de Rãs e Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, p. 6-8.
- MORGULIS. M. S. 2002 Imunologia aplicada. In: MACARI, M. ; FURLAM, R. L.; GONZALES, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP. p.231-246.

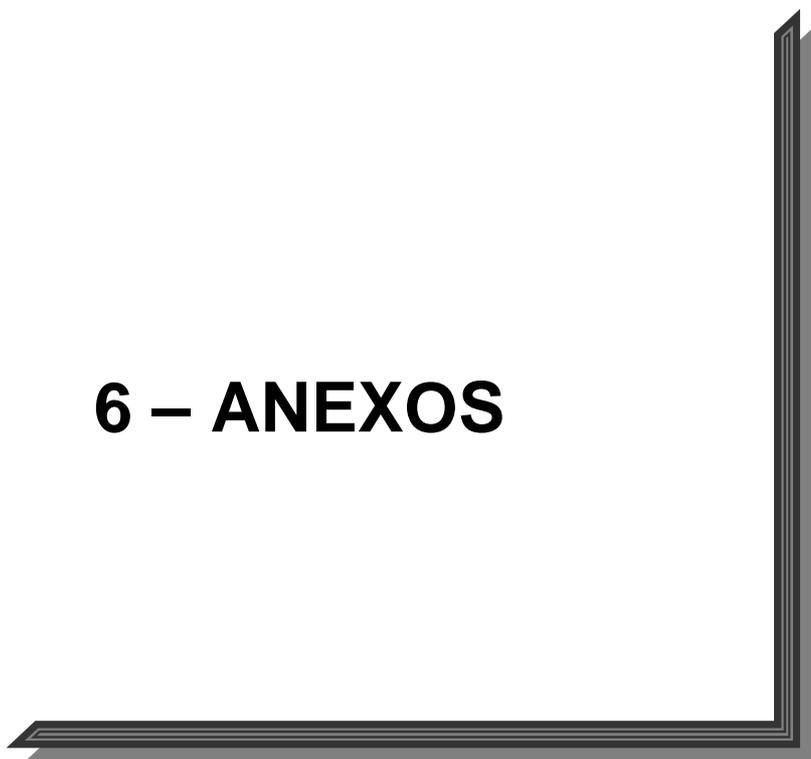
- PALENSKE, N.M. e SAUNDERS, D.K. 2003 Blood viscosity and hematology of American bullfrogs (*Rana catesbeiana*) at low temperature. *Journal of Thermal Biology*, New York, 28: 271-277.
- PARKER, R. B. 1974 Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, London, 29: 4-8.
- PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. 1996 Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. *Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*, São Paulo, 33(1): 15-18.
- PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; HOLGADO, A.P.R. 1991 Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*-influence of dose on the secretory immune-response and protective capacity in intestinal infections. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, 58(4): 485-496.
- QURESHI, M. A. 2003 Avian macrophage and immune response: An Overview. *Poultry Science*, Columbus, 82: 691-698.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e EIRAS, A.C. 1992 Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de 13 espécies de teleósteos do Rio Paraná – PR. In: 7º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA E 2º ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, Peruíbe. *Anais...* São Paulo, Associação Brasileira de Aquicultura e Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos. p.173-182.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. 1995 Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunas de Cananéia-SP. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 22(1): 23-40.

- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SILVA-SOUZA, A. 2004 Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela. p.89-120.
- RIBEIRO-FILHO, O.P. 1998 Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) com uso de extrato bruto hipofisário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 27(4): 658-663.
- ROMERO-ARAUCO, L.R. 2006 *Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis em girinos de rã-touro (**Rana catesbeiana**)* Jaboticabal. 102p. (Tese de Doutorado. Centro de Aqüicultura da UNESP).
- ROSENFELD, G. 1947 Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo, 20: 329-334
- SANDERS, M. E. 1998 Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, Amsterdam, 8: 341-347.
- SANDERS, M. E. e KLAENHAMMER, T. R. 2001 Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 84: 319-331.
- SILVA, J.R.M.C.; STAINES, N.A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PORTONETO, L.R; BORGES, J.C.S. 2002 Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology*, Scotland, 60: 466-478.

