

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA**

**EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
PRÓPOLIS EM GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Rana
catesbeiana*)**

Luis Ricardo Romero Arauco
Biólogo

Jaboticabal - SP
Fevereiro - 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS EM
GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*)**

Doutorando: MsC. Luis Ricardo Romero Arauco

Orientadora: Profa. Dra. Marta Verardino De Stéfani

Co-orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Aqüicultura

Jaboticabal - SP
Fevereiro - 2006

F
R763e Romero Arauco Luis Ricardo
Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis em girinos de rã touro
(*Rana Catesbeiana*) / Luis Ricardo Romero Arauco. -- Jaboticabal,
2006
vi, 102 f. : il. ; 28 cm

h
a Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aqüicultura, 2006
Orientadora: Marta Verardino De Stéfani
Banca examinadora: Edanir dos Santos, João Batista
Kochenborger, Luiz Gustavo Braga, Lucia Helena Vasques
c Bibliografia
a
t 1. *Própolis-girino* 2. *Efeito* 3. *Desempenho*. I. Título. II.
a Jaboticabal - Centro de Aqüicultura
t
a CDU 639.94

ográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação -
UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

“Ninguém é bom ou excelente apenas sozinho: há sempre um referencial um suporte, uma estrutura, que incentiva e impulsiona para a realização.”

Guimarães Rosa

“A maior recompensa pelo trabalho não é o que a pessoa ganha, mas o que ela se torna através dele”.

John Ruskin

*Ao meu pai Valter Romero Franco e aos meus
irmãos pelas horas e anos de apoio e carinho.*

A minha mãe Hortência Arauco Osinaga †

Ofereço

*A Adriana, pelos momentos compartilhados,
amor e carinho;*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ser meu guia nesse caminho da minha vida!

Especialmente à Profa. Dra. Marta Verardino De Stéfani, pela orientação, dedicação e sobretudo pela amizade.

À Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pelas valiosas sugestões e co-orientações.

Aos professores, que fizeram parte da banca examinadora, Prof. Dr. Edanir dos Santos; Prof. Dr. João Batista Kochenborger, Prof. Dr. Luiz Gustavo Braga e Profa. Dra. Lúcia Helena Vasques, pelas sugestões oportunas e valiosas.

Ao Centro de Aqüicultura da UNESP e aos professores, pelos conhecimentos adquiridos durante minha formação profissional.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À empresa Apis Flora Industrial e Comercial LTDA-Ribeirão Preto, pelo fornecimento da própolis.

Ao senhor Orandir Mateus do Laboratório de Histologia, pela disponibilidade em sempre ajudar e pela amizade.

Em especial a Veralice e ao Marcio Reiche, pela colaboração, carinho e atenção dispensada.

Aos funcionários da CAUNESP, Ana, Fátima, Micheli, Silvia, Sueli e Valdecir pela amizade agradável.

Aos amigos Antonio, Camilo Alvarado, Camilo Prieto, Eduardo, Fabiana Garcia, Fabiana Pilarski, Jaime, Patrícia, Rodrigo e Verônica, pelo convívio, trocas e partilhas de experiências.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pagina
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
RESUMEN.....	x
RÉSUMÉ	xi
CAPÍTULO I	1
Considerações gerais	2
Parâmetros de desempenho de girinos de rã-touro	6
Características hematológicas	8
Características histológica do rim	12
Características histológica do fígado	14
Características histológica do intestino	17
Referências	18
CAPÍTULO II	32
Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho de girinos de rã-touro (<i>Rana catesbeiana</i>)	33
Resumo	34
Abstract	35
Introdução	36
Material e métodos	37
INSTALAÇÕES	37
E	
CONDIÇÕES	
EXPERIMENTAIS	

Material biológico.....	38
Procedência da própolis.....	38
Características do extrato hidroalcoólico de própolis.....	39
Preparo e fornecimento das dietas experimentais.....	39
Avaliação da qualidade da água.....	40
Avaliação dos parâmetros de desenvolvimento.....	41
Delineamento experimental.....	41
Resultados e discussão.....	42
Características hidrológicas.....	42
Parâmetro de desenvolvimento.....	43
Conclusão.....	50
Referências.....	50
CAPÍTULO III.....	54
Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (<i>Rana- catesbeiana</i>).....	55
Resumo.....	56
Abstract.....	57
Introdução.....	58
Material e métodos.....	59
INSTALAÇÕES E CONDIÇÕES	59
EXPERIMENTAIS.....	
Material biológico.....	60
Procedência da própolis.....	60
Características do extrato hidroalcoólico de própolis.....	60

Preparo e fornecimento das dietas experimentais.....	61
Avaliação da qualidade da água.....	62
Avaliação Hematológica.....	62
Coleta de sangue.....	62
Contagem diferencial de leucócitos.....	63
Delineamento experimental.....	63
Resultado e discussão.....	64
Característica hidrológica.....	64
Contagem diferencial de leucócitos.....	64
Conclusões.....	69
Referências.....	69
CAPÍTULO IV.....	74
Histologia do rim, fígado e intestino de girinos de rã-touro submetidos a dietas com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis.....	75
Resumo.....	76
Abstract.....	77
Introdução.....	78
Material e métodos.....	79
<i>INSTALAÇÕES</i> <i>E</i> <i>CONDIÇÕES</i>	79
<i>EXPERIMENTAIS</i>	
Material biológico.....	80
Procedência da própolis	80
Características do extrato hidroalcoólico de própolis.....	80

Preparo e fornecimento das dietas experimentais.....	81
Avaliação da qualidade da água.....	82
Análise histológica.....	82
Delineamento experimental.....	83
Resultado e discussão.....	83
Características hidrológicas.....	83
Rim.....	84
Fígado.....	86
Intestino.....	88
Conclusão.....	91
Referências.....	91
CAPÍTULO V.....	95
Conclusões gerais.....	96
Anexo.....	97

LISTA DE TABELAS

	Pagi na
Capítulo II	32
Tabela 1.- Composição porcentual da ração comercial (Poli peixe 450 F, em pó e peneirada em malha de 2mm).....	40
Tabela 2.- Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para ganho de peso (g), consumo de ração (g), conversão alimentar, sobrevivência (%) e comprimento (mm).....	44
Tabela 3.- Porcentagem de girinos de rã-touro nos diferentes estágios de desenvolvimento, de acordo com Gosner (1960), no final do período experimental (60 dias).....	49
Capítulo III	54
.....	
Tabela 1.- Composição porcentual da ração comercial (Poli peixe 450 F, em pó e peneirada em malha de 2mm).....	61
Tabela 2.- Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias dos diferentes tipos leucocitários encontrados no sangue periférico de girinos de rã-touro.....	66
Capítulo IV	74
Tabela 1.- Composição porcentual da ração comercial (Poli peixe 450 F, em pó e peneirada em malha de 2mm).....	81
Tabela 2.- Valores de (F), coeficiente de variação (CV) e médias da espessura do epitélio intestinal dos girinos de rã-touro nos tratamentos com extrato hidroalcolico de própolis.....	90

LISTA DE FIGURAS

	Pagi na
Capítulo II	32
Figura 1. Tanques experimentais utilizados no ensaio do desempenho de girinos de rã-touro.....	38
Figura 2. Medida do comprimento total dos girinos de rã-touro utilizados no ensaio do desempenho de girinos de rã-touro.....	41
Figura 3. Peso médio de girinos de rã-touro durante o período experimental submetidos a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis.....	45
Figura 4. Edema nos membros posteriores dos girinos de rã-touro de uma repetição nos tartamento 3 e 4, do experimento.....	47
Figura 5. Comprimento médio total dos girinos de rã-touro durante o período experimental submetidos a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis.....	48
Capítulo III	54
Figura 1. Processo de extração do sangue do vaso caudal de girino de rã-touro no fim do período experimental.....	62
Figura 2. Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de <i>R. catesbeiana</i> exposto ao extrato hidroalcoólico de própolis 0,5 %. L = Linfócito, N = Neutrófilo, B = Basófilo, Er = Eritrócito, Erj = Eritrócito Jovem E = Eusínófilo, M = Monócito, T = Trombócito, coloração Rosenfeld. Aumento 400x.....	65
Capítulo IV	74
Figura 1. Fotomicrografia do rim (pronefro) de girino de <i>Rana catesbeina</i> no estágio 42 de Gosner, exposto a concentrações de própolis, A = Animais controle, B = Animais tratados com 1,5 % de própolis. H.E. 400 x.....	85
Figura 2. Fotomicrografia do fígado de girino de <i>Rana catesbeina</i> no estágio 42 de Gosner, exposto a diferentes concentrações de própolis A = Animais controle, B = Animais tratados com 1,5 % de própolis. H.E. 400 x.....	87

Figura 3. Fotomicrografia do intestino de girino de *Rana catesbeina* no estágio 42 de Gosner, expostos a diferentes concentrações de própolis, A = Animais control, B = Animais tratados com 1,5 % de própolis. Corados com H.E. 400 x.....

RESUMO

Foi avaliado o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; e 1,5 %) misturado em ração comercial (45 % Proteína Bruta), em girinos de rã-touro. Foram utilizados 1400 girinos no estágio 26 da tabela de Gosner (1960), distribuídos em 20 tanques experimentais com 70 litros de água, na densidade de um girino por litro. O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia. Para análise dos dados do ganho de peso, comprimento, sobrevivência, conversão alimentar, consumo de ração e metamorfose, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. No final do experimento, foi colhido sangue do vaso caudal, de cinco girinos de cada repetição. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas pelo método de Rosenfeld (1947), em microscopia de luz. Foram contadas 100 células por lâmina. Para avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na porcentagem de leucócitos, usou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições. Para análise histológica no final do experimento foram sacrificados três girinos de cada repetição e retirada amostras do rim, fígado e intestino para lâminas histológicas. As amostras foram fixadas em formol, desidratadas em uma série de álcool, coradas com HE, analisadas e fotomicrografadas com fotomicroscópio AxioPhot-Zeiss em microscópio óptico e medido com micrometro ocular a espessura do epitélio intestinal. Para análise estatística dos dados foi usado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições. A sobrevivência, consumo de ração, conversão alimentar e comprimento dos girinos, não foram influenciados pelo extrato hidroalcoólico de própolis. O ganho de peso foi influenciado significativamente ($P < 0,05$) observando-se um pior desempenho nos girinos que não receberam extrato hidroalcoólico de própolis. A metamorfose foi mais acelerada quando os mesmos receberam própolis. O grupo leucocitário influenciado pela própolis foram os monócitos, que nas doses de 0,2 e 0,5 %, apresentaram as maiores porcentagens, diferindo ($P < 0,05$) do grupo controle e 1,5 %. O número de linfócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Não observou-se alterações histológicas no intestino, rins e fígado dos girinos. A espessura do epitélio do intestino dos girinos não foi alterada ($P > 0,05$) pelas diferentes concentrações de própolis.

Palavras chaves: rancultura, desempenho, leucócitos, rim, fígado, intestino.

ABSTRACT

The effect of the propolis hidroalcoholic extract was evaluated (0.0; 0.2; 0.5; 1.0; and 1.5 %) mixed to the commercial ration (45 % CP) in bullfrog tadpoles. 1,400 tadpoles were used at stage 26 (Gosner, 1960), distributed in twenty experimental tanks with 70 liters of water, in the density of one tadpole per liter. The feeding was four times a day. For analysis of the data of the weight gain, length, survival, feed conversion, ration consumption and metamorphosis were used a completely randomized design with five treatments and four repetitions. In the end of the experiment, it was picked the blood of the vasa flow, of five tadpoles of each repetition. The differential counting of leucocytes was accomplished in red-faced extensions by the method of Rosenfeld (1947), in light microscopia. To evaluate the effect of the propolis hidroalcoholic extract in the percentage of leucocytes, were used a completely randomized design with five treatments and three repetitions. They were counted 100 cells for sheet. For histological analysis in the end of the experiment three tadpoles of each repetition were sacrificed and samples of the kidney, liver and intestine were removed for you laminate histological. The samples were fastened in formol, dehydrated in one serializes of alcohol, red-faced with HE analyzed and fotomicrographed with fotomicroscópio Axioskop-Zeiss in optical and measured microscope with ocular micrometer the espessor of the intestinal epithelium. For statistical analysis of the data were used a completely randomized design with five treatments and three repetitions. The survival, ration consumption, feed conversion and length of the tadpoles, were not influenced by the propolis hidroalcoholic extract. The weight gain was influenced significantly ($P < 0,05$) being observed a worse in the tadpoles that didn't receive propolis hidroalcoholic extract. The metamorphosis was more accelerated when the same ones received propolis. The group leucocitary influenced by the propolis were the monocytes, that in the doses of 0.2 and 0.5 %, presented the largest percentage, differing ($P < 0,05$) of the controls group and 1.5 %. The number of lymphocytes, basophils, neutrophils, eosinophils didn't present statistical difference among the treatments. It was not observed histological alterations or lesion in the intestine, kidney and liver of the tadpoles. The thickness of the epithelium of the intestine of the tadpoles was not altered ($P > 0,05$) for the different propolis concentrations.

Key words: frogculture, propolis, development, leucocytes, kidney, liver, intestine.

RESUMEN

Fue evaluado el efecto del extracto hidroalcohólico de propóleo (0.0; 0.2; 0.5 y 1.5%) mezclado con alimento comercial (45 % PB) en renacuajos de rana toro. Fueron utilizados 1400 renacuajos en el estado 26 de la tabla de Gosner (1960), Distribuido en 20 tanques experimentales con 70 litros de agua, a una densidad de un renacuajo por litro. La alimentación fue realizada cuatro veces al día. Para el análisis de los datos de la ganancia de peso, tamaño, sobre vivencia, conversión alimenticia, consumo de alimento, y metamorfosis, fue usado un análisis estadístico completamente a la zar con cinco tratamiento y cuatro repeticiones. Al final del experimento, fue retirado sangre del vaso caudal, de cinco renacuajos de cada repetición. El conteo diferencial de leucocitos fue realizado en extensiones sanguíneas teñidas por el método de Rosenfeld (1947), en microscopia de luz, fueron contadas cien células por porta objeto. Para evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de propóleo en el porcentaje de leucocitos, fue utilizado un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones. Para el análisis histológico al final del experimento fueron sacrificados tres renacuajos de cada repetición y retirado una muestra del riñón, hígado e intestino para hacer laminas histológicas. Las muestras fueron fijadas en formol, deshidratadas en una serie de alcohol, teñidas con HE, analizadas y fotomicroografiadas con fotomicroscópio Axiophot-Zeiss en microscópio óptico y medido con micrómetro ocular el espesor del epitelio intestinal. Para análisis estadístico de los datos fue usado un diseño completamente a la zar con cinco tratamientos y tres repeticiones. La sobre vivencia, consumo de alimento, conversión alimenticia y tamaño de los renacuajos no fueron influenciados por el extracto hidroalcohólico de propóleo. El ganó de peso fue influenciado significativamente ($P < 0,05$) fue observado el menor desempeño en los renacuajos que no recibieron extracto de propóleo en sus dietas. La metamorfosis fue mas acelerada para los renacuajos que recibieron propóleo en sus dietas. El grupo leucocitario influenciado por el propóleo fueron los monocitos, que en las dosis de 0,2 y 0,5 %, presentando los mayores porcentajes, dando diferencia significativa ($P < 0,05$) con el grupo testigo y 1.5 %. El número de linfocitos, basófilos, neutrófilos y eosinófilos no presentaron diferencia estadística entre los tratamientos. No se observo alteraciones histológicas en el riñón, hígado e intestino de los renacuajos. El espesor del epitelio del intestino de los renacuajos no fue alterado ($P > 0.05$) por las diferentes concentraciones de propóleo.

Palabras claves: ranicultura, propóleo, desempeño, leucocitos, riñón, hígado, intestino.

RÉSUMÉ

L'effet de l'extrait de l'hydroalcoolique du propolis a été évalué (0.0; 0.2; 0.5; 1.0; et 1.5%) mélangé à la ration commerciale (45% PCF) dans les têtards de la grosse grenouille. 1,400 têtards ont été utilisés à étape 26 (Gosner, 1960), a distribué dans vingt réservoirs expérimentaux avec 70 litres d'eau, dans la densité d'un têtard par litre. Le feding était quatre fois par jour. Pour analyse des données du gain du poids, la longueur, survie, nourrit la conversion, consommation de la ration et métamorphose ont été utilisées un dessin complètement randomisé avec cinq traitements et quatre répétitions. Dans la fin de l'expérience, il a été choisi le sang du courant du vase, de cinq têtards de chaque répétition. Le compte différentiel de leucocytes a été accompli dans les extensions rougeaudes par la méthode de Rosenfeld (1947), dans microscopia léger. Évaluer l'effet de l'hydroalcoolique du propolis extraient dans le pourcentage de leucocytes des têtards à étape 42 de Gosner (1960) a été utilisé un dessin complètement randomisé avec cinq traitements et trois répétitions. Ils ont été comptés 100 cellules pour drap. Pour analyse histologique dans la fin de l'expérience trois têtards de chaque répétition ont été sacrifiés et goûtent du rein, le foie et intestin ont été enlevés pour vous laminez histologique. Les échantillons ont été attachés dans formol, a déshydraté dans on publie en feuilleton d'alcool, rougeaud avec IL

a analysé et fotomicrographed avec fotomicroscópio Axioskop-Zeiss dans microscope optique et mesuré avec micromètre oculaire l'espessor de l'épithélium intestinal. Pour analyse statistique des données a été utilisé un dessin complètement randomisé avec cinq traitements et trois répétitions. La survie, consommation de la ration, nourrit conversion et longueur des têtards, n'a pas été influencé par l'extrait de l'hydroalcoolic du propolis. Le gain du poids a été influencé considérablement ($P < 0,05$) être observé un pire dans les têtards qui n'ont pas reçu extrait de l'hydroalcoolic du propolis. La métamorphose a été accélérée plus quand les mêmes ont reçu propolis. Les leucocitary du groupe influencés par le propolis étaient les monocytes qui dans les doses de 0.2 et 0.5%, a présenté le plus grand pourcentage, en différant ($P < 0,05$) des contrôles groupez et 1.5%. Le nombre de lymphocytes, basophils, neutrophils, les eosinophils n'ont pas présenté différence statistique parmi les traitements. Il n'a pas été observé modifications histologiques ou lésion dans l'intestin, rein et foie des têtards. L'épaisseur de l'épithélium de l'intestin des têtards n'a pas été changée ($P > 0,05$) pour les concentrations du propolis différentes.

Mots de la clef: culture de la grenouille, grosse grenouille, propolis, développement, leucocytes, rein, foie, intestin.

CAPÍTULO I

Considerações gerais

Considerações gerais

A criação de girinos e imagos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) saudáveis é uma etapa fundamental para o bom andamento de qualquer ranário, obtendo animais bem desenvolvidos e com índices zootécnicos satisfatórios, favorecendo o retorno econômico em menor tempo. De acordo com RIBEIRO FILHO (1998) na maioria dos ranários comerciais observa-se a ocorrência de mortalidade de girinos relacionada com vários fatores, tais como: problemas de manejo, deficiência alimentar, instalações inadequadas, má qualidade da água e doenças provocadas por bactérias e fungos.

Para obter sucesso na criação de girinos de boa qualidade, é necessário conhecer a biologia do animal, principalmente no que tange a anatomia e fisiologia do aparelho digestório, para que possam formular rações compatíveis com suas necessidades, proporcionando maior aproveitamento dos alimentos oferecidos, já que um girino bem nutrido irá conseqüentemente originar imago mais saudável, que atinge a fase adulta em menor tempo (RIBEIRO FILHO, 1998).

De acordo com GOSNER (1960) o desenvolvimento embrionário dos girinos é caracterizado por 46 estágios de desenvolvimento: os estágios 1 a 17 são caracterizados por divisões contínuas, apresentando as formas de blástula, gástrula e néurula. Os estágios 18 a 21 envolvem o alongamento do corpo e desenvolvimento do broto da cauda, órgãos anexos e brânquias. Os estágios 22 a 25 envolvem a transição de um embrião relativamente imóvel sustentado pelo vitelo a uma alimentação livre-natatório, formação do opérculo e padrões de pigmentação. Os estágios 26 a 40 geralmente envolvem crescimento da larva e desenvolvimento dos membros, a metamorfose começa no estágio 41 e é completada no estágio 46.

Em relação ao diagnóstico de doenças LIMA e VALLES (1997) detectaram alta mortalidade de girinos (90 % do plantel) com uma semana de vida. Os sintomas foram modificações do comportamento, movimentos lentos, natação próxima à superfície, aparente apatia aos estímulos externos e alguns animais apresentavam a região abdominal ligeiramente avolumada e a pele translúcida, outros tinham o corpo e a cauda afilados. O agente causador foi identificado como *Escherichia coli* beta hemolítica e não hemolítica.

HIPOLITO et al. (1990) isolaram o fungo *Achlya sp.* de girinos de rã-touro e no local de fixação do fungo, a pele encontrava-se ulcerada e hemorrágica. A ocorrência desse agente patogênico foi devida a erros no manejo sanitário, qualidade da água e superpopulação.

A própolis é um produto natural composta por uma série de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, de consistência viscosa, cuja cor varia de amarelo-esverdeado a castanho-escuro ou avermelhado. A composição química da própolis é variável segundo a fonte vegetal visitada pelas abelhas: 45 a 55 % de resinas e bálsamos; 7,55 a 35 % de cera; 5 a 10 % de óleos voláteis; 5 % de pólen; 5 % de diversos materiais orgânicos e minerais (MARCUCCI, 1999; CUNHA et al., 2004; FARRÉ et al., 2004). É formada por mais de 200 compostos, entre os quais destacam-se os flavonoides (pinocebrina, galangin, ácidos: cafeico, ferulico, propolona, nemorosona e metil derivados, guttiferona, ácido cumárico, ácidos fenólicos); ácidos alifáticos; ácidos aromáticos; ésteres; di e triterpenos; pólen; açúcares e minerais (MARCUCCI, 1999; CUESTA-RUBIO et al., 2002; EL-ABD e HEGAZI, 2002; EL-KHATIB et al., 2002; ORSOLIC e BASIC, 2003; CUNHA et al., 2004; FARRÉ et al., 2004)

Investigando a composição química da própolis brasileira de regiões diferentes, MARCUCCI (1999) encontrou vários compostos novos: ácidos diterpênicos do tipo labdano, uma lignina, álcool triterpênico, alguns flavonóides e ácidos fenólicos. O último grupo de compostos é de interesse particular, especialmente um derivado do ácido cumárico, pois apresentou atividade antibacteriana e antitumoral significativa. Estes compostos estão presentes em muitas amostras de diferentes regiões no Brasil, e sua fonte é o exsudato das folhas de algumas espécies de *Baccharis* spp. (vassourinha ou alecrim-do-campo). De acordo com o autor, isto demonstra a importância dos ácidos fenólicos para a padronização e controle da qualidade da própolis.

A própolis tem-se demonstrado efetiva contra bactérias gram positivas, gram negativas e fungos, podendo também agir como promotor de crescimento aumentando o ganho de peso dos animais (SANCHEZ e GALARDI, 1989; FERNANDES Jr. et al., 1997). A adição de extrato de própolis em rações de girinos poderá ocasionar uma diminuição da mortalidade causada por bactérias, pelo seu efeito bactericida e imunoestimulante, e provavelmente agir também como promotor de crescimento, aumentando o ganho de peso.

A própolis por suas propriedades farmacológicas e sua utilização na área zootécnica pode substituir ou reduzir o uso de quimioterápicos, a maioria das vezes de uso humano, o que acaba encarecendo o produto final quando se trata de produtos de origem animal e, principalmente, oferecendo riscos à saúde do consumidor. É empregada amplamente na preparação de medicamentos em diversos países do mundo, não só na Europa e Ásia, onde tem uso terapêutico há muitos anos, mas também em alguns países da América do Sul, como Uruguai, Brasil e Argentina, e da América Central, como Cuba.

FERNANDES Jr. et al., (1997) verificaram o efeito bactericida para *Staphilococcus aureus* entre seis e nove horas de exposição à concentração de 2 % de extrato alcóolico de própolis e efeito bacteriostático com concentrações de 0,5 % e 1,5 % Porém, para *E. coli*, embora o efeito bactericida também fosse observado entre seis e nove horas de exposição, foram necessárias concentrações significativamente maiores (10 % e 15 %). SFORCIN (1996), testando a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis sobre linhagens de bactérias isoladas de processos infecciosos humanos, também constatou a inibição do crescimento de bactérias gram positivas em baixa concentração (4 %), enquanto as gram negativas foram menos susceptíveis a este apiterápico, sendo a concentração mínima inibitória de 4,5 a 8,0 %.

Entre as bactérias testadas com extrato de própolis para observação de seu efeito bactericida, estão algumas espécies dos gêneros: *Staphilococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Shiguella*, *Enterobacter*, além de *Branhaqmella catarrhalis*, *Srratia marcencens*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Prototheca zopfii*, *Rhodococcus equi*, *Geothrichum candidum*, *Klebsilla pneumoniae*, *Samlonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, entre outras (ROJAS, 1989; GRANGE e DAVEY, 1990; LANGONI et al., 1994; FERNANDEZ Jr. et al., 1995 e 1997; TOSI et al., 1996; NIEVA MORENO et al., 1999; KUJUMGIEV et al., 1999; ORSI et al., 2004, FERNANDES Jr. et al, 2005; ORSI et al., 2005). Grande parte dessas bactérias demonstrar resistência à maioria dos antibióticos tradicionais.

SOUZA et al. (1994), demonstraram que a própolis inibiu o crescimento de *Streptococcus agalactiae* impedindo a divisão celular, desorganizando o citoplasma, a membrana citoplasmática e a parede celular, causando lise bacteriana parcial e inibindo a síntese protéica. De acordo com os autores, ficou evidente que o mecanismo

da ação da própolis sobre células bacterianas é complexo e que não pode ser feita uma simples analogia ao modo de ação de alguns antibióticos clássicos.

SANCHEZ e GALARDI (1989) testaram a aplicação oral da emulsão aquosa (10%) em 60 leitões desmamados, e observaram que os animais tratados tiveram maior ganho de peso, consequência de uma ação estimulante da própolis sobre o apetite dos animais.

De acordo com HOLLANDS et al. (1991) a própolis tem baixa ordem de toxicidade oral aguda em camundongos, sendo observadas DL_{50} entre 2.000 a 7.300 mg/kg e de 8.000 a 40.000 mg/kg, para a própolis e para os flavonoides respectivamente.

Parâmetros de desempenho de girinos de rã-touro

Os girinos de rã-touro são animais pecilotérmicos, ou seja, o metabolismo varia de acordo com a temperatura do meio onde vivem (BRATTSTROM, 1979). Assim como outros organismos aquáticos e pecilotérmicos que são cultivados (peixes, camarões, moluscos), o produtor tem sérias dificuldades de alimentar os animais adequadamente (LIMA et al., 2003).

Entre os fatores que afetam o desenvolvimento de girinos está a densidade de estocagem, temperatura, qualidade de água, fotoperíodo, características físicas e químicas da água e teor protéico da dieta (SOARES et al., 1983; JUSTO et al., 1985; CARMONA-OSALDE et al., 1996; FIGUEREIDO et al., 1999; CASTRO e PINTO, 2000; ALBINATI, 2001; STÉFANI, 2001; SOARES et al., 2001, HAYASHI et al., 2004). Por outro lado, características inerentes à autoecologia de cada espécie, como

competição por espaço e alimento, hierarquia e produção de um fator inibidor de crescimento, são também indicadores como mecanismos que determinam o desenvolvimento de girinos de rãs do gênero *Rana* (MARTINEZ et al., 1996; BROWNE et al., 2002).

O desempenho dos girinos, numa criação intensiva depende também do tamanho da partícula da ração a ser fornecida (TEXEIRA, et al., 1985) e do seu procesamento (MAZZONI et al. 1992 e STÉFANI e MARCANTONIO, 1997).

A mortalidade de girinos e imagos pode constituir um ponto de estrangulamento na ranicultura (CASTRO e PINTO, 2000). Dessa forma, a determinação de instalações apropriadas e técnicas de manejo adequadas para esta fase é de fundamental importância para o desenvolvimento desta atividade (HAYASHI et al., 2004).

O desempenho dos girinos de rã-touro depende diretamente da oferta de alimentos balanceados em quantidade e qualidade adequada (ALBINATI, 2001).

AGOSTINHO et al. (1995), trabalhando com uma ração comercial, comparando-a sob a forma moída e lançada na superfície da água, com a forma umedecida e compactada manualmente, na forma de "bolotas", lançadas no fundo do tanque e à meia água, concluíram que os girinos que receberam a ração compactada, tanto no fundo, como à meia água, apresentaram melhor desempenho, já que o alimento agregado foi disponível por várias horas.

STÉFANI e MARCANTONIO (1997) avaliaram diferentes formas de apresentação da ração (peletizada, farelada e massa agregada) com uso de aglutinante (farinha de trigo e gelatina), observando o desempenho de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) e concluíram que na fase inicial (até a quarta semana do

período experimental) o melhor desempenho dos girinos ocorreu com a ração em massa agregada e, após esse período, com a ração peletizada.

MANDELLI JR et al. (1985) avaliaram granulometrias do farelo de trigo, na proporção de 13 % em relação ao peso de girino de rã-touro, encontrando maior ganho de peso para os girinos que receberam o alimento com granulação média de 0,21 mm, quando comparada com 0,48; 0,63 e 0,78 mm. SEIXAS FILHO et al. (1995) observaram que as rações com 0,5 mm proporcionam melhores desempenho dos girinos.

Estudos sobre o consumo de ração foram realizados por CULLEY et al (1977), que concluíram a necessidade de uma oferta diária de alimento equivalente a 12 a 13 % da biomassa dos animais alojados em determinados tanques. FONTANELLO et al. (1982) encontrou maior ganho de peso em girinos quando a oferta diária de ração correspondeu a 13 % do peso corporal. LIMA et al. (2003) apresentou uma tabela de alimentação para girinos de *Rana catesbeiana* que apresenta valores gradativos para se efectuar o arraçamento, quando a temperatura dos tanques apresentam intervalos de temperatura de 18 a 20 °C; 21 a 23 °C; 24 a 26 °C; e de 27 a 29° C.

Características hematológicas

O sangue dos vertebrados é um tecido líquido, móvel, onde está presente uma categoria de células livres do tecido conjuntivo e, que está em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos, constituindo uma das grandes forças homeostáticas do organismo (KALASHNIKOVA, 1976).

O plasma, líquido amarelado, semitransparente é formado por cerca de 90 % de água e 10 % de substâncias sólidas, entre as quais encontram-se proteínas, sais minerais, glicose, uréia, aminoácidos, colesterol, gorduras, gases respiratórios

(oxigênio e gás carbônico), hormônios, enzimas, anticorpos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os glóbulos vermelhos, também chamados hemácias ou eritrócitos na maioria dos vertebrados, formam-se e amadurecem na medula óssea pelo processo denominado eritropoiese. SCHMIDT-NIELSEN (1996) ressaltou que nos mamíferos os glóbulos vermelhos são anucleados, têm forma de discos esféricos e são ligeiramente bicôncavos; nas aves, répteis, anfíbios e peixes, são nucleados e se apresentam quase que universalmente ovais.

Os glóbulos brancos ou leucócitos são de dois tipos: os agranulócitos, sem granulações visíveis no citoplasma, que são produzidos nos nódulos 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 Romanowsky. A principal função dos glóbulos brancos é a defesa do organismo contra a ação de bactérias ou corpos estranhos que penetrem nos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O sangue dos anfíbios é composto por plasma contendo os eritrócitos e trombócitos (DUELLMAN e TRUEB, 1986). Em anfíbios na fase larval, os eritrócitos são elípticos, achatados e nucleados. Cada eritrócito mede aproximadamente 14 por 23 μm e ocorrem 400.000 ou mais deles por mm^3 de sangue (STORER e USINGER, 1979; DUELLMAN e TRUEB, 1986). Ainda, segundo MAPLES (1985) e TURNER (1988) os principais órgãos eritropoéticos nos girinos são o fígado e os rins. TURNER (1988) e KRAUTER (1993) descrevem a seqüência de amadurecimento dos eritrócitos como sendo: eritroide precursor ou rubrócito, eritroblasto, eritroblasto policromático, reticulócito, eritrócito normocromático.

Segundo DUELLMAN e TRUEB (1986) existem diferenças morfológicas entre os glóbulos vermelhos nas formas adultas e larvais de anuros. Singularmente, os eritrócitos dos girinos são maiores que os de rãs metamorfoseadas. Um dos fatores que contribui para esse processo é o fato dessas células em girinos possuírem maior quantidade de retículo endoplasmático.

Nestes animais, os glóbulos brancos ou leucócitos são também nucleados e de nomenclatura semelhante aquela dos mamíferos, e em média existem em número próximo a 7.000 por mm^3 (STORER e USINGER, 1979).

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

Segundo JAKOWSKA (1956), peixes e anfíbios podem muitas vezes apresentar várias células imaturas, como resultado de certos estímulos externos ou internos. Estas células imaturas irão desaparecer gradualmente, pela continuidade de seu processo de diferenciação nos vasos sanguíneos. Este processo de diferenciação não acontece no homem e em outros mamíferos. Desta forma, segundo esse autor no sangue de peixes e anfíbios observa-se grande quantidade de células imaturas, produz-se um falso estado leucêmico.

DIAS (1992) relatou a carência de informações sobre a composição celular do sangue dos anfíbios. NAOUM et al. (1986) e CANNON et al. (1987) enfatizaram esse fato e que este quadro se agrava quando se pesquisa os elementos celulares sanguíneo das formas pré-metamórficas de anuros.

Alguns estudos realizados com o sangue de anuros referem-se aos glóbulos vermelhos, quantidade de hemoglobina e proteínas do sangue. Assim, os critérios adotados pelos hematologistas para estabelecimento da nomenclatura dos elementos

figurados do sangue dos anfíbios larvais e adultos estão baseados em estudos comparativos, particularmente com peixes teleósteos (ELLIS, 1977 e SAUNDERS, 1996)

Os linfócitos de peixes possuem papel similar aos linfócitos de vertebrados, atuando como células imunocompetentes (ELLIS, 1977; HUSTON et al., 1996; RUIZ et al., 2003) e na defesa contra infecções por protozoários, helmintos (YAMAMOTO et al., 2001) e outros patógenos (RUIZ et al., 2003).

FIORANELLI et al. (2004) comprovaram a participação de linfócitos e macrófagos, em focos inflamatórios de girinos de rã-touro.

Os neutrófilos são granulócitos que possuem funções de fagocitose (GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1994; MORGULIS, 2002). Estudos em diversas espécies de peixes demonstraram a capacidade fagocítica dos neutrófilos sanguíneos ou teciduais ao englobar partículas antigênicas (MORROW e PULSFORD, 1980; SUZUKI, 1984; McARTHUR et al., 1984; ELLSAESSER et al., 1985; SUZUKI, 1986; DOGGET e HARRIS, 1987; THUVANDER et al., 1987; JORGENSEN et al., 1993) e bactérias (FINN e NIELSON, 1971; SUZUKI, 1984; MacARTHUR et al., 1984; BODAMMER, 1986; HINE et al., 1986; LEHMANN et al., 1987; LAMAS et al., 1994; Do VALE et al., 2002).

Os imunoestimuladores e os adjuvantes aumentam a mobilização enzimática e a atividade fagocítica de neutrófilos (SIWICKI et al., 1998). Os neutrófilos possuem grandes quantidades de peroxidase (ELLIS, 1977), uma enzima lisossômica presente em células fagocíticas e que promove a oxidação de certos compostos pelo peróxido de hidrogênio no processo de fagocitose (OLIVEIRA et al., 1997)

Nos mamíferos os basófilos são células derivadas da medula óssea e participam de processos alérgicos e resposta imunológica (BOCHNER e

SCHLEIMER, 2001). Embora exerçam função de fagocitose não o fazem com a mesma avidéz dos neutrófilos (LORENZI, 1999). Funcionalmente, no sangue periférico, comportam-se como os mastócitos dos tecidos, possuem receptores de alta afinidade para as porções da imunoglobulina E (IgE), grânulos ricos em histidina (BACH, 1989; ROITT et al., 1998), que é liberada na anafilaxia (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

A produção de eosinófilos em mamíferos ocorre na medula óssea sob estímulo da interleucina 5 (BROIDE e SRIRAMARAO, 2001) e podem exercer função fagocítica, mas não fazem com a mesma avidéz dos neutrófilos (LORENZI, 1999). Os eosinófilos estão presentes em maior número no trato gastro-intestinal que em outros tecidos (ROTHENBERG et al., 2001) e foi demonstrada sua participação nas doenças alérgicas e nas infecções parasitárias. Nos vertebrados, os eosinófilos são considerados como leucócitos sanguíneos com importante papel pró-inflamatório em várias desordens imunológicas (ROTHENBERG et al., 2001; BROIDE e SRIRAMARAO, 2001). Além disso, estudos recentes sugerem que no homem as funções dessas células não limitam-se a isso, visto que participam também na hematopoiése, produzindo e liberando o fator estimulador de colônias (HARTMAN, et al., 2001).

Nos mamíferos (LORENZI, 1999) e em peixes (DO VALE et al., 2002) os neutrófilos são células fagocíticas com importante papel na defesa contra infecções (THUVANDER et al., 1987; LEHMANN et al., 1987; DO VALE et al., 2002) e possuem um sistema de agentes microbicidas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Os trombócitos são células sanguíneas encontradas em aves, répteis, anfíbios e peixes, cuja função hemostática e de homeostasis são bem descritas (ROBERTS, 1981; PENHA et al., 1996; BALETTI et al., 1998).

Em peixes os trombócitos e leucócitos são as células sanguíneas de defesa orgânica, são predominantes nas extensões sanguíneas de espécies dulceaquícolas (CHONDAR, 1982). Ao microscópio de luz são células predominantemente elípticas, com núcleo fusiforme e hiperconcentrado. Outras vezes pode ser hialino ou levemente acidófilo, diferente do observado em linfócitos (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

HILL e ROWLEY (1996) sugerem que os trombócitos de peixes há semelhança das células hemostáticas ancestrais em deuterotômios invertebrados, como os tunicados (ascídias), equinodermos que possuem função fagocítica (agregatória), ajudando a manter os peixes livres de patógenos após dano vascular. A atividade fagocítica em trombócitos também foi descrita em anfíbios (DIAS e SINHORINI, 1991; PENHA et al., 1996).

Reação inflamatória inespecífica e resposta imunológica nas quais ocorrem à fagocitose são de extrema importância nos mecanismos de defesa do hospedeiro (LAMAS et al., 1994). Os monócitos do sangue periférico migram para o foco inflamatório e transformam-se em macrófagos (GRIFFIN, 1984). Atividade fagocítica dos monócitos no sangue e/ou tecido foi descrita em peixes cartilaginosos (MORROW e PULSFORD, 1980) e em teleósteos (FERGUSON, 1976; ELLIS, 1977).

Na aqüicultura há interesse especial em aumentar a resistência às doenças e incrementar a atividade fagocítica de células de defesa. O aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos é induzida pela liberação de patógenos mortos ou de seus produtos o qual foi descrito por ROITT et al. (1998) e pela aplicação de imunoestimuladores e adjuvantes (SIWICKI et al., 1998).

Características histológicas do rim

Em anfíbios os rins constituem o sistema excretor e mantêm o balanço ácido-base, eletrolítico e a coordenação dos fluídos dos íons da água movimentados dentro do sistema digestivo, brânquias, pele e bexiga urinária (VIERTEL e RICHTER, 1999). Segundo FERNANDEZ et al. (2002) o rim é um órgão linfo-hematopoético devido as suas funções fisiológicas e estruturais.

Nos girinos cada rim está formado por um complexo tubular encaracolado, um seio cardeal posterior grande, tecido intersticial hematopoético e glomérulos (VIERTEL e RICHTER, 1999).

A organização do nefron nos anfíbios apresenta as seguintes estruturas: corpúsculo renal, segmento do colo, túbulo contorcido proximal, segmento intermediário e túbulo contorcido distal. O segmento do colo possui células ciliadas e apresentam borda em escova (microvilos). Nas proximidades de cada túbulo, projeta-se um tufo de capilares dentro do celoma. Este tufo constitui o chamado glomérulo externo (ou glomérulo aberto) sendo coberto apenas pela esplacnopleura. Sua função é filtrar os resíduos do sangue para a cavidade celomática. Quanto à organização dos túbulos renais há uma tendência a desaparecimento dos nefrostomas ao mesmo tempo que se desenvolve outra estrutura mais especializada na filtração: o corpúsculo renal. Este se origina à custa de uma invaginação, em forma de cálice da porção medial do túbulo renal, que é invadida por uma rede capilar. Os capilares formam o glomérulo; a parede do túbulo onde ocorreu a invaginação constitui a cápsula de Bowman, e o conjunto o corpúsculo renal (GEORGE e CASTRO, 1998).

A cápsula de Bowman é formada por dois folhetos, um interno ou visceral e outro externo ou parietal. Entre esses dois folhetos ocorre um espaço denominado

capsular, que recebe o filtrado glomerular. O folheto parietal é abaulado e formado por um epitélio pavimentoso simples que se apóia na lâmina basal, sendo sustentado por uma fina camada de fibras reticulares. O folheto visceral mostra características bastante diferentes, sendo também formado por um epitélio simples que reveste internamente as alças capilares do glomérulo, tendo contorno bastante irregular e sua lâmina basal acopla-se à lâmina basal do endotélio dos capilares. As células do folheto visceral caracterizadas por apresentarem um corpo celular do qual saem numerosos prolongamentos ditos primários que se ramificam originando prolongamentos secundários. Essas células receberam a denominação de podócitos. Seus prolongamentos primários abraçam os capilares glomerulares enquanto os prolongamentos secundários dos vários podócitos interdigitam-se formando um sistema bastante elaborado de fendas intercelulares referidas como fendas de filtração (GEORGE e CASTRO, 1998).

Nos anfíbios o segmento intermediário fica entre o túbulo contorcido proximal e o túbulo contorcido distal e apresenta epitélio cúbico simples ciliado. Nesse segmento o filtrado perde sódio para o filtrado intercelular, fica hipotônico e chega ao túbulo contorcido distal. As células do túbulo contorcido proximal são cubóides ou colunares e apresentam borda em escova, realiza absorção de sódio e glicose por processo ativo e por difusão, absorve cloreto e água. Através da pinocitose engloba proteína (albumina) do filtrado, que são digeridas pelas enzimas lisossômicas. O túbulo contorcido distal é formado por células cubóides com estriação basal, este túbulo absorve sódio e água do filtrado e adiciona íons hidrogênio, potássio e amônia, sua atividade é muito importante para a manutenção do equilíbrio ácido-base do sangue. A absorção de água no túbulo é controlada pelo hormônio antidiurético (GEORGE e CASTRO, 1998).

Características histológicas do fígado

O fígado tem sido o principal órgão envolvido e correlacionado com o metabolismo protéico sendo que uma disfunção grave, decorrente de várias causas, e por dias seguidos, pode levar a um quadro irreversível (GUYTON e HALL, 2002).

O fígado nos peixes teleósteos se apresenta como um órgão-chave, o qual controla muitas funções vitais. O tecido hepático parece ter um proeminente papel fisiológico, participando de funções anabólicas (síntese de proteínas, lipídios, carboidratos), catabólicas (nitrogênio, glicogênio e detoxificação de xenóforos), e destaque para a vitelogenese (síntese de vitelogenina). Desta forma, este tecido deveria ser considerado um órgão alvo para estudos de muitos parâmetros ambientais e biológicos que podem alterar sua estrutura e metabolismo: toxinas, metais pesados, parasitos e microorganismos (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

As principais funções das células hepáticas não estão diretamente relacionadas com a digestão, mas com as transformações das substâncias nutritivas após a sua digestão e absorção pelo organismo. As células hepáticas atuam como “indústrias químicas” que atendem ao organismo como um todo, sendo capazes de produzir várias alterações nas substâncias nutritivas que recebem (ROMER e PARSONS, 1985).

O hepatócito sintetiza suas próprias proteínas e proteínas de exportação, como a albumina e o fibrinogênio, porém não acumula estas proteínas produzidas, eliminando-as gradualmente na corrente sanguínea. Os lipídios e glicídios são armazenados na célula hepática sob a forma de triglicéridos e glicogênio, respectivamente. O fígado serve também de depósito de algumas vitaminas, especialmente a vitamina A. Outra função hepática é a de detoxificação, onde muitas

substâncias tóxicas são neutralizadas e posteriormente exportadas na bile ou plasma (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Sua função secretora se dá pela bile, considerada secreção exócrina do fígado, produzida pela atividade contínua de todos os hepatócitos e de fundamental importância na participação da digestão dos lipídios no intestino delgado (AIRES, 1995).

A bile secretada pelas células hepáticas flui pelos canalículos biliares, ductos biliares. Estas estruturas se anastomosam, formando uma rica rede de ductos no fígado (ROMER e PARSONS, 1985; JUNQUEIRA e CARNEIRO; 2004).

Hepatócitos, células endoteliais, células de estocagem de lipídios, macrófagos, células sanguíneas circulantes, e células pancreáticas exócrinas ocorrem no fígado dos teleósteos constituindo unidades funcionais (BLOCH, 1973).

A mudança no fígado que acompanha a metamorfose envolve um panorama de eventos de diferenciação bioquímicas. Estes incluem síntese de DNA, síntese e acúmulo de uma quantidade estável de transcrição de RNA com uma enumeração associada de nucléolos, síntese de lipídio, elaboração de retículo endoplasmático rugoso, e mudança na estrutura e no número de mitocôndrias (McDIARMIDE e ALTIG, 1999).

Em anfíbios no estágio 23 da tabela de (GOSNER, 1960) a massa hepática, ainda não está totalmente definida, está recoberta pelo estômago, dela sai um ducto, que corresponde ao ducto colédoco, o qual se liga à primeira porção do intestino. A vesícula biliar é ainda muito pequena e o pâncreas não é visível. No estágio 28, o fígado já está dividido em lóbulos hepáticos, na face visceral do fígado. O ducto colédoco, que desemboca na primeira porção do intestino delgado, mostra-se com maior diâmetro e calibre que o estágio anterior. No estágio 29 a anatomia fica

inalterada (VIERTEL e RICHTER, 1999). No estágio 40 a vesícula biliar está bem desenvolvida, o ducto colédoco é de fácil visualização, o pâncreas já está formado, sendo que o mesmo recobre a porção inicial do intestino delgado (duodeno). Todas as estruturas anatômicas deste estágio são similares às dos adultos (RIBEIRO-FILHO, 1997).

ROBBINS et al. (1984), caracterizam a *necroses caseosa* como fígado flácido, desarranjo dos hepatócitos, inclusões vacuolares citoplasmáticas e núcleo picnótico. HIBIYA, (1992) caracteriza a degeneração lipídica no fígado, como excessivo acúmulo de lipídios no citoplasma, acompanhada de atrofia nuclear e intensa vacuolização citoplasmática.

Características histológicas do intestino

Em anfíbios a apoptose é uma alteração celular natural que acontece durante a metamorfose nas células da cauda e do intestino (ISHIZUYA-OKA, 1996) dos girinos de rã-touro (DUELLMAN e TRUEB, 1986).

A regressão do intestino em anuras acontece durante o clímax da premetamorfose, e se caracteriza pela diminuição do intestino e a perda de epitélio primário. Esta perda parece ser iniciada pela mobilização de lisossomas e liberação de hidrolases no citoplasma das células epiteliais. A atividade da fosfatase alcalina, que é correlacionada com o epitélio funcional da larva, diminui durante a regressão do intestino (DUELLMAN e TRUEB, 1986).

O epitélio intestinal de girinos de rã-touro é colunar simples e consiste em dois tipos celulares: as células absorptivas e as células caliciformes. As primeiras

apresentam bordas apicais estriadas, correspondentes aos microvilos observados em microscópio eletrônico, os quais funcionam aumentando a superfície de absorção (GEORGE e CASTRO, 1998).

CARMONA-OSALDE et al. (1997), realizando estudos biométricos e nutricionais com girinos de rã-touro, concluíram que durante o clímax da metamorfose (aparecimento dos membros anteriores) ocorre redução acentuada no comprimento relativo do tubo digestório indicando mudanças de hábito alimentar de herbívoro para carnívoro.

Durante a metamorfose o epitélio primário do intestino dos girinos é substituído por novo epitélio secundário. Essas mudanças são atribuídas a fatores espontâneos que acontecem no intestino durante essa fase (HOURDRY, 1996).

Um corte transversal do intestino de anfíbio revela, em geral, as mesmas camadas características do trato alimentar: a mucosa com epitélio colunar simples e lâmina própria conjuntiva rica em células. A muscular da mucosa está presente, e em alguns anfíbios, consiste apenas de células musculares esparsas. A submucosa consiste de tecido conjuntivo e linfóide, e vasos sanguíneos. Mais externamente observa-se a túnica muscular constituída por espessa camada de fibras dispostas circularmente e fina camada de fibras dispostas longitudinalmente. Finalmente, existe uma fina membrana serosa do peritônio. A mucosa e a submucosa elevam-se formando dobras longitudinais, como nas valvas espirais dos tubarões, ou nas válvulas coniventes dos mamíferos. Entretanto, na mucosa não existe nenhuma dobra que possa ser comparada aos vilos intestinais dos vertebrados superiores (GEORGE e CASTRO, 1998).

Referências

AGOSTINHO, C. A.; LIMA, S. L.; FIGUEREDO, M. R. C. Desempenho de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) com ração em pó e umedecida. In: **TECHNOFROG 95, 1; ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 8, 1995. Viçosa, MG. Anais...Viçosa, MG: Associação Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, 1995. v. I. p. 3.**

AIRES, M. M. Fisiologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995.

AIBINATI, R. C. B. Nutrição de girinos In: **ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, XI, ENAER, XI. 2001, São Paulo. Resumos...São Paulo: ENAER, 2001. p. 64-71.**

BACH, J. F. Imunologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1989. p.

BALETTI, M. E.; SILVA, M.; SANTOS, A. L. Q.; MANNA, F. D. SOARES, J. M.; FERREIRA, C. A. Q. Ultrastructural study of trombocytes of *Arapaima gigas*. Biosci. J., Canoas – RS., v .14, n. 1, p. 3-10, 1998.

BLOCH, E. H. The structure and operational characteristics of the community of cells that characterize that organ: The functional units of organs: Regulation and control in physiological systems. New York: Iberall A.S. and Guyton A.C. Pittsburgh: Instrument Society of America, 1973, p. 199-221.

BOCHNER, B. S.; SCHLEIMER, R. P. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct overlapping pathways for recruitment. Immunol. Re., Copenhagen, v. 179, p. 5-15, 2001.

BODAMMER, J. E. Ultrastructural observations on peritoneal exudates cells from the striped bass. Vet. Immunol. Immunopathol., Amsterdam, v. 12, p. 127-140, 1986.

BRATTSTROM, B. H. Amphibian temperature regulation studies the field and laboratory. America Zoological, v. 19 (único), p. 345-356, 1979.

BROIDE, D.; SRIRAMARAO, P. Eosinophil trafficking to site of allergic inflammation. Immunol. Re. Copenhagen, v. 179, n. 1. p. 163-172, 2001.

BROWNE, R. K.; POMERING, M.; HAMER, A. J. High density effects on the growth, development and survival of *Litoria aurea* tadpoles. Aquaculture, v. 215, p. 109-121, 2003.

BRUSLÉ, J.; ANADON, G. G. The structure and function of fish liver. In: Fish morphology. USA: Science Publishers, 1996. 300p.

CANNON, M. S.; SAMPSOM, H. W. e KAPES, E. D. The blood leukocytes of *Bufo marinus*: a light, phase contrast and histochemical study. Can. J. Zool., Ottawa, v. 65, n. 2, p. 1445-1453, 1987.

CARMONA-OSALDE, C.; OLERA-NOVA; M. A.; FLORES-NAVA, A.; ONTIVEROS-ESCUA, V. M. La nutrición de la rana y su importancia en la ranicultura em 1997 In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 9 INTERNACIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY, 2, 1997, Santos. Encontro... Santos: ABETRA-ABCR, 1997. p 75-84.

CASTRO, J. C.; PINTO, A. T. Qualidade de água em tanques de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802, cultivadas em diferentes densidades de estocagem. R. Bras. Zootc., Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1903-1911, 2000.

CHONDAR, S. L. The haematology of *Gudusia chapra* (Pisces: clupeidae). J. Inland Fish. Soc., India, v. 14, n. 1, p. 1-10, 1982.

CUESTA-RUBIO, O.; FONTANA-URIBE, B. A.; RAMIREZ-APAN, T.; CARDENAS, J. Polyisoprenylated benzophenones in cuban própolis biological activity of nemorosone. Z. Naturforsch., Juebingen. v. 57, p. 372-378, 2002.

CUETO, D. J. Experiência clínica de los medicamentos elaborados com propoleo. In: SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1., 1989, Varadero. Matanzas. Cuba: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, 1989. p. 259-262.

CULLEY Jr, D. D. Have we turnet the corner on bullfrog culture. Aquacult. Maga. Stuttgart, USA., v. 7, n. 3, p. 20-24, 1981.

CULLEY, D.; MEYERS, S. S. P.; DOUCETTE, A. J. A high density rearing system for larval anurans. Laboratory animal. v. 6, p. 34-41, 1977.

CUNHA, B. S.; SAWAYA, A. C.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, T. M. MARCUCCI, C. M.; DREZZA, F. T.; POVIA, G. S.; CARVALHO, O. P. Factors that influence the yield and composition of brasilian própolis extracts. J. Braz. Chem. Soc., São Paulo, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004.

DIAS, J. L. C. Influência da temperatura ambiental sobre a resposta celular inflamatória e as evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). 1992. 117 f. Tese (Doutorado) em Patologia Experimental e Comparada – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,

Universidade de São Paulo. São Paulo, 1992.

DIAS, J. L. SINHORINI, I. L. Qualitative evaluation o the inflammatory response modulathed by temperature in tadpoles of *Rana catesbeiana*. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 304 -306, 1991.

DO VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M. T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. Fish Shellfish Immunol., USA, v. 13, n. 3, p. 1-16, 2002.