- SILVA, J.R.M.C.; PORTO-NETO, L.R.; BORGES, J.C.S.; JENSCH-JUNIOR, B.E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Atlantic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, Berlin, 28(4): 326-328.
- STÉFANI, M. V. 2001 Alimentação e Nutrição. In: FERREIRA, C.M. I CICLO DE PALESTRA SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 31: 18-20.
- TURNER, R.J. 1988 Amphibians. In: ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N.N.A. *Vertebrate Blood Cells*, New York: Cambridge University Press. p. 129-209.
- WANG, J.H. e CHANG, M.H. 1994 Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Coa Fisheries*, Taipei, 46: 69-87.
- WINTROBE, M.M. 1934 Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematologica*, Leipzig, 51: 32-49.
- WIRZ, R.R.; FONTANELLO, D.; ARRUDA SOARES, H.; FREITAS, E.A.N.; TEIXEIRA FILHO, A.R. 1992 Ganho de peso de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), criada em gaiolas, com rações de diferentes níveis protéicos, consorciada com larvas de diptera (*Musca domestica*). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 19: 83-88.
- ZAR, J. H. 1996 *Biostatistical Analysis*. 3rd-ed. New Jersey, USA: Prentice-Hall. 662p.
- ZIEMER, C. J. e GIBSON, G. R. 1998 An overview of probiotics, prebiotcs and synbiotcs in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, Amsterdam, 8: 473-479.

ZULKIFLI, I. 2000 Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus cultures* and oxytetracycline under heat stress conditions. *British Poultry Science*, Brittainia, 41: 593-597.

6 – ANEXOS



ANEXO 1

Contagem de Eritrócitos (Er)

O método utilizado para a contagem dos eritrócitos foi o visual, em câmara hematómica de Neubauer. Esta câmara consiste em uma lâmina retangular de vidro espesso contendo dois retículos na porção central, separados longitudinalmente por um sulco profundo sobre a lâmina. Transversalmente, quatro sulcos limitam três plataformas. A central, onde estão os retículos, encontra-se deprimida 0,1mm em relação às laterais, dando a profundidade da câmara, limitada superiormente por uma lamínula especial adaptada firmemente sobre as plataformas laterais. O retículo, na câmara melhorada de Neubauer, é um quadrado de 3mm de lado e 9mm² de superfície, dividido em 9 áreas de 1mm², exceto quatro laterais e o da área central, está dividida em 25 quadrados de 1/25mm², sendo cada um destes subdividido em dezesseis quadradinhos de 1/400mm² totalizando 400 quadradinhos e 0,1mm³ na área central.

Inicialmente foram colocados 400 µL do diluente Hayen em tubo eppendorf. A este conteúdo foram adicionados 2 µL de sangue, resultando em uma diluição final de 1:200. Em seguida agitou-se por dois minutos e então, com auxílio de micropipeta, preencheu-se cada retículo da câmara de Neubauer. A contagem foi feita no aumento de 40x. Após a contagem em cada retículo, foi calculada a média do número de células e o resultado foi expresso em n^o células x 10⁴/mm³ de sangue.

Obs. Solução de Hayen

0,6 g de bicloreto de mercúrio

5,0 g de sulfato de sódio

1,0 g de cloreto de sódio

200,0 mL de água destilada

* Conservar em geladeira a 4°C

Determinação do Hematócrito (Ht)

A determinação do hematócrito (Ht) foi feita através da técnica de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971). Foi preenchido um tubo capilar com sangue, em seguida vedado em uma das extremidades com massa de modelar e levado à centrífuga a 12.500 rpm, durante cinco minutos. Na centrifugação, os eritrócitos foram compactados na parte inferior do tubo e mostrado o volume por eles ocupado em relação ao sangue total. A seguir, foi feita a leitura com auxílio do cartão padrão. O resultado foi dado em porcentagem ou volume.