DOGGET, T. A.; HARRIS, J. E. Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*. J. Fish Biol., London, v. 33, p. 747-756, 1987.

DUELLMAN, W.; TRUEB, L. Biology of amphibians. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1986, 613 p.

EL-ABD, A. F. K.; HEGAZI, G. A. egyptian própolis: chemical composition antiviral and antimicrobial activities of east delta própolis. Z. Naturforsch., Juebingen., v. 57, p. 386-394, 2002.

EL-KHATIB, A. S.; AGHA, M. A.; MAHRAM, G. L.; E KHAYYAL, T. M. Prophylactic Effect of Aqueous Propolis Extrat against Acute Experimental Hepatotoxicity in vivo. Z. Naturforsch, Juebingen, v. 57, n. 1, p.379-385. 2002.

ELLIS, A. E. The leukocytes of fish: review. J. Fish Biol., London, v. 11, p. 453-491, 1977.

ELLSAESSER, C. F.; MILLER, N. W.; CUCHENS, M. A.; LOBB, C. J.; CLEM, W. Analysis of channel catfish peripheral blood leucocytes by brignt-field microscopy and cytometry. Trans. Am. Fish. Sc., Bethesda, v. 114, p. 279-285, 1985.

FARRÉ, R.; FRASQUET, I.; SANCHEZ, A. El Própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, Valencia, v. 45, n. 1, p. 21-43, 2004.

FERGUSON, H. W. The ultrastructure of plaice leucocytes. *J. Fish Biol.*, London, v. 8, p. 139-142, 1976.

FERNANDES Jr, A.; BALESTRIN, E. C.; BERTONI, J. E. C.; ORSI, O. R.; CUNHA, S. L. M.; MONTELLI C. A. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n. 5, p. 563-566, 2005.

FERNANDES, Jr. R. A.; LOPES, C. A. M.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Venom. Anim. Toxins*, Botucatu. v. 3, n. 2, p. 287-294, 1997.

FERNANDES, Jr., R. A.; SUGIZAKI, M. F.; FOGO, M.; FUNARI, S. R. C.; LOPES, C. A. M. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venomo. Anim. Toxins*, Botucatu, v. 1, p. 63-69, 1995.

FERNÁNDEZ, B. A.; DE-BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los peces teleósteos (I) células y organos. *Rev. AquaTIC*. Zaragoza, n. 16, p. 1-15, 2002.

FIGUEIREDO, M. R. C.; AGOSTINHO, C. A.; BAÊTA, F. C. et al. Efeito da temperatura sobre o desempenho da rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). *R. Bras. Zootc.*, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 661-667, 1999.

FINN, J. P.; NIELSON, N. O. The inflammatory response of rainbow trout. *J. Fish.*, Biol., London, v. 3, p. 463-478, 1971.

FIORANELLI, S.; COPPO A.; NORMA. B.; COOPO, J. A. Los glóbulos blanco de *Rana catesbeiana* (Anfibia: Ranidae) Variación según sexo, edad, peso, crianza,

alimentación y época del año. Universidad Nacional del Nordeste, corrientes Argentina, Disponível em: ([Htt://www1.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.br/](http://www1.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.br/)). Acesso em: 16 de maio 2004.

FONTANELLO, D.; SOARES, A. H.; MANDELLI J. R. Desenvolvimento ponderal de girinos de *Rana catesbeiana*, SHAW, 1802 (rã-touro) criadas com ração de diferentes níveis protéicos. Bol. Inst. Pesca, São Paulo. v. 9, (único), p. 125-129, 1982.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. Manual de hematologia veterinária. São Paulo: Livraria Varela. 1994. 169 p.

GEORGE, L. L.; CASTRO R. R. Histologia comparada. 2. ed. São Paulo: Editora Roca Ltd., 1998, 286p.

GOSNER, K. L. A simplified table, for staging anura embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, Jonson City, v.16, n. 2, p.183-190, 1960.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee gluc). J. R. Socie. Medicine., Boston, v. 83, n. 3, p. 159-160, 1990.

GRIFFIN, B. R. Randon and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leucocytes: activathion by antiboidy, complement, and serum components. Dev. Com. Immunol, Torrytown, v. 8, p. 589-597, 1984.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 972p.

HARTMAN, M. L.; PILIPONSKI, A. M. TEMKIN, V.; LEVI-SCHAFFER, F. Human peripheral bood eusinophils express stem cell factor. Blood, Philadelphia, v. 97, n. 4, p. 1086-1091, 2001.

HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; GALDIOLE, E. M. Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanque-rede. **R. Bras. Zootc.** Viçosa, v. 33, n. 1, p. 14-20, 2004.

HIBIYA, T. An Atlas of Fish Histology: normal and pathological features. **Tokyo: Kodansha, 1982.**

HILL, D. J.; ROWLEY, A. F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **BR. J. Haematol, Oxford, v. 92, p. 200-211, 1996.**

HINE, P. M.; WAIN, J. M.; BOUSTEAD, N. C.; DUNLOP, D. M. Light and electron microscopic studies on the enzyme cytochemistry of leucocytes of eels, *Anguilla* species. **J. Fish Biol., London, v. 29, p. 721-735, 1986.**

HIPOLITO, M.; LEME, M. C. M. e MELLOZZI, M. A.B. Micotoxicose por aflatoxina B₁ em , rãs-touro, (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). Presença de lesões anátomo-histológicas. In: **ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 1., 1990, São Paulo. Resumos... p. 212.**

HOLLANDS, I.; MANDADO, S.; DOMINGES, C. Demostración ultraestructural del efecto citohepatoprotector del propoleo. **Rev. cubana de Cienc. Vet, Habana, v. 22, p. 85-90, 1991.**

HOURLY, J. Changes in The digestive Tract and Feeding behaviour of Anuran Amphibians during metamorphosis. **Physiol. Zool. Chicago, v. 69, n. 2, p. 219-251, 1996.**

HUSTON, A. H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. The nature of haematological response in fish . Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to simulated winter, spring and summer conditions. **Fish physiol. Biochem., Amsterdam. v. 15, n. 4, p. 339-347, 1996.**

ISHIZUYA-OKA, A. Apoptosis of larval cells during amphibian metamorphosis. Micros. Resear. Techni. Mibu, v. 34, p. 228-235, 1996.

JAKOWSKA, S. Morphologie et nomenclature des cellules du sang des téléostéens. Rev. D'Hématol., França, v. 11, p. 519-539, 1956.

JORGENSEN, J. B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Pheritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar*, L. J. Fish Dis., New York, v. 16, n. p. 313-325, 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 433p.

JUSTO, C. L.; PENTEADO, L. A.; FONTANELLO, D. Ganho de peso de girinos de (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em criação intensiva, sob diferentes densidades populacionais. Bol. Inst. Pesca., São Paulo, v. 12, n. 3, p. 31-37, 1985.

KALASHNIKOVA, E. T. On the classification of morphological elements in the blood of fish. J. Ichthyol., Bethesda, v. 3, n. 16, p. 459-572, 1976.

KRAUTER, P. W. Micronucleus incidence and hematological effects in bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) exposed to 2-Acetylaminofluorene and 2-Aminofluorene. Arch. Environ. Toxicol., New York, v. 24, p. 487-493, 1993.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol., Limerick, v. 64, p. 235 - 240, 1999.

LAMAS, J.; SANTOS, Y., BRUNO, D. W.; TORANZO, A.; ANADÓN, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). J. Fish Biol., London, v. 45. n. 5, p. 839-854, 1994.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; FUNARI, S. R. C.; CHANDE, C. G.; NEVES, I. R.; LISTONI, F. J. P. Efeito antimicrobiano in vitro da própolis. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE APICULTURA, 4, 1994, Cordoba. Anais... p. 189-92.

LEHMANN, J.; STURENBERG, F. J.; MOCK, D. The changes of the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to an artificial and natural infection with yersinia ruckeri. J. Appl. Ichthyol., Berlin, v. 3, n. 4, p. 174-183, 1987.

LIMA, S. L. CASALI, A. P. AGOSTINHO C. A. Desempenho zootécnico e tabela de alimentação de girinos de ra-touro (*Rana catesbeiana*) criados no sistema anfigranja. R. Bras. Zootc., Viçosa, v. 32, n. 3, p. 512-518, 2003.

LIMA, S. L.; VALLES, G. A. Ocorrência de mortandade de girinos de mortandade de girinos de rã-touro, *Rana-catesbeiana* Shaw, 1802. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 9, TECHNOFROG, 2. 1997, Santos. Resumos...Santos: ABETRA,ABCR, 1997. p. 216.

LORENZI, T. F. Manual de hematologia propedêutica e clínica. São Paulo: MDSI. 1999. 641p.

MANDELLI J.; JUSTO, C. L.; PENTEADO, L. A. Influência do tamanho da partícula alimentar sobre o ganho de peso dos girinos de *Rana catesbeiana* SHAW, 1992, criados intensivamente. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 61-66, 1985.

MAPLES, P. B. In vivo regulation of hemoglobin phenotypes during the development of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. /1985. 198f, Dissert. (Ph.D.), - Oklahoma University. [Abstract]

MARCUCCI, M. C. Composição química e atividade biológica. Revista da Universidade de Franca, Franca, v. 7. p. 17, 1999.

MARTINEZ, I. P.; ÁLVARES, R.; HERRAÉZ, M. P. Growth and metamorphosis of *Rana pirezii* larvae in culture: effects of larval density. *Aquaculture*, v. 142, n. 1, p. 163-170, 1996.

MAZZONI, R., CARNEVIA, D., ROSSO, A. SALVO, M.A., ANTONELI, A. Influencia de la presentacion del alimento (polvo, pasta o pelet). Em la produccion de renacuajos de rana toro (*Rana catesbeiana*, SHAW, 1802). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 2, 1992, Rio de Janeiro, RJ. Anais e Coletânea... Rio de Janeiro, RJ: ARERJ, 1992. p 200-205.

McARTHUR, J. I. FLETCHER, T. C.; PIRIE, B. J. S.; DAVIDSON, R. J. L. THOMSON, A. W. Peritoneal inflammatory cell in plaice, *Pleuronectes platessa* L.; effects of stress and endotoxin. *J. Fish Biol.*, London, v. 25, p. 69-81, 1984.

McDIARMIDE, R. W.; ALTIG, R. Tadpoles the biology of anuran larvae. Chicago: University of Chicago, 1999, 444p

MORGULIS, M. S. *Imunologia aplicada*. In: MACARI, M., FURLAN, R. L.; GONZALES, E.. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, 375p.

MORROW, W. J. W.; PULSFORD, A. Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy. *J. Fish Biol.*, London, v. 17, p. 461-475, 1980.

NAOUM, P. C.; NAGEL, A. A.; SILVA, F. S. Contribuição para a determinação dos valores hematológicos em *Bufo paracnemis* (Amphibia-Anura). *Cienc. Cult.*, São Paulo, v. 38, p. 883-892, 1986.

NIEVA MORENO, M. I.; ISLA, M. I.; CUDMANI, N. G.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Screening of antibacterial activity of Aimacha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol., Limerik*, v. 68, p. 102, 1999.

OLIVEIRA, L. W.; MOURA W. L.; MATUSHIMA, E. R.; EGAMI, M. I. Detecção citoquímica da mieloperoxidase em eusínófilos e mononucleares azurófilos do sangue de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) Reptilia, Crocodilia). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49, 1997, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: SBPC, 1997. p. 878.

ORSI R. O.; SFORCIN, J. M.; RALL, V. L. M.; FUNARI, S. R. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES Jr, A. Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of própolis produced in two regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins. Botucatu*, v. 11, n. 2, p. 109-116, 2004.

ORSI, O. R.; SFORCIN, M. J.; FUNARI R. C. S.; BANCOVA, V. Effect of brazilian and bulgarian própolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. *Internat. Immunopharmac., USA*, v. 5, n. 2. p. 359-368, 2005.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Ethnopharmacology, USA.*, v. 84, n. 2, p. 265-273. 2003.

PENHA, M. L.; DIAS, J. L. C.; MALUCELLI, B. E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) trombocytes. *J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo*, v. 33, n. 1, p. 15-18, 1996.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunas de Cananéia-SP. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, v. 22, n. 1, p. 23-40, 1995.

RIBEIRO-FILHO, O. P. Reprodução Induzida de Rã- Touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) com uso de Extracto Bruto Hipofisario R. Bras. Zootc., Viçosa, v. 27, n. 4, p.658-663, 1997.

RIBEIRO-FILHO, O. P. Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) com uso de extracto bruto hipofisário, R. Bras. Zootc., Viçosa, v. 27, n. 4, p. 658-663, 1998.

ROBBINS, S. L. et al. Patology basis of disease. 3th ed. Philadelphia: Saunders, 1984. 1425 p.

ROBERTS, R. J. Patologia de los peces. Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366p.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Immunology. 5th ed. London: Mosby, 1998. 423p.

ROJAS, N. M. Experiencias clínicas de los medicamentos elaborados com propoleo cubano (mesa redonda). In: SIMPOSIO SOBRE EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1., 1988. Varadero. Matanzas Memorias... Cuba: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, 1989. p. 42 - 59.

ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. Anatomia comparada dos vertebrados. São Paulo: Editora Ateneu, 1985. 559p.

ROTHENBERG, M. E.; MISHRA, A.; BRAND, E. B.; HOGAN, S. P. Gastrointestinal eosinophils. Immunol. Rev., USA., v.179, p. 139-155, 2001.

RUIZ, I., FERNÁNDEZ, A. B.; BLAS, I. El sistema immune de los telósteos (III): respuesta immune especifica. Rev. AquaTIC, España, v. 18, p. 33-38, 2003.

SANCHEZ, M.; GALARDI, R. Influencia del propoleo en la convercion de lechones destetados. In: SIMOPOSIO SOBRE EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD

HUMANA Y ANIMAL, 1., 1988, Varadero, Matanzas. Memorias...Cuba: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, 1989. p. 211-214.

SAUNDERS, D. C. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. Trans. Am. Microsc. Soc., Lawrence, v. 8593, p. 427-449, 1996.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente. 5. ed. São Paulo: Livraria Santos, 1996. 600p.

SEIXAS FILHO, J. T.; MELLO, S. C.; BARBARINO JUNIOR, P.; FRANQUIRA, J. M.; MIRANDA, R. G. B.; SANTOS, C. A. N. Efeito da granulometria da ração no desempenho de girinos de *Rana catesbeiana* SHW (1802) usando ganho de peso como parâmetro zootécnico. In: **TECHNOFROG 95, 1; ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 8, 1995. Viçosa, MG. Anais...Viçosa, MG: Associação Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, 1995. v. 1. p. 5.**

SFORCIN, J. M. Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladoras e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico dos ratos. 1996. 56f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

SIWICKI, A. K.; MORAND, M.; KLEIN, P.; STUDNICKA, M. TERECHMAJEWSKA, E. Modulation of non-specific defence mechanisms and protection against diseases in fish. Acta Vet., South Africa, v. 67, p. 328, 1998.

SOARES. A. E. FONTANELLO, D.; REIS, J. M. Efeito da densidade de população no ganho de peso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v. 10, p. 47-51, 1983.

SOARES, C. M.; HAYASHI, C.; GALDIOLI, E. M. et al. Utilização de diferentes níveis protéicos em rações para girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 12., 2001, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: AEP-SUL e FAEP-BR, 2001. (CD-ROM).

SOUZA, C. W. O.; SOSA J. R. F. L.; ALBINATI, F. L.; MAGALHÃES, H.; REIS, J. H.; TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of propolis provenance. *Planta-Medica*, New York, v. 60, p. 222-227, 1994.

STÉFANI, M. Manejo da alimentação no ranário. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, XI, ENAER, XI. 2001, São Paulo. Resumos... São Paulo: ENAER, 2001. p. 81-84.

STÉFANI, M.; MARCANTONIO, A. Efeito do processamento da ração e uso de aglutinantes no desempenho de girinos de *Rana catesbeiana* SHAW, 1992, criados intensivamente. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 24, (especial), p. 205-212, 1997.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. *Zoologia Geral*. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1979. 757p.

SUZUKI, K. A light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rockfish and trout. *Bull. Soc. Scient. Fish., Minato-Ru*, v. 50, n. 81, p. 315, 1984.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudates cell in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, London, v. 29, n. 3, p. 349-364, 1986.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Hematologia de peixes teleósteos, Ribeirão Preto SP: Villimpress Complexo Gráfico, 2004. 144 p.

TEXEIRA, J.; MELLO, S. C.; VEIGA R. et al. Efeito da granulometria da ração sobre o desempenho de girinos de *Rana catesbeiana*. R. Bras. Zootc. Viçosa, v. 27, n. 2, p. 224-230, 1998.

THUVANDER, A.; NORRGREN, L.; FOSSUM, C. Phagocytic the blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by cytometry and electron microscopy. J. Fish Biol., London, v. 31, n. 2, p. 197-208, 1987.

TOSI, B.; DONINI, A.; ROMANGNOLI, C.; BRUNI, A. Antimicrobial of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. Rv. Phytother. Oklahoma., v. 10, p. 335-346, 1996.

TURNER, R. J. Amphibians. In: ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N.N.A. Vertebrate blood cells. New York: Cambridge University Press, 1988. p.129–209.

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy Viscera and Endocrines In: Tadpoles the biology of anuran larvae. In: McDIARMID, R. W.; ALTING, R. Tadpoles the biology of anuran larvae. Chicago: University of Chicago, 1999, cap. 5. 1999. p.92- 138.

YAMAMOTO, K.; MUKAMOTO, M.; WATARAI, S.; KODAMA, H.; NAKAYASU, C.; OKAMOTO, N. Indiction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cell in carp (*Cyprinus carpio*). Am. J. Vet. Res., Osaka, v. 62, p. 599-603, 2001.

CAPÍTULO II

**Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho de
girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)**

Normas da Revista Acta Scientiarum

Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

Effect of the propolis hidroalcoholic extract in development of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*)

Luis Ricardo Romero Arauco¹, Marta Verardino De Stéfani², Laura Satiko Okada Nakaghi³

¹Centro de Aqüicultura da UNESP-CAUNESP. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14844-900.

²CAUNESP, Departamento de Zootecnia, FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

³CAUNESP, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

Título resumido: Efeito da própolis em girinos de rã-touro.

Autor para correspondência: Marta Verardino De Stéfani, Centro de Aqüicultura da Unesp. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n – Jaboticabal – SP – Brasil – Cep 14844 -900. E-mail: martavs@fcav.unesp.br

Resumo

Foi avaliado o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho de girinos de rã-touro. Foram utilizados 1400 girinos no estágio 26 da tabela de Gosner (1960), distribuídos em vinte tanques experimentais com 70 litros de água, na densidade de um girino por litro. As diferentes concentrações de própolis (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; e 1,5 %) foram misturadas à ração (45 % Proteína Bruta). O arraçamento foi realizado quatro vezes ao dia. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Avaliou-se o ganho de peso, consumo de ração, comprimento, sobrevivência, conversão alimentar e metamorfose. A sobrevivência, consumo de ração, conversão alimentar e comprimento dos girinos, não foram influenciados pelo extrato hidroalcoólico de própolis. O ganho de peso foi influenciado ($P < 0,05$) observando-se menor ganho de peso (5,19 g) nos girinos que não receberam extrato hidroalcoólico de própolis. A metamorfose foi mais acelerada quando os mesmos receberam própolis.

Palavras chaves: **peso, comprimento, sobrevivência, metamorfose, ranicultura.**

Abstract

The effect of the propolis hidroalcoholic extract was evaluated in the development of bullfrog tadpoles. 1,400 tadpoles were used at stage 26 Gosner (1960), distributed in twenty experimental tanks with 70 liters of water, in the density of one tadpole per liter. The different levels of propolis (0.0; 0.2; 0.5; 1.0; and 1.5 %) were mixed with ration (45 % CP). The feeding was four times a day. The weight gain ration, consumption, length, survival, feed conversion and metamorphosis were appaised using a completely randomized design with five treatments and four repetitions. The survival, consumption, feed conversion were and length not influenced by the different levels of propolis hidroalcoholic extract. The weight gain was influenced ($P < 0,05$) where it was observed a smaller weight gain (5,19 g) and length in the tadpoles that didn't receive propolis hidroalcoholic extract. The metamorphosis was more accelerated when the same ones received propolis hidroalcoholic extract in their diet.

Key words: weight, length, survival, metamorphosis, frogculture.

Introdução

A criação de girinos é uma etapa fundamental para o funcionamento de qualquer ranário, e quando desenvolvida de maneira adequada, propicia imagos em bom estado, para que atinjam níveis de produtividade compatível com os índices zootécnicos estabelecidos para a ranicultura moderna.

Na maioria dos ranários comerciais observa-se a ocorrência de mortalidade de girinos relacionada com vários fatores, tais como: utilização de tanques de alvenaria sem revestimento, alta densidade, excesso de alimento, vazão insuficiente, água de baixa qualidade, alta contagem de coliformes fecais, manipulação excessiva dos animais (Guimarães *et al.*, 1988 a, b; Souza *et al.*, 1993; Moraes *et al.*, 1996; Fiorio *et al.*, 1997). O modo de infecção natural mais comum é a ingestão das bactérias diretamente da água ou de comida contaminada, penetração através da pele e ferimentos provocados por traumas ou parasitos.

As doenças nas espécies criadas em cativeiro, principalmente as de origem infecciosa, têm considerável importância, pois limitam o potencial reprodutivo das rãs e a rentabilidade comercial das empresas que exploram o ramo (Souza *et al.*, 1993).

A própolis é um apiterápico utilizado há séculos na medicina popular como agente anti-inflamatório e tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, principalmente nas últimas duas décadas, no sentido de elucidar suas propriedades biológicas e farmacológicas. Sua ação antimicrobiana é reconhecida mundialmente, com muitos trabalhos científicos realizados nesse sentido, confirmando sua ação sobre bactérias, vírus, protozoários e fungos, bem como anti-inflamatória, antioxidante e imunoestimulante (Ghisalberti *et al.*, 1977; Ghisalberti, 1979; Hollands *et al.*, 1988). Dentre as ações biológicas da própolis a antibacteriana e a antifúngica são as mais populares e as que vêm sendo mais extensivamente estudadas (Marcucci,1995).

Vários estudos têm demonstrado sua eficácia no tratamento da coccidiose em coelhos (Hollands *et al.*, 1989 e 1991; Moura *et al.*, 1998), como estimulante do apetite em leitões desmamados (Sanchez e Galardi, 1989), na pododermite necrótica (*footrot*) em ovinos (Tonhasca, 1988), em casos de pneumonia (Rodriguez *et al.*, 1989) e de diarreia infecciosa em bezerros (Fumero *et al.*, 1989).

Poucos trabalhos têm sido realizados considerando-se a resposta dos animais frente a algumas dessas atividades biológicas da própolis, em termos de índices zootécnicos.

O objetivo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de própolis no ganho de peso, consumo de ração, comprimento, conversão alimentar, tempo de metamorfose e sobrevivência de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*).

Material e métodos

INSTALAÇÕES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP – Câmpus de Jaboticabal, no período de fevereiro a março de 2003.

Foram utilizados 20 tanques experimentais (Figura 1), com capacidade de 100 litros, preenchidos com 70 litros de água. Os tanques tinham abastecimento individual e escoamento diretamente do fundo. A água utilizada foi proveniente de poço artesiano.



Figura 1. Tanques experimentais utilizados no ensaio do desempenho de girinos de rã-touro.

Material biológico

Foram utilizados 1400 girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, com peso médio de 0,08 g e 18,61 mm, de comprimento no estágio 26 de Gosner (1960), procedentes de uma mesma desova, oriundos do setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP sendo os animais foram distribuídos nos 20 tanques experimentais, na densidade de 1 girino/L água.

Procedência da própolis

A própolis foi adquirida da empresa Apis Flora Industrial e Comercial LTDA, localizada em Ribeirão Preto-SP.

Características do extrato hidroalcoólico de própolis

As características do extrato hidroalcoólico de própolis, fornecidas pela Apis Flora são as seguintes:

Aspecto - líquido límpido, sem partículas em suspensão;

Cor – Âmbar;

pH - 5,35;

Teor alcoólico - 56 %;

Propriedade antioxidante - 8 segundos;

Sólidos solúveis – 11 % P/V;

Flavonóides totais - 5,45 mg/L.

Preparo e fornecimento das dietas experimentais

Para a alimentação dos girinos foi utilizada uma ração comercial, farelada (Tabela 1), na qual foram adicionadas e misturadas manualmente diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de própolis (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 %). Após esse procedimento, as rações foram secas em estufa com circulação de ar à 40 °C por 24 horas e, logo após, trituradas em liquidificador por dois minutos e estocadas em freezer.

O arraçoamento foi à lanço, de modo uniforme, quatro vezes ao dia, observando-se o consumo para evitar sobras, de forma que a quantidade oferecida fosse considerada como consumida (Utne, 1978).

Tabela 1. Composição porcentual da ração comercial (Poli peixe 450 F, em pó e peneirada em malha de 2mm).

Nutrientes	%
Proteína Bruta (PB)	45,0
Extrato etéreo (EE)	9,0
Fibra bruta (FB)	6,0
Matéria mineral (MM)	3,0
Cálcio (Ca)	8,0
Fósforo (P)	1,0
Umidade	12,5

Premix: Vitamina A 12.000,00 UI; Vitamina D3, 3.400,00 UI; Vitamina E 150,00 mg; Vitamina K, 20,00 mg; Vitamina B1 (Tiamina) 30,00 mg; Vitamina B2 (Riboflavina) 30,00 mg; Vitamina B6 (piridoxina) 30,00 mg; Vitamina B12 30,00 mg; Niacina 150,00 mg; Pantotenato de Cálcio 78,75 mg; Ácido Fólico 8,12 mg; Biotina, 0,25 mg; Vitamina C 400,00 mg; Cloreto de Colina 1,00 g; Cobre 25,00 mg; Manganês 68,75 mg; Zinco 112,50 mg; Iodo 1,25 mg; Cobalto 0,75 mg; Selênio 0,30 mg; Antioxidante 125,00 mg; Fungistático 1.000,00 mg.

Antes da alimentação os tanques foram sifonados, para a retirada dos dejetos e restos da alimentação anterior.

Avaliação da qualidade da água

No decorrer do experimento a temperatura da água dos tanques foi aferida diariamente com termômetro digital, e semanalmente realizou-se análise de água medindo-se o pH, condutividade elétrica (mediante Horiba), e oxigênio dissolvido (oxímetro Hach DO meter 16046).

Avaliação dos parâmetros de desenvolvimento

Foram avaliados os seguintes parâmetros de desenvolvimento: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar aparente, sobrevivência, comprimento total, e porcentagem de animais metamorfoseados.

Quinzenalmente, 20 girinos de cada tanque experimental (28,6 %) foram pesados individualmente, em balança analítica (0,0001g de sensibilidade) e medido seu comprimento total com paquímetro digital – AKITA (Figura 2). Na última amostragem todos os animais foram pesados e medidos.

A conversão alimentar aparente (C.A.A.) foi calculada pela relação entre as médias de consumo de ração e de ganho de peso de cada parcela.

Os dados de sobrevivência, expressados em %, foram transformados em $\arcsen \sqrt{P/100}$ para a realização da análise estatística.



Figura 2. Medida do comprimento total dos girinos de rã-touro utilizados no ensaio do desempenho.

Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições representado por: T1 - 0,0; T2- 0,2; T2 – 0,5; T4 – 1 0; e T5 – 1,5 % de própolis.

A análise estatística dos resultados (ganho de peso (g), consumo de ração (g), conversão alimentar, sobrevivência (%) e comprimento (mm)) foi realizada através de análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey.

Resultados e discussão

Características hidrológicas

A temperatura média da água dos tanques durante o período experimental variou de $28,27 \pm 0,45$ a $28,77 \pm 0,34$ °C. Esses valores estão dentro da faixa

considerada ótima para cultivo de girinos (24,5 a 29,1 °C), segundo Justo *et al.* (1985); Lima *et al.* (2003), Bambozzi *et al.* (2004) e Hayashi *et al.* (2004).

De maneira geral os parâmetros hídricos apresentaram-se relativamente constantes nos diferentes tratamentos.

Os teores médios de oxigênio dissolvido variaram de $5,75 \pm 0,33$ a $6,06 \pm 0,67$ mg/L estando dentro do limite aceitável para o cultivo de organismos aquáticos (6,5 a 6,9) segundo Culley Jr. (1981).

Os valores médios de pH variando de $7,3 \pm 0,17$ a $7,6 \pm 0,06$, também estão próximos ao valor recomendado para o cultivo de girinos de 7,4 segundo Hayashi *et al.* (2004) e de 7,96 segundo Bambozzi *et al.* (2004).

A condutividade elétrica da água dos tanques experimentais variou de $190,2 \pm 5,52$ a $195,1 \pm 4,94$ $\mu\text{S/cm}$.

Parâmetros de desenvolvimento

O ganho de peso dos girinos observado no período experimental foi influenciado significativamente ($P < 0,05$) pela adição de própolis na ração (Tabela 2). Observa-se que os girinos que não receberam própolis apresentaram um menor ganho de peso (5,19 g), diferindo significativamente daqueles que receberam 1 % de própolis (6,23 g). Entre os tratamentos que foram adicionados própolis na ração não foi observada diferença significativa no ganho de peso dos girinos.

Através da Figura 3 observa-se que houve tendência de maior peso quando os girinos foram alimentados com ração suplementada com própolis, indicando que a suplementação favoreceu o ganho de peso dos mesmos.

Soares *et al.* (1983) testando diferentes densidades populacionais no cultivo de girinos de rã-touro, obtiveram ganho de peso de 7,36 g em girinos alimentados com 40 % de proteína bruta. Stéfani *et al.* (2001) obtiveram ganho de peso de 7,01 g, em girinos alimentados com 500mg/kg de vitamina C na ração, valores próximos ao observado no presente trabalho, nos girinos que reseberam própolis.

Justo *et al.* (1985) testando diferentes densidades populacionais no cultivo de girinos de rã-touro obtiveram girinos com peso de 4,82 g; Carmona-Osalde *et al.* (1996) testando o requerimento de proteína no cultivo de girinos de rã-touro obteve girinos com peso de 3,4 g; Bambozzi *et al.* (2004) testando o efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento obtiveram girinos de rã-touro com peso de 2 g e Hayashi *et al.* (2004) obtiveram girinos com 10 g de peso em girinos cultivados em tanque rede, valores diferentes aos encontrados no presente trabalho.

Tabela 2. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para ganho de peso (g), consumo de ração (g), conversão alimentar, sobrevivência (%) e comprimento (mm).

		Variável				
		Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	Conversão alimentar aparente	Sobrevivência (%)	Comprimento (mm)
F para tratamentos		3,36*	1,49 ^{NS}	0,99 ^{NS}	1,30 ^{NS}	3,04 ^{NS}
CV (%)		7,77	24,09	33,07	29,88	3,39
Médias	T1 (0,0)	5,19 b	7,22	0,95	62,50	85,65
	T2(0,2)	5,88 ab	6,41	1,10	68,25	87,27
	T3 (0,5)	6,09 ab	6,65	1,07	65,75	90,25
	T4 (1,0)	6,23 a	8,34	1,29	52,75	91,26
	T5 (1,5)	6,14 ab	8,99	1,43	74,25	91,67

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 0,5% de probabilidade.

NS- não significativo

*- Significativo ao nível de 5 %

1- dados originais

T1 = 0,0 % de própolis; T2 = 0,2 % de própolis; T3 = 0,5 % de própolis ; T4= 1,0% de própolis ;T5 = 1,5 % de própolis .

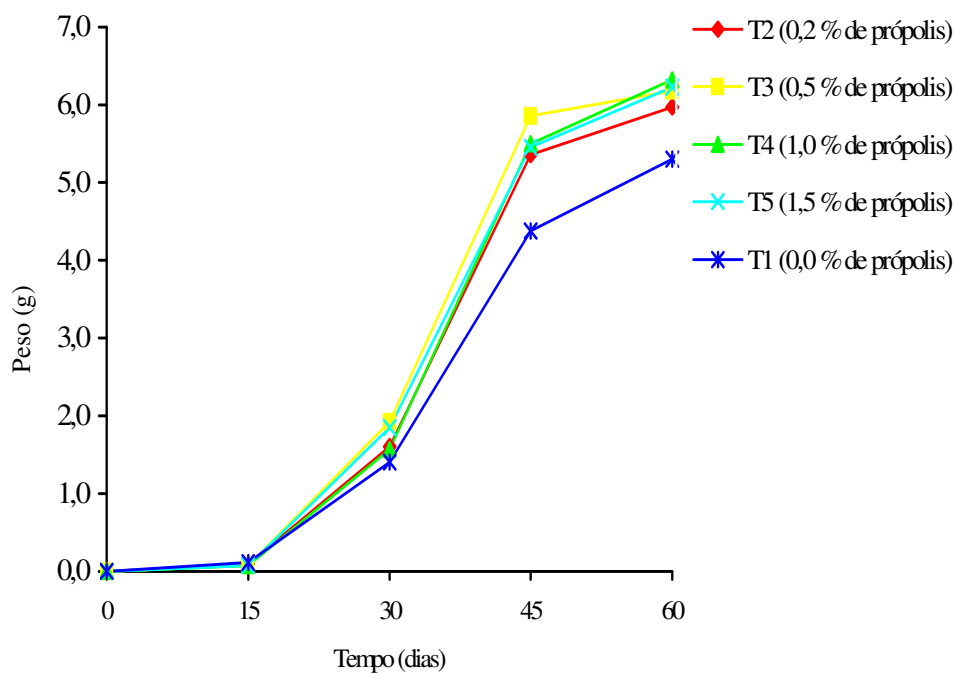


Figura 3. Peso médio de girinos de rã-touro durante o período experimental submetidos a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis.

Na literatura consultada não foram encontradas pesquisas relacionadas ao uso do extrato de própolis com nenhum organismo aquático. De acordo com Garcia (2001), poucos trabalhos têm sido realizados em termos de índices zootécnicos frente às atividades biológicas da própolis.

Sanchez e Galardi (1989) testaram aplicações oral de emulsão aquosa de própolis (10 %) em 60 leitões desmamados, e observou que os animais tratados tiveram maior ganho de peso, consequência de uma ação estimulante da própolis sobre o apetite dos animais.

Garcia (2001) testou ração peletizada com concentrações de 0,1; 0,2; e 0,3 % de própolis em coelhos da raça Norfolk 2000, e observou maiores ganhos de peso nos animais que receberam ração com 0,1 % de extrato seco de própolis e os menores, os que receberam rações com 0,3 % de extrato seco de própolis.

O consumo de ração dos girinos durante o período experimental não teve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, variando de 6,41 a 8,99 g (Tabela 2). O menor consumo de ração (6,41 g) foi observado nos girinos que receberam 0,2 % de extrato hidroalcoólico de própolis na ração e o maior consumo (8,99 g) nos girinos que receberam 1,5 % de extrato hidroalcoólico de própolis na ração.

A conversão alimentar aparente dos girinos de rã-touro não foi influenciada significativamente ($P > 0,05$) pelos diferentes tratamentos (Tabela 2), variando de 0,95 a 1,43: 1. Os valores de conversão alimentar encontrado no presente trabalho foram semelhantes aqueles encontrados por Lima *et al.* (2003), 1,5:1, sendo considerados satisfatórios. Lima e Valles (1998) e Hayashi *et al.* (2004) obtiveram para girinos de rã-touro conversão alimentar média de 1,63:1 e 1,02:1 respectivamente utilizando ração com 40 % de proteína bruta.

A sobrevivência dos girinos também não foi afetada significativamente ($P > 0,05$) pelos tratamentos (Tabela 2), variando de 44,25 a 68,25 %. Apesar de não ocorrer diferenças significativas, observou-se uma tendência de maior índice de sobrevivência (68,25 %) quando os girinos receberam ração suplementada com 0,2 % de extrato de própolis. A menor porcentagem de sobrevivência (44,25 %) encontrada no T5 foi devido à ocorrência de edema nos membros posteriores de alguns girinos (Figura 4), aumentando a mortalidade dos mesmos.

Os girinos doentes apresentavam sintomas típicos de "red leg", doença provocada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*, entretanto a presença da mesma não

foi confirmada pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do



CAUNESP.

Figura 4. Edema nos membros posteriores dos girinos de rã-touro de uma repetição nos tratamentos 4 e 5 do experimento.

Os índices de sobrevivência observados (exceto do T4 e T5) foram semelhantes aos resultados obtidos por Stéfani *et al.* (2001) que encontraram 62,83 % de sobrevivência para girinos alimentados com ração suplementada com 500 mg de vitamina C.

Lima e Valles (1998) e Lima *et al.* (2003) indicaram respectivamente, que valores de 6 % e 7,65 % de mortalidade podem ser considerados como satisfatórios excluindo-se casos de mortalidade provocada por eventuais doenças ou erros de manejo. Lima *et al.* (2003) encontraram índices de mortalidade que variaram de 0,7 a 35,2 % em experimentos de campo.

Bambozzi *et al.* (2004) obtiveram sobrevivência de 100 % em girinos de rã-touro, usando filtro de carvão ativado em 135 dias de experimentação e Hayashi *et al.* (2004), 95,83 % de sobrevivência em girinos cultivados em tanque rede com aeração suplementar.

Os valores médios do comprimento dos girinos estão apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que o comprimento total dos girinos de rã-touro não foi influenciado significativamente ($P > 0,05$) pelos diferentes tratamentos, variando de 85,65 a 91,67 mm.

Na Figura 5 observa-se que aos 45 dias do período experimental os girinos que receberam própolis apresentaram uma tendência de maior comprimento comparado com os girinos que não receberam própolis em sua dieta.

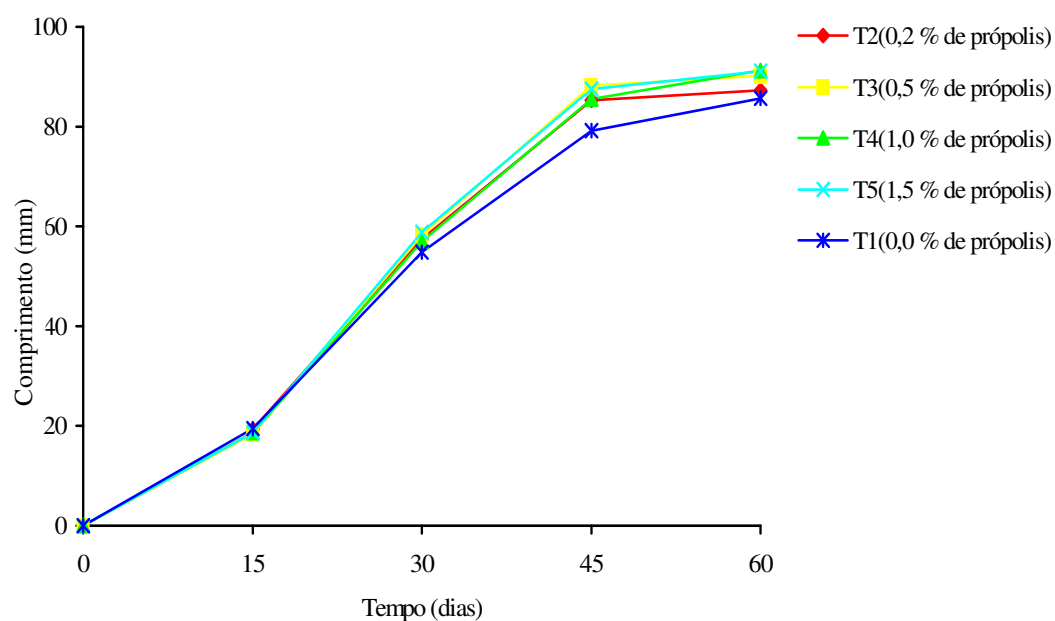


Figura 5. Comprimento médio total dos girinos de rã-touro durante o período experimental submetidos a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis.

O comprimento dos girinos é um dado importante, principalmente na fase final da metamorfose, onde girinos maiores darão origem a imagos maiores, diminuindo a mortalidade e facilitando o manejo da fase inicial de engorda.

Na Tabela 3 pode-se observar a porcentagem de girinos nos diferentes estágios de desenvolvimento de acordo com Gosner (1960), onde girinos a partir do estágio 42 encontravam-se no clímax da metamorfose, ou seja, ocorreu o rompimento dos membros anteriores (estágio 42), a boca começou a se alargar e a cauda, sendo gradativamente reabsorvida (estágios 43 a 46).

Os girinos que receberam própolis apresentaram as maiores porcentagens de animais no estágio 42, sendo 8,1; 10,3; 6,2 e 12,4 % para T2, T3, T4 e T5, respectivamente. A menor porcentagem (4,8 %) foi observada nos girinos que não receberam própolis (T5), indicando que o extrato hidroalcoólico de própolis pode ter favorecido a metamorfose nas condições experimentais (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de girinos de rã-touro nos diferentes estágios de desenvolvimento, de acordo com Gosner (1960), no final do período experimental (60 dias).

Estágio de desenvolvimento	Tratamentos				
	T ₁ (%)	T ₂ (%)	T ₃ (%)	T ₄ (%)	T ₅ (%)
< 37	0,8	0,7	-	0,9	0,6
37	0,8	1,1	-	1,4	-
38	4,0	3,3	1,1	2,4	-
39	13,6	4,8	2,7	5,2	6,2
40	31,6	20,1	19,0	23,2	19,2
41	42,8	60,1	64,3	58,8	58,8
42	4,8	8,1	10,3	6,2	12,4
43	1,6	1,8	2,7	1,9	2,8

T1 = 0,0 % de própolis; T2 = 0,2 % de própolis; T3 = 0,5 % de própolis ; T4 = 1,0% de própolis ; T5 = 1,5 % de própolis.

Bambozzi *et al.* (2004) obtiveram 43 % de girinos metamorfoseados no estágio 43 de Gosner, em 135 dias de experimento, período muito maior quando comparado com os resultados obtidos.

De acordo com Lima *et al.* (2003) a prolongação no tempo de metamorfose compromete a qualidade da água, eleva o custo da produção pelo consumo da ração e pode aumentar ou promover a inanição, levando ao canibalismo entre girinos.

O tempo de metamorfose dos girinos depende da temperatura da água e também da composição da dieta na alimentação, concordando com Wilbur e Collins (1973) que afirmaram que o desenvolvimento das larvas de anfíbios é extremamente dependente do meio em que são criados.

Conclusão

Observa-se que a adição de extrato hidroalcoólico de própolis na ração influenciou o desempenho de girinos de rã-touro, melhorando seu ganho de peso.

Referências

BAMBOZZI, C.A. *et al.* Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *R. Bras. Zootc.* Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-17, 2004.

CARMONA-OSALDE, C. *et al.* La nutrición de la rana y su importancia en la ranicultura em 1997 In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA 9., 1997, Santos. Resumos. P. 75-84.

CULLEY Jr, D.D. Have we turned the corner on bullfrog culture. *Aquacult. Maga.* Stuttgart, USA., v. 7, n. 3, p. 20-24, 1981.

FIORIO, W.A.B. *et al.* Mortalidade em rãs touro-gigante (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) associada a soluções de continuidade na pele: estudo anatómico patológico e microbiológico. em 1997. *In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA*, 9., 1997, Santos. *Resumos...* p. 214.

FUMERO, A.P. *et al.* Diarrea infecciosa del ternero: Resultados Preliminares de los tratamientos con NB-1 (una modificación de CNB-R5). em 1989 *In: SIMPOSIO INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL*, 1., 1989. Varadero. Matanzas, Memórias....Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, 1989. p.150-153.

GARCIA, C.E. *Efeitos da própolis sobre Unidades Formadoras de Colônias de Pasteurella multocida, Desempenho Produtivo e Constituintes Sangüíneas de Coelho.* 2001. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2001.

GHISALBERTI, E.L. *et al.* Potencial drugs from propolis. *In: FRIGERIO, A. ; GHISALBERTI, E.L. Mass spectrometry in drugs metabolism.* New York: Plenum Press, 1977. p.101-120.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. *Bee world*, Cardiff, v. 60, n.1, p. 59-84, 1979.

GOSNER, K.L. A simplified table, for staging anura embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, Jonson City, v.16, n. 2, p.185-190, 1960.

GUIMARÃES, N.D. et al. Infecção por *Streptococcus* sp. em rã-touro *Rana catesbeiana* nos estados de Goiás e Pará. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 6., 1988a. Rio de Janeiro: *Anais...* p. 83-93.

GUIMARÃES, N.D. et al. Estudo microbiológico de rãs doentes dos ranários de Goiás e Distrito Federal In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 6., 1988b. Rio de Janeiro: *Anais...* p.287-291.

HAYASHI. C. et al. Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanque-rede. *R. Bras. Zootc.* Viçosa, v. 33, n. 1, p. 14-20, 2004.

HOLLANDS, I. et al. Comparative analysis of propolis, sulphaquinoxalina and sulphamethazina in rabbits whith coccidiosis. *Rev. Cubana Ciênc. Vet. Habana*, v. 19, n.2. p.99-104, 1988.

HOLLANDS, I. et al. Demostración ultraestructural del efecto citohepatoprotector del propoleo. *Rev. Cubana Cienc. Vet.*, Habana, v. 22, n. 2, p.85-90, 1991.

HOLLANDS, I. et al. El propoleo y sus posibilidades en el tratamiento de la coccidiosis del conejo. em 1989. In: SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1., 1989, Varadero. Matanzas. *Memorias....Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria*, 1989. p.100-108.

JUSTO. L.C. et al. Ganho de peso de girinos de (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em criação intensiva, sob diferentes densidades populacionais. *Bol. Inst. Pesca.*, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 31-37, 1985.

LIMA, S.L. *et al.* Desempenho zootécnico e tabela de alimentação de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) criados no sistema anfigranja. *R. Bras. Zootc.*, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 512-518, 2003.

LIMA, S.L.; VALLES, G.A. Desenvolvimento de instalações e técnicas de manejo para a criação intensiva de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana* no sistema anfigranja em 1998. *In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA*, 10., 1998, Recife *Resumos Recife: Associação Brasileira de Aquicultura*, 1998, p. 273.

MARCUCCI, M.C. Propolis chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Paris, v. 26, p. 83 - 99. 1995.

MORAES, J.R.E. *et al.* Tuberculose em (*Rana catesbeiana* Shaw, 1082) oriundas de ranários comerciais diagnosticado pelo Centro de Aquicultura da UNESP. em 1996. *In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS*, 4., Pirassununga. SP. *Resumo...* p. 28.

MOURA, L.P.P. *et al.* Efeito da solução hidroalcoólica de própolis e robenidina sobre a contagem de oocitos por grama de fezes de *Eimeria spp.* em coelhos Nova Zelândia Branco. *R. Bras. Zootc.*, Viçosa. v. 27, n. 2, p. 325-330, 1998.

RODRIGUEZ, R. *et al.* Neumonia del ternero: efecto clinico de los antibioticos NB-2, variante del CNB-A17, y la oximicina comercial. em 1989. *In: SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL*, 1., 1989. Varadero. Matanzas. *Memorias....* Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Intituto de Medicina Veterinaria, 1989. p. 149-150.

SANCHEZ, M.; GALARDI, R. Influencia del propoleo en la conversión de lechones destetados. em 1988. *In: SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1., 1989. Varadero. Matanzas. Memorias....Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, 1989. p.211-214.*

SOARES. A.E. *et al.* Efeito da densidade de população no ganho de peso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, v. 10, p. 47-51, 1983.

SOUZA, J.R. *et al.* *Longibucca catesbeiana* n. sp. Nematoda: Cylirocorporidae, a gastrointestinal parasite of the bullfrog *Rana catesbeiana* Shw, 1802 in Brazil. *Singapore Med J. Singapore*, v. 53, n. 3, p. 97-102, 1993.

STÉFANI. M. *et al.* Suplementação com Vitamina C e E sobre o desenvolvimento e sobrevivência de girinos de rá touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Ciênc. Rural, Santa Maria*, v. 31, n. 5, p. 869-872, 2001.

TONHASCA, J.G. *Utilização da própolis (partas e soluções) no tratamento curativo da pododermite necrótica em ovinos. 1988. Monografia (ass. área interna) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1988.*

UTNE, F. Standart methods and therminology in finfish nutrition, em 1978. *In: SIMPOSIUM OF FINFISH OF NUTRITION AND FEED TECHNOLOGY, 1978, Hamburg. Proceedings... Hamburg: EIFAC/FAO, 1978. p. 14.*

WILBUR, H.M.; COLLINS, J.P. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science, Washington*, v. 182, n. 4119, p. 1305-1314, 1973.

CAPÍTULO III

Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

Normas da Revista Acta Scientiarum

Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

Effect of the propolis hidroalcoholic extract in the composition leucocyary in the blood of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*)

Luis Ricardo Romero Arauco¹, Marta Verardino De Stéfani², Laura Satiko Okada Nakaghi³

¹**Centro de Aqüicultura da UNESP-CAUNESP. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14844-900**

²**CAUNESP, Departamento de Zootecnia, FCAV, UNESP-Jaboticabal, São Paulo.**

³**CAUNESP, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo.**

Título resumido: Efeito da própolis no sangue.

Autor para correspondência: Marta Verardino De Stéfani, Centro de Aqüicultura da Unesp. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n – Jaboticabal – SP – Brasil – Cep 14844 -900. E-mail: martavs@fcav.unesp.br

Resumo

Foi avaliado o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na porcentagem de leucócitos no sangue dos girinos do estágio 26 ao estágio 42 de Gosner (1960). Foram utilizados 1400 girinos, distribuídos em 20 tanques experimentais com 70 L de água, na densidade de um girino por litro. Foi misturado à ração comercial própolis nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; e 1,5 %. O arraçoamento foi quatro vezes ao dia. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições. No final do experimento, foi colhido o sangue do vaso caudal, de cinco girinos de cada repetição. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas pelo método de Rosenfeld (1947), em microscopia de luz. Foram contadas 100 células por lâmina. O grupo leucocitário influenciado pela própolis ($P < 0,05$) foram os monócitos, que nas doses de 0,2 e 0,5 %, apresentaram as maiores porcentagens, diferindo do grupo controle e daquele de dose 1,5 %. Os linfócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

Palavras chaves: sangue, ranicultura, contagem diferencial de leucócitos.

Abstract

The effect of the propolis hidroalcoholic extract was evaluated in leucocytes percentage of the blood bullfrog tadpoles at stage 42 of Gosner (1960). 1,400 tadpoles were used, distributed in twenty experimental tanks with 70 liters of water, in the density of one tadpole per liter. The commercial ration was mixed with propolis in the concentrations of (0.0; 0.2; 0.5; 1.0; and 1.5 %). The feeding was four times a day. Were used a completely randomized design with five treatments and three repetitions. In the end of the experiment, it was picked the blood of the vase flow, of five tadpoles of each repetition. The differential counting of leucocytes was accomplished in red-faced extensions by the method of Rosenfeld (1947), in light microscopia. They were counted 100 cells for sheet. The leucocytary group influenced by the propolis ($P < 0,05$) were the monocytes, that in the doses of 0.2 and 0.5 %, presented largest percentage, defering of the control group and 1.5 %. The lymphocytes, basophils, neutrophils, eosinophils didn't present statistical difference among the treatments.

Key words: blood, frogculture, diferencial conting of leucocytes.

Introdução

Na maioria dos ranários comerciais observa-se a ocorrência de mortalidade de girinos relacionada com vários fatores, tais como: manejo, instalações inadequadas, deficiência alimentar, má qualidade da água e doenças provocadas por bactérias e fungos. Conhecer as modificações fisiológicas dos animais através do leucograma facilita a orientação do diagnóstico de doenças, desde que a taxa de leucócitos possa ser comparada com seu adequado valor de referência. A morfologia dos leucócitos de anfíbios é amplamente estudada usando microscopia de luz (Cannon *et al.*, 1986).

O aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos pode ser induzida pela liberação de patógenos mortos ou de seus produtos (Roitt, *et al.*, 1998) assim como da aplicação de imunoestimuladores e adjuvantes (Siwicki *et al.*, 1998). A própolis tem se demonstrado efetiva contra bactérias gram positivas, fungos e pode também agir como promotor de crescimento e imunoestimulante (Sforcin *et al.*, 2004).

A própolis é um produto de origem vegetal, oriunda de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas de brotos de flores, exudatos de plantas, e modificadas na colméia por adição de secreções salivares e cera (Pinheiro-Filho, 1998). É utilizada pelas abelhas na proteção da colméia contra o ataque de outros insetos e a proliferação de microorganismos, incluindo fungos e bactérias (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995). De acordo com Marcucci (1995) já foram detectados mais de 50 flavonóides na própolis, entre os quais compostos pertencentes aos grupos dos polifenóis vegetais, ácidos aromáticos e oléicos.

A melhora observada no desempenho dos animais tratados com extrato de própolis em suas dietas pode ser consequência da melhora nas respostas imunológicas dos mesmos, após o consumo de própolis. Perez (1989), estudando a dose parenteral da própolis sobre a resposta imune em coelhos, observou que doses mais altas sugerem uma influência inibitória e as mais baixas mostraram melhores resultados, refletindo-se em níveis mais elevados de imunoglobulinas e anticorpos. Sforcin (1996) verificou que a atividade das células natural “*killer*” foi elevada nos grupos tratados com própolis, revelando sua ação imunomoduladora.

Scheller *et al.*, (1977) e Hollands *et al.*, (1991) não observaram reação alérgica alguma à própolis em coelhos, chinchila e camundongos tratados com extrato de própolis em suas dietas.

Entretanto, alguns autores têm relatado respostas exageradas ou inapropriadas do sistema imunológico frente à administração de própolis. Estudos recentes têm demonstrado que algumas substâncias presentes na própolis podem combinar-se com proteínas do organismo e tornarem-se imunogênicas, produzindo o quadro de hipersensibilidade (Paulino, 1999).

O objetivo foi verificar possíveis alterações na composição leucocitária no sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) no estágio 42 de Gosner (1960), alimentados com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis na ração.

Material e métodos

INSTALAÇÕES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP – Câmpus de Jaboticabal, no período de fevereiro a maio de 2003.

Foram utilizados 20 tanques experimentais, com capacidade de 100 litros, os quais permaneceram com 70 L de água. Os tanques tinham abastecimento individual e escoamento diretamente do fundo. A água utilizada foi proveniente de poço artesiano.

Material biológico

Foram utilizados 1400 girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, com peso médio de 0,08 g no estágio 26 de Gosner (1960), procedentes de uma mesma desova, oriundos do setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP, Os animais foram distribuídos nos 20 tanques experimentais, na densidade de 1 girino/L de água.

Procedência da própolis

A própolis foi adquirida da empresa Apis Flora Industrial e Comercial LTDA, localizada em Ribeirão Preto-SP.

Características do extrato hidroalcoólico de própolis

As características do extrato hidroalcoólico de própolis, fornecidas pela Apis

Flora foram as seguintes:

Aspecto- líquido límpido, sem partículas em suspensão

Cor – Âmbar;

pH - 5,35;

Teor alcoólico - 56 %;

Propriedade antioxidante - 8 segundos;

Sólidos solúveis - 11 P/V %;

Flavonóides totais - 5,45 mg/L.

Preparo e fornecimento das dietas experimentais

Para a alimentação dos girinos foi utilizada ração comercial, farelada (Tabela 1), na qual foram adicionadas e misturadas manualmente diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de própolis (0,0; 0,2; 0,5;1,0;1,5 %). Após esse procedimento, as rações foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 24 horas e, logo após, trituradas em liquidificador por dois minutos e estocadas em freezer.

Tabela 1. Composição percentual da ração comercial (Poli peixe 450 F, em pó e peneirada em malha de 2mm).

Nutrientes	%
Proteína Bruta (PB)	45,0

Extrato etéreo (EE)	9,0
Fibra bruta (FB)	6,0
Matéria mineral (MM)	3,0
Cálcio (Ca)	8,0
Fósforo (P)	1,0
Umidade	12,5

Premix: Vitamina A 12.000,00 UI; Vitamina D3, 3.400,00 UI; Vitamina E 150,00 mg; Vitamina K, 20,00 mg; Vitamina B1 (Tiamina) 30,00 mg; Vitamina B2 (Riboflavina) 30,00 mg; Vitamina B6 (piridoxina) 30,00 mg; Vitamina b12 30,00 mg; Niacina 150,00 mg; Pantotenato de Cálcio 78,75 mg; Ácido Fólico 8,12 mg; Biotina, 0,25 mg; Vitamina C 400,00 mg; Cloreto de Colina 1,00 g; Cobre 25,00 mg; Manganês 68,75 mg; Zinco 112,50 mg; Iodo 1,25 mg; Cobalto 0,75 mg; Selênio 0,30 mg; Antioxidante 125,00 mg; Fungistático 1.000,00 mg.

O arraçoamento foi a lanço, de modo uniforme, quatro vezes ao dia, observando-se o consumo para evitar sobras, de forma que a quantidade oferecida foi considerada como consumida (Utne, 1978). Antes da alimentação diária os tanques foram sifonados para a retirada dos dejetos e restos da alimentação anterior.

Avaliação da qualidade da água

No decorrer do experimento a temperatura da água dos tanques foi aferida diariamente com termômetro digital, e semanalmente realizou-se análise de água medindo-se o pH, condutividade elétrica (mediante Horiba), e oxigênio dissolvido (oxímetro Hach DO meter 16046).

Avaliação Hematológica

Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada no fim do período experimental, nos girinos que estavam no estágio 42 da tabela de Gosner (1960). Para isso utilizou-se seringa de insulina heparinizada, onde uma alíquota de sangue de aproximadamente 10 μL foi colhida por punção do vaso caudal (Figura 1), a qual foi depositada diretamente sobre lâmina e realizada a extensão. Foi coletado sangue de cinco girinos de cada repetição para todos os tratamentos, e as lâminas foram feitas em duplicata.



Figura 1. Processo de extração do sangue do vaso caudal de girino de rã-touro no fim do período experimental.

Contagem diferencial de leucócitos

Para a contagem Diferencial de Leucócitos (CDL) foram feitas extensões sanguíneas com o sangue coletado (10 μL), que após secagem, foram coradas pelo método de Rosenfeld (1947), examinadas sob microscopia de luz, com objetiva de 40x.

Foram analisadas 15 lâminas em cada tratamento, sendo cinco lâminas por repetição, onde cada lâmina representou um animal. Foram contados 100 leucócitos por lâmina, a fim de verificar a frequência de cada componente celular de interesse. As células foram classificadas em cinco categorias (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, e monócitos) conforme sua morfologia e visualização ao microscópio, tomando-se por base os critérios adotados por Storer e Usinger (1979), Duellman e Trueb (1986), Turner (1988), Dias (1992), Ferreira (2002), Coppo (2003), Fioranelli *et al.* (2004) e Fenerick Jr. (2004).

Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (dietas com concentrações de 0,0; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 % de própolis) e três repetições.

A análise dos dados da Contagem Diferencial de Leucócitos foi realizada através da análise de variância, seguida pelo Teste de Tukey, para verificar as diferenças estatísticas.

Resultados e discussão

Características hidrológicas

A temperatura média da água dos tanques durante o período experimental variou de $28,27 \pm 0,45$ a $28,77 \pm 0,34$ °C. Esses valores estão dentro da faixa considerada ótima para cultivo de girinos ($24,5$ a $29,1$ °C), segundo Justo *et al.* (1985); Lima *et al.* (2003), Bambozzi *et al.* (2004) e Hayashi *et al.* (2004).

De maneira geral os parâmetros hídricos apresentaram-se relativamente constantes nos diferentes tratamentos.

Os teores médios de oxigênio dissolvido variaram de $5,75 \pm 0,33$) a $6,06, \pm 0,67$ mg/L estando dentro do limite aceitável para o cultivo de organismos aquáticos ($6,5$ a $6,9$) segundo Culley Jr. (1981).

Os valores médios de pH variando de $7,3 \pm 0,17$ a $7,6 \pm 0,06$, também estão próximos ao valor recomendado para o cultivo de girinos de $7,4$ segundo Hayashi *et al.* (2004) e de $7,96$ segundo Bambozzi *et al.* (2004).

A condutividade elétrica da água dos tanques experimentais variou de $190,2 \pm 5,52$ a $195,1 \pm 4,94$ $\mu\text{S/cm}$.

Contagem diferencial de leucócitos

Os tipos celulares encontrados no sangue periférico dos girinos de rã-touro encontram-se na Figura 2. Os diferentes tipos leucocitários foram: linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos, os mesmos descritos por Storer e Usinger (1979), Duellman e Trueb (1986), Turner (1988), Dias (1992), Ferreira (2002), Coppo (2003), Fioranelli *et al.* (2004) e Fenerick Jr. (2004).

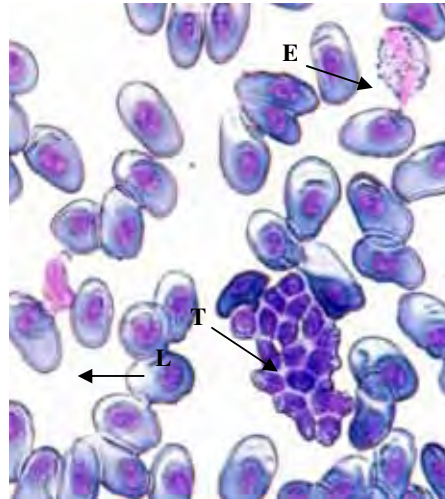
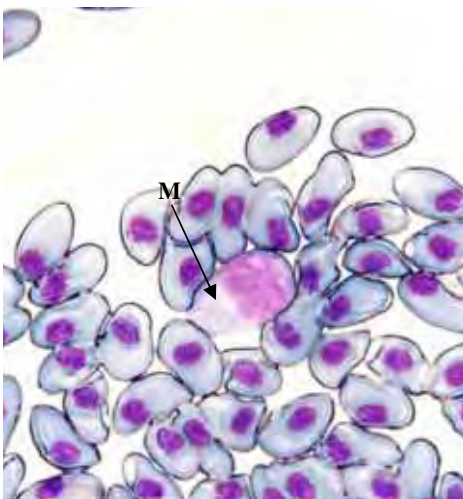
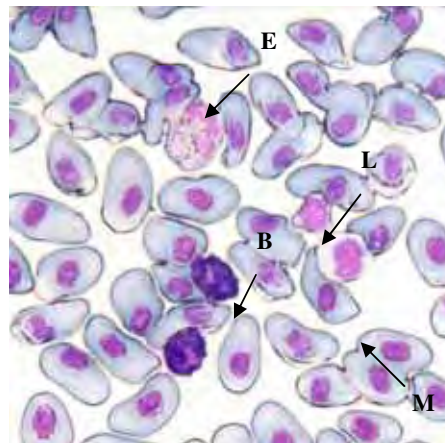
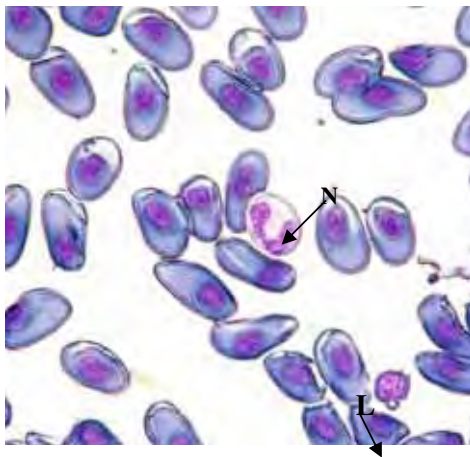
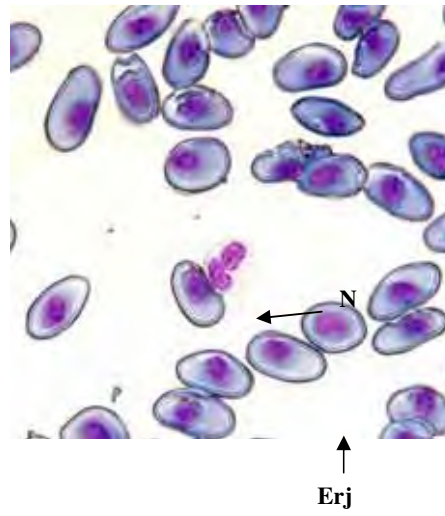
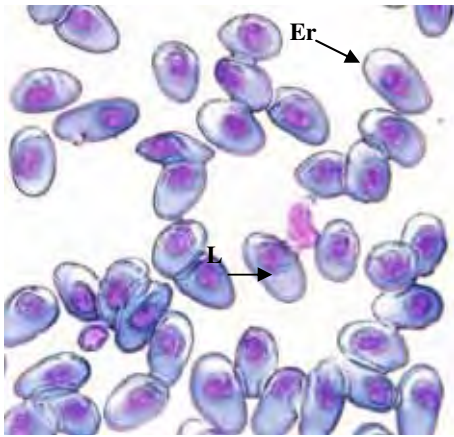


Figura 2. Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de *R. catesbeiana* exposto a 0,5 % de extrato hidroalcoólico de própolis
 L = Linfócito, N = Neutrófilo, B = Basófilo, Er = Eritrócito, Erj = Eritrócito Jovem E = Eosinófilo, M = Monócito, T = Trombócito, coloração Rosenfeld. Aumento 400x.

Os linfócitos são os leucócitos mais freqüentes no sangue periférico de anuros larvais. Apresentam núcleo arredondado com cromatina densa e citoplasma basófilo, algumas vezes apresentando microvilosidades (projeção citoplasmática). Os neutrófilos frequentemente possuem núcleo segmentado, apresentam citoplasma ocupado por extensas áreas de retículo endoplasmático granular bem desenvolvido. Os basófilos são comuns no sangue periférico de girinos, particularmente em *R. catesbeiana*, e mostram núcleos sem segmentação e citoplasma com exuberantes grânulos basofílicos. Os eosinófilos apresentam núcleo segmentado e numerosos grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilos no citoplasma. Os monócitos são raros e podem ser descritos como células com núcleo geralmente excêntrico, ocupando quase a totalidade da célula, com citoplasma levemente vacuolado e fracamente basofílico.

O resultado da análise de variância dos diferentes tipos de leucócitos encontrado no sangue periférico de girinos de rã-touro encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias dos diferentes tipos leucocitários encontrados no sangue periférico de girinos de rã-touro.

Variável					
	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	Monócitos (%)
F para Tratamentos	8,48 ^{NS}	0,62 ^{NS}	0,91 ^{NS}	2,99 ^{NS}	11,79 ^{**}
CV (%)	6,48	53,94	33,92	25,53	45,61

Médias	T1 (0,0)	72,13	6,07	11,03	10,67	0,07 b
	T2 (0,2)	73,53	3,27	8,06	10,07	5,07 a
	T3 (0,5)	65,93	4,07	11,53	10,53	7,87 a
	T4 (1,0)	72,86	5,67	11,53	7,26	2,7 ab
	T5 (1,5)	79,93	4,47	8,13	6,93	0,53 b

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

^{NS} - não significativo.

**** - significativo ao nível de 1 % de probabilidade.**

T5 = 0,0 % de própolis; T2 = 0,2 % de própolis; T3 = 0,5 % de própolis ; T4 = 1,0% de própolis ;T5= 1,5 % de própolis.

Os valores médios das porcentagens de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos do sangue periférico de girinos de rã-touro não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos diferentes níveis de própolis na ração. Nos diferentes tratamentos, a quantidade média de linfócitos no sangue dos girinos variou de 65,93 a 79,93 % (Tabela 2), sendo o grupo predominante, o mesmo observado por Fenerick Jr. (2004) que obteve valores próximos de linfócitos no sangue de rãs-touro adultas (69,62 a 72,02 %).

Como na literatura não foi encontrado trabalhos com girinos, os resultados foram comparados com rãs adultas.

Os resultados obtidos diferem daqueles de Wang e Chang (1994) que obtiveram para rãs adultas em cativeiro 52,77 % de linfócitos; de Szubartowska *et al.* (1990) que obtiveram para *Rana esculenta* adulta 52,87 % de linfócitos; Fioranelli, (2004) 26,8 %; Coopco (2003) 16,3 a 39,8 % de linfócitos em *R. catesbeiana* adulta e Ferreira (2002) que obteve para girinos de rã-touro 94,22 % de linfócitos em 48 horas e 89,84 % em 312 horas no período de amostragem.

A porcentagem de neutrófilos no sangue dos girinos, nos diferentes tratamentos, variou de 3,27 a 6,07 % (Tabela 2), valores próximos aos obtidos por Ferreira (2002), 2,08 a 5,47 % e Fenerick Jr. (2004) que obteve valores de 2,82 a 3,09 % de neutrófilos no sangue de rãs-touro adultas; e inferiores aqueles obtidos por Szubartowska *et al.* (1990) que observaram para *Rana esculenta* adulta 19,10 % de neutrófilos; Wang e Chang (1994) que encontraram valores de 29,87 % de neutrófilos em rãs-touro adultas; Coopco (2003) 40,0 a 86,1 % e Fioranelli *et al.*, (2004) 60,9 % de neutrófilos em *Rana catesbeiana* adulta.

De acordo com Ranzani-Paiva (1995) a diminuição da porcentagem de neutrófilos geralmente é citada na literatura como consequência de alguma enfermidade.

As porcentagens de basófilos e eosinófilos do sangue dos girinos variaram de 6,93 a 10,67 % e de 8,06 a 11,53 % respectivamente, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos (Tabela 2). Esses resultados foram superiores aqueles encontrados por Wang e Chang (1994), 2,66 % de basófilos e 4,03 % de eosinófilos para rãs-touro adultas. Szubartowska *et al.*, (1990) obtiveram para *Rana esculenta* adulta valores próximos de eosinófilos (13,13 %) e 2,03 % de basófilos. Fioranelli *et al.*, (2004) 3,5 % de basófilos e 5,8 % de eosinófilos. Coop (2003), 0,0 a 6,0 % de basófilo e 2,0 a 11,9 % de eosinófilos em *Rana catesbeiana* adulta. Fenerick Jr. (2004) observou no sangue de rã-touro adulta valores de 14,29 a 16 % de basófilos e de 1,53 a 1,85 % de eosinófilos. Ferreira (2002) obteve para girinos de rã-touro valores de 2,82 a 3,09 % de basófilos e 0,74 a 1,22 % de eosinófilos em 48 e 312 horas no período de amostragem.

Somente houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$) na porcentagem de monócitos no sangue dos girinos de rã-touro (Tabela 2), onde observou-se que girinos que receberam a dose mais alta de extrato hidroalcoólico de própolis (T5) e aqueles que não receberam (T1) apresentaram a menor porcentagem desse grupo leucocitário no sangue.

Orsi *et al.* (2000) indicaram que doses altas de própolis (3 a 10 mg %) incrementou a produção de monóxido de nitrogênio, apresentando efeito imunomodulador de macrófagos em ratos e doses baixas efeito imunoestimulante.

Orsolich e Basic (2003) indicaram que derivados de própolis solúveis em água apresentaram propriedades imunoestimulantes de linfócitos e macrófagos em ratos.

A mudança na composição leucocitária observada nos animais pode ser consequência de uma melhora na resposta imunológica dos mesmos após o consumo de própolis, pois, segundo Perez (1989), estudando a dose parenteral da própolis sobre a resposta imune em coelhos, observou que doses mais altas sugerem uma influência inibitória e as mais baixas mostraram melhores resultados, refletindo-se em níveis mais elevados de imunoglobulinas e anticorpos. Sforcin (1996) verificou que a atividade das células natural "killer" foi elevada nos grupos tratados com própolis, revelando sua ação imunomoduladora.

Wang e Chang (1994) obtiveram 10,67 % e Szubartowska *et al.* (1990) obtiveram 12,87 % de monócitos no sangue de *Rana esculenta* adulta, valor superior aos do presente trabalho. Ferreira (2002) obteve valores de 0,14 e 0,38 % de monócitos no sangue de girinos de rã-touro em 48 e 312 horas do período de amostragem, respectivamente. Fenerick Jr. (2004) observou no sangue de rãs-touro adultas 0,11 a 0,53 % de monócitos. Fioranelli, (2003) 2,9 % e Coopó (2003) 1,0 a 5,0 % de monócitos em *Rana catesbeiana* adulta, valores próximos aos do presente trabalho.

Conclusões

A porcentagem de monócitos no sangue periférico de girinos de rã-touro foi influenciada significativamente pela adição de extrato hidroalcoólico de própolis na

ração, apresentando possivelmente efeito imunoestimulante nas doses mais baixas (0,2 e 0,5 %).

Nos demais grupos leucocitários não houveram alterações significativas, sendo os linfócitos o grupo predominante.

Referências

BAMBOZZI. C.A. *et al.* Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *R. Bras. Zootc.* Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-17, 2004.

CANNON, S.M; *et al.* The blood leukocytes of *Bufo mrrinus* a light, phase-contrast, and histochemical study. *Can. J. Zool.*, Texas, v. 65, p. 1445-1453, 1986.

COOPO, J..A. El médio interno de la rana toro *Ranan catesbeiana*, Shaw 1802. *Rev. Vet.*, Corrientes, v. 14, n. 1, p. 25-41. 2003.

CULLEY Jr, D.D. Have use tamed the caner on bullfrog culture. *Aquarien. Maga*, Atuttgsit, v. 7, n. 3, p. 20-24, 1981.

DIAS, J.L.C. *Influência da temperatura ambiental sobre a resposta celular inflamatória e as evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã-touro gigante (*Rana catesbeiana* Shaw ,1802).* 1992. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

DUELLMAN, W.; TRUEB, L. *Biology of amphibians*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1986.

FENERICK Jr., J. *Efeito de diferentes tipos de rações comerciais sobre o desempenho e parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*.* 2004. Dissertação (Mestrado) -Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

FERREIRA, C.M. *Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802) como animais sentinelas.* 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FIORANELLI, S. et al. Los glóbulos blanco de *Rana catesbeiana* (Anfibia: Ranidae) Variación según sexo, edad, peso, crianza, alimentación y época del año. Universidad Nacional del Nordeste, corrientes Argentina, Disponível em: ([Http://www1.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.br/](http://www1.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-004.br/)). Acesso em: 16 de maio 2004.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. *Bee world*, Cardiff, v. 60, n. 1, p. 59-84, 1979.

GOSNER, K, L. A simplified table, for staging anura embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, Jonson City, v. 16, n. 2, p. 185-190, 1960.

HOLLANDS, I. et al. Demostración ultraestructural del efecto citohepatoprotector del propoleo. *Rev. Cubana Cienc. Vet.*, Habana, v. 22, n. 2, p. 85-90, 1991.

JUSTO, L.C. et al. Ganho de peso de girinos de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) em criação intensiva, sob diferentes densidades populacionais. *Bol. Inst. Pesca.*, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 31-37, 1985.

LIMA, S.L. et al. Desempenho zootécnico e tabela de alimentação de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) criados no sistema anfigranja. *R. Bras. Zootc.*, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 512-518, 2003.

ORSI, O.R. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. Botucatu, *J. Venom. Anim. Toxin*, Botucatu, v. 6, n. 2, p. 205-219, 2000.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Ethnopharmacology*, USA. v. 84, n. 2, p. 265-273. 2003.

PAULINO, N. Reação de hipersensibilidade à própolis. *Revista da Universidade de Franca*, Franca, v.7, p.16, 1999.

PEREZ, I. Influencia de las dosis parenteral de propoleo sobre la respuesta imune (RES), en conejos em 1989 In: SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1., 1988. Varadero, Matanzas. *Memórias...* Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, 1989. p.230 - 233.

PINHEIRO-FILHO, R. *Criação de abelhas*. 2. ed. Cuiabá: SEBRAE, 1998.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunas de Cananéia-SP. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 23-40. 1995.

ROITT, I. *et al. Immunology*. 5th. ed. London: Mosby, 1998.

ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clinica. Nova combinação dos componentes do May - Grunwald e do Giensa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, v. 20, p. 329-334, 1947.

SCHELLER, S. *et al.* Biological properties and clinical application of propolis. VII. Investigation of immunogenic properties of ethanol extract of propolis. *Arzneimittelforsch. drug Res.*, Aulendorf, v. 27, p. 12, 1977.

SFORCIN, J.M. Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladoras e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico dos ratos. Botucatu, SP. 1996. 56p.

Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Botucatu, 1996.

SFORCIN, J..M. et al. *Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on Bactericidal Activity of Macrophages Against Salmonella Typhimurium. Microbiol. Immunol.* Bunkajo-Ru, 2004, Disponível em: <[http:// www.immuno2004.org/onlineabstracts/982.html](http://www.immuno2004.org/onlineabstracts/982.html) >. Acesso em: 16 maio 2004.

SIWICKI, A.K. et al. Modulation of non-specific defence mechanisms and protection against diseases in fish. *Acta Vet.*, v. 67, n. 4, p. 323-328, 1998.

STORER, T.I.; USINGER, R.L. *Zoologia geral*. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1979.

SZUBARTOWSKA, E. et al. Behaviour of the Formed blood elements in *Rana esculenta L.* after repeated contact of the Animal with a Therapeutic dose of foschlor. *Bull. Environ. Contam Toxicol.*, Lublin, Poland, v. 45, n. 6, p. 796-803, 1990.

THUVANDER, A. et al. Phagocytic the blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by cytometry and electron microscopy. *J. Fish Biol*, London, v. 31, n. 2, p. 197-208, 1987.

UTNE, F. Standard methods and terminology in finfish nutrition, em 1978. In: SIMPOSIUM OF FINFISH OF NUTRITION AND FEED TECHNOLOGY, 1978, Hamburg. *Proceedings...* Hamburg: EIFAC/FAO, 1978. p.14.

WANG, J.H.; CHANG, M.H. Studies on hematology of captive bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Coa Fish.*, Jaipai, v. 46, p. 69-87. 1994.

CAPÍTULO IV

Histologia do rim, fígado e intestino de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) submetidos a dietas com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis

Normas da Revista Acta Scientiarum

Histologia do rim, fígado e intestino de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) submetidos a dietas com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis

Histology of the kidney, liver and intestine of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) submitted to diets with different concentrations of propolis hidroalcoholic extract

Luis Ricardo Romero Arauco¹, Marta Verardino De Stéfani², Laura Satiko Okada Nakaghi³

¹Centro de Aqüicultura da UNESP-CAUNESP. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14844-900

²CAUNESP, Departamento de Zootecnia, FCAV, UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

³CAUNESP, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV, UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

Titulo resumido: Histologia de vísceras de girinos de rã-touro.

Correspondência: Laura Satiko Okada Nakaghi, Centro de Aqüicultura da Unesp.

Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n – Jaboticabal – SP – Brasil – Cep

14844 -900. E-mail: laurankg@fcav.unesp.br

Resumo

Foi avaliado o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no fígado, no rim e no intestino de girinos de rã-touro no estágio 42 de Gosner (1960). Foi empregado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições. Foram utilizados 1400 girinos, no estágio 26, da tabela de Gosner (1960), distribuídos em vinte tanques experimentais. Foram misturadas à ração comerciais diferentes concentrações (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; e 1,5 %) de extrato hidroalcoólico de própolis, a qual foi fornecida quatro vezes ao dia. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. No final do experimento foram sacrificados três girinos de cada repetição e retirada amostras de rim, fígado e intestino para confecção de lâminas histológicas. As amostras foram fixadas, desidratadas, coradas com HE, analisadas, fotomicrografadas e medida a espessura do epitélio intestinal. Não foram observadas alterações histológicas no intestino, rins e fígado dos girinos. A espessura do epitélio do intestino dos girinos, não foi influenciada ($P > 0,05$) pelas concentrações de própolis.

Palavras chaves: vísceras, ranicultura, lâminas histológicas.

Abstract

The effect of the extract propolis hidroalcoholic was evaluated in the liver, kidney and intestine of bullfrog tadpoles in the apprenticeship 42 of Gosner. 1,400 tadpoles were used, in the apprenticeship 26, of the table of Gosner (1960), distributed in twenty experimental tanks. The commercial ration was mixed with propolis in the concentrations of (0.0; 0.2; 0.5; 1.0; and 1.5 %). The feeding was four times a day. In the end of the experiment three tadpoles of each repetition of the treatments and retreat were sacrificed a kidney samples, liver and intestine for you laminate histological. The samples were fastened, dehydrated, red-faced with HE, analyzed and photomicrographed and measured the thickness of the intestinal epithelium. Used a completely randomized design with five treatments and three repetitions. Histological alterations or cellular lesion of the epithelium were not observed in the intestine, kidneys and livers of the tadpoles. The thickness of the epithelium of the intestine of the tadpoles. was not altered ($P > 0,05$) for the defferent propolis concentrations.

Key words: Visceras, frogcultura, laminate histological.

Introdução

A própolis de *Apis mellifera* contém vários componentes ativos naturais que apresentam uma variedade de propriedades como: antimicrobiana (Koo *et al.*, 2000) efeito protetor contra danos induzidos por radiação (El-Chazaly e Khayyal, 1995), antimutagênica (Varanda *et al.*, 1999), antiinflamatória (Khayyal *et al.*, 1993; Ozturk *et al.*, 2000), hepatoprotetora (Mahran, *et al.*, 1996; El-Khatib, *et al.*, 2002), antitumoral (Orsolic e Basic, 2003), imunoestimulante e antiviral (Orsolic e Basic, 2003; Farré *et al.*, 2004; Orsi *et al.*, 2005). A maioria desses efeitos estão relacionadas com as propriedades antioxidantes presente na própolis (Basnet *et al.*, 1997).

Hollands *et al.* (1991) não observaram anormalidades histológicas nos diversos órgãos analisados, nem sintomas clínicos de intoxicação ou alterações no ganho de peso, sendo que os parâmetros bioquímicos: glicose, uréia e colesterol, somente a glicose apresentou uma elevação significativa nos animais que receberam álcool e extrato alcoólico de própolis.

O tipo de rim desenvolvido pelos girinos corresponde ao pronefro e está composto de nefrons e constitui a unidade funcional do rim, possui cápsula, túbulo renal e tecido hematopoiético (George e Castro, 1998).

A organização histológica básica do fígado do girino e adulto consiste em arranjo do parenquima de hepatócitos com uma superfície interna organizado em cordões contendo sinusóides e células de Kupffer. O espaço perisinusoidal é

delimitado por células endoteliais e hepatócitos. O tecido hepático não sofre mudança durante e depois da metamorfose (Viertel e Richter, 1999).

Reeder (1964) dividiu o trato digestório dos girinos em intestino anterior, médio e posterior. Este mesmo autor, citado por Dodd e Dodd (1976), estudando o desenvolvimento do aparelho digestório de *Rana temporaria*, verificaram a ocorrência de alterações anatômicas, quando este animal entrava no clímax da metamorfose.

O intestino dos girinos de *Rana catesbeiana* É composto pela mucosa, formada por epitélio pseudoestratificado com células cilíndricas com borda em escova, células caliciformes e linfócitos intraepiteliais, pela submucosa constituída por células, fibras colágenas e diversos vasos sanguíneos, camada muscular, formada por músculo liso em disposição circular e camada serosa constituída por tecido conjuntivo e células pavimentosas (Oliveira-Bahia *et al.*, 2005).

Alterações morfológicas celulares no fígado, rim e intestino podem ser provocadas por substâncias químicas e drogas as quais são importantes causas de adaptações, lesão e morte celular. Existem três tipos de adaptação celular que são: atrofia, hipertrofia e hiperplasia. Os tipos de lesões celulares são: tumefação celular, metamorfose gordurosa, necrose (coagulativa, de liquefação e caseosa) e apoptose (Kumar *et al.*, 1994).

A própolis é um produto natural, que é composto por muitas substâncias que podem ocasionar alterações nos diferentes órgãos. Portanto o objetivo foi verificar a ocorrência de possíveis alterações histológicas no rim, fígado e intestino bem como verificar a espessura do epitélio intestinal de girinos de rã-touro, submetidos a dietas com diferentes concentrações de extrato hidroalcolico de própolis.

Material e métodos

INSTALAÇÕES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP e as análises histológicas no laboratório de histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

Foram utilizados 20 tanques experimentais, com capacidade de 100 litros, preenchidos com 70 litros de água. Os tanques tinham abastecimento individual e escoamento diretamente do fundo. A água utilizada foi proveniente de poço artesiano.

Material biológico

Foram utilizados 1400 girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, com peso médio de 0,08 g no estágio 26 de Gosner (1960), procedentes de uma mesma desova, oriundos do setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP. Os animais foram distribuídos nos 20 tanques experimentais, na densidade de 1 girino/L água.

Procedência da própolis

A própolis foi adquirida da empresa Apis Flora Industrial e Comercial LTDA, localizada em Ribeirão Preto-SP.

Características do extrato hidroalcoólico de própolis

As características do extrato hidroalcoólico de própolis, fornecidas pela Apis Flora foram as seguintes:

Aspecto- líquido límpido, sem partículas em suspensão;

Cor – Âmbar;

pH - 5,35;

Teor alcoólico - 56 %;

Propriedade antioxidante - 8 segundos;

Sólidos solúveis - 11 P/V %;

Flavonóides totais - 5,45 mg/L.

Preparo e fornecimento das dietas experimentais

Para a alimentação dos girinos foi utilizada uma ração comercial, farelada (Tabela 1), na qual foram adicionadas e misturadas manualmente diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de própolis (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 %). Após esse procedimento, as rações foram secas em estufa com circulação de ar à 40 °C por 24 horas e, logo após, trituradas em liquidificador por dois minutos e estocadas em freezer.

O arraçoamento foi à lanço, de modo uniforme, quatro vezes ao dia, observando-se o consumo para evitar sobras, de forma que a quantidade oferecida fosse considerada como consumida (Utne, 1978).

Tabela 1. Composição porcentual da ração comercial (Poli peixe 450 F, em pó e peneirada em malha de 2mm).

Nutrientes	%
Proteína Bruta (PB)	45,0
Extrato etéreo (EE)	9,0
Fibra bruta (FB)	6,0
Matéria mineral (MM)	3,0
Cálcio (Ca)	8,0
Fósforo (P)	1,0
Umidade	12,5

Premix: Vitamina A 12.000,00 UI; Vitamina D3, 3.400,00 UI; Vitamina E 150,00 mg; Vitamina K, 20,00 mg; Vitamina B1 (Tiamina) 30,00 mg; Vitamina B2 (Riboflavina) 30,00 mg; Vitamina B6 (piridoxina) 30,00 mg; Vitamina b12 30,00 mg; Niacina 150,00 mg; Pantotenato de Cálcio 78,75 mg; Ácido Fólico 8,12 mg; Biotina, 0,25 mg; Vitamina C 400,00 mg; Cloreto de Colina 1,00 g; Cobre 25,00 mg; Manganês 68,75 mg; Zinco 112,50 mg; Iodo 1,25 mg; Cobalto 0,75 mg; Selênio 0,30 mg; Antioxidante 125,00 mg; Fungistático 1.000,00 mg.

Antes da alimentação diária os tanques foram limpados para a retirada dos dejetos e restos da alimentação anterior.

Avaliação da qualidade da água

No decorrer do experimento a temperatura da água dos tanques foi aferida diariamente com termômetro digital, e semanalmente realizou-se análise de água medindo-se o pH, condutividade elétrica (mediante Horiba), e oxigênio dissolvido (oxímetro Hach DO meter 16046).

Análise histológica

Ao finalizar o experimento foram sacrificados nove girinos de cada tratamento no estágio 42, da tabela de Gosner (1960), e retiradas amostra do intestino, fígado e rim. O exame foi realizado primeiramente por inspeção visual procurando alterações macroscópicas tais como: coloração e consistência dos órgãos.

Posteriormente, as amostras destes órgãos foram fixadas em solução de formol tamponado a 10 %. Após fixação, procederam-se lavagem em álcool 70º GL para desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em série de xilóis, inclusão em parafina, microtomia de 5µm e coloração pela técnica da hematoxilina–eosina (HE).

Os cortes histológicos foram analisados e fotomicrografados com fotomicroscópio Axioskop-Zeiss. Observados em microscópio de luz, observando suas estruturas e alterações microscópicas baseados em MacLachlan e Cullen (1990), Kumar *et al.*, (1994), Viertel e Richter, (1999), Hipolito *et al.* (2001) e Hipolito, (2004). Foram realizadas quatro medidas por lamina, da espessura do epitélio colunar simples do intestino dos girinos em microscópio de luz acoplado a uma ocular micrométrica e objetiva de 40x.

Delineamento experimental

Para análise dos dados da espessura do epitélio do intestino dos girinos de rã-touro foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com cinco

tratamentos (dietas com concentrações de 0,0; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 % de própolis) e três repetições.

A análise estatística dos dados, foi realizada através da análise de variância, e as medidas comparadas pelo Teste de Tukey.

Resultados e discussão

Características hidrológicas

A temperatura média da água dos tanques durante o período experimental variou de $28,27 \pm 0,45$ a $28,77 \pm 0,34$ °C. Esses valores estão dentro da faixa considerada ótima para cultivo de girinos (24,5 a 29,1 °C), segundo Justo *et al.* (1985); Lima *et al.* (2003), Bambozzi *et al.* (2004) e Hayashi *et al.* (2004).

De maneira geral os parâmetros hídricos apresentaram-se relativamente constantes nos diferentes tratamentos.

Os teores médios de oxigênio dissolvido variaram de $5,75 \pm 0,33$) a $6,06 \pm 0,67$ mg/L estando dentro do limite aceitável para o cultivo de organismos aquáticos (6,5 a 6,9) segundo Culley Jr. (1981).

Os valores médios de pH variando de $7,3 \pm 0,17$ a $7,6 \pm 0,06$, também estão próximos ao valor recomendado para o cultivo de girinos de 7,4 segundo Hayashi *et al.* (2004) e de 7,96 segundo Bambozzi *et al.* (2004).

A condutividade elétrica da água dos tanques experimentais variou de $190,2 \pm 5,52$ a $195,1 \pm 4,94$ µS/cm.

Rim

O exame macroscópico do rim de todos os girinos no experimento apresentou aparência normal, com coloração rosa vermelho e consistência firme.

Na Figuras 1 A e B observan-se que a estrutura celular do rim de girinos de rã-touro no estágio 42 de Gosner (1960), é formada por diferentes estruturas: glomérulos, cápsula de Bowman, espaço capsular, vasos sanguíneos, células sanguíneas, tecido hematopoético, eosinófilos, túbulos, nefron, folheto parietal, folheto visceral e podócitos.

No grupo de girinos controle (Figura 1 A) e no grupo tratado com 