Determinação da Taxa de Hemoglobina (Hb)

A determinação da taxa da hemoglobina (Hb) é uma dos meios mais simples e usual como indicador de anemias e foi realizada pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944). Com pipeta automática foram colocados 5 mL de cianometahemoglobina em tubo de ensaio e em seguida adicionou-se 20 µL de sangue. Depois de homogeneizado, aguardou-se por um período de 15 minutos. A amostra foi então levada à centrífuga a 3.500 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, a amostra foi colocada em cubetas de cristal e levada ao espectrofotômetro (a 540 nm), para ser realizada a leitura. O aparelho foi previamente calibrado com solução padrão (branco). O valor encontrado em transmitância foi transformado em absorbância pela seguinte fórmula:

$2 - \log X$ x fator de correção, onde:

X= valor encontrado por espectrofotometria

Fator de correção= 40,86 previamente calculado pela curva de calibração

O resultado final foi dado em g/dL

Índices Hematimétricos Absolutos

Em hematologia existem os índices hematimétricos absolutos que servem para avaliar e classificar morfológicamente o sangue dos animais em geral. Com os valores do número de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina foram calculados os seguintes índices hematimétricos, segundo WINTROBE (1934):

- **Volume Corpuscular Médio (VCM)** permite avaliar o volume dos eritrócitos;

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito}}{\text{n}^\circ \text{ Eritrócitos}} \times 10 = \text{fL}$$

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) permite medir o peso da hemoglobina em 100 mL de sangue;

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Taxa de hemoglobina}}{\text{Hematócrito}} \times 100 = \%$$

Obs. Solução de Cianometahemoglobina

0,2 g de ferricianeto de potássio

1,0 mg de bicarbonato de sódio

0,05 g de cianeto de potássio

1000,0 mL de água destilada

*Conservar em geladeira a 4°C

Confecção das extensões sangüíneas

Para cada animal foram feitas duas lâminas de extensões sangüíneas. Previamente, as lâminas foram lavadas com água e sabão, enxaguadas com água e colocadas em álcool/éter (1:1). Procedeu-se em seguida a secagem dessas lâminas com papel absorvente.

As primeiras alíquotas de sangue destinadas à avaliação dos parâmetros hematológicos foram colocadas em uma das extremidades da lâmina, em seguida com outra lâmina, com os cantos recortados, colocada em frente à gotícula e em ângulo de 45° sobre a lâmina inferior, fez-se um movimento para frente de modo a deslizar e espalhar a gotícula de sangue. Depois de prontas, as extensões foram coradas com o corante de ROSENFELD (1947), sendo cobertas por 10 gotas deste corante, ficando de três a cinco minutos em repouso. Em seguida, foi colocada a mesma quantidade de água destilada e homogeneizado com um bastão. Após 10 minutos as lâminas foram lavadas com água corrente, e secas a temperatura ambiente.

Contagem Total de Leucócitos (CTL) e Contagem Total de Trombócitos (CTT)

A Contagem Total de Leucócitos (CTL) e a Contagem Total de Trombócitos (CTT) foram realizadas nas extensões sanguíneas, em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100x) onde foram contadas 2.000 células (englobando eritrócitos, leucócitos e trombócitos) das quais marcou-se a quantidade de leucócitos e trombócitos. A contagem foi feita em todo o corpo da extensão, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”, contando um campo e em seguida o campo aleatório seguinte. Através de uma regra de três, considerando-se o número total de células contado na câmara de Neubauer, calculou-se o número total de leucócitos e de trombócitos. A partir deste cálculo, calculou-se os valores absolutos de cada leucócito, baseado em sua porcentagem (HRUEB e SMITH, 1998).

Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL)

A Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL) foi realizada nas extensões sanguíneas em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100X) onde foram contados 200 leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos,

linfócitos e monócitos) dos quais marcou-se a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos. A contagem foi feita em todo o corpo da extensão, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”, contando um campo e em seguida o campo logo seguinte. O número de cada elemento foi expresso em porcentagem, obtendo-se, desta forma, o valor relativo. O valor absoluto foi calculado por uma regra de três, partindo-se da contagem total de leucócitos e do valor relativo de cada elemento.

Obs. Corante Rosenfeld

A técnica de coloração ROSENFELD (1947) é uma mistura de corantes:

0,97 g Giemsa em pó

0,53 g May-Grünwald em pó

1.000 mL Metanol

Obs. Solução de heparina:

1,0 mL de solução de heparina (5.000 UI) (Liquemini[®])

50,0 mL de solução salina 0,7%

* Conservar em geladeira a 4°C

ANEXO 2

As figuras 33 e 34 representam os resultados das análises imunológicas realizadas nos Experimentos II e III, em girinos e imagos.

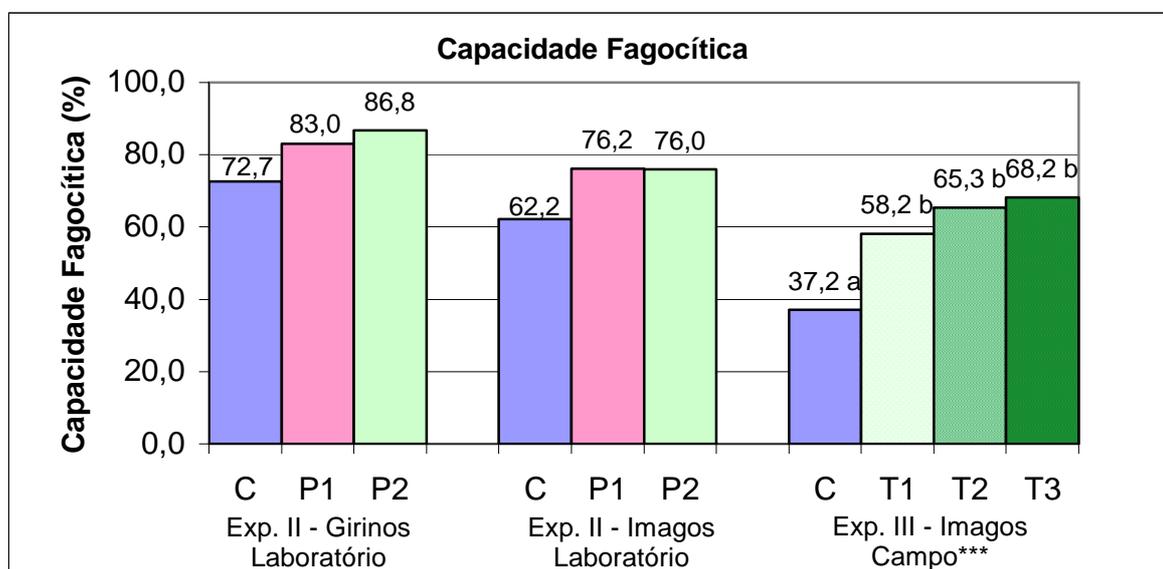


FIGURA 33 - Médias da freqüência percentual por tratamento, em cada Experimento, da capacidade fagocítica de girinos e imagos de *R. catesbeiana* no teste com probiótico. *** Significativo a 0,1%. C=controle, P1=*L. acidophilus*, *B. bifidum* e *E. faecium*; P2=*B. subtilis*; T1= *B. subtilis* (2,5 g/Kg), T2=*B. subtilis* (5 g/Kg) e T3= *B. subtilis* (10 g/Kg)

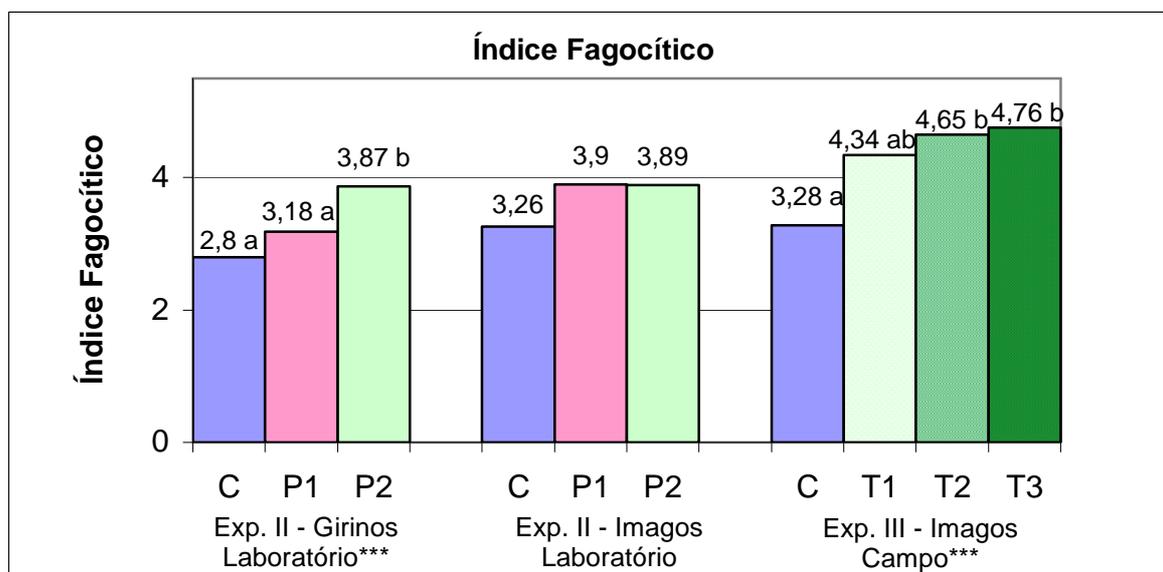


FIGURA 34 - Médias por tratamento, em cada Experimento, do índice fagocítico de girinos e imagos no teste com probiótico. ***Significativo a 0,1%. C=controle, P1=*L. acidophilus*, *B. bifidum* e *E. faecium*; P2=*B. subtilis*; T1= *B. subtilis* (2,5 g/Kg), T2=*B. subtilis* (5 g/Kg) e T3= *B. subtilis* (10 g/Kg)

ANEXO 3

As Tabelas 22 e 23 apresentam as médias dos parâmetros hematológicos de cada Experimento dos testes com probióticos em girinos e imagos.

TABELA 22 - Médias dos parâmetros hematológicos de girinos e imagos de *R. catesbeiana*, de cada Experimento nos testes com probióticos

	Ht	Hb	Er	VCM	CHCM
Experimento II girinos	15,94	3,20	29,53	584,50	20,23
Experimento II imagos	19,76	5,33	28,38	688,20	28,01
Experimento III imagos	22,38	5,47	40,23	577,61	24,53

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 (%)

TABELA 23 - Médias dos leucócitos totais e dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos de girinos e imagos de *R. catesbeiana*, de cada Experimento no teste com probiótico

	Lc T (mm^3)	Lf (%)	Nt (%)	Bs (%)	Es (%)	Mn (%)
Experimento II girinos	12.953,06	93,53	2,75	3,30	0,23	0,20
Experimento II imagos	12.474,30	83,24	7,50	7,75	1,03	0,47
Experimento III imagos	18.436,51	82,64	8,61	6,38	1,82	0,56

Lc T = Leucócitos totais; Lf = linfócitos; Nt = neutrófilos; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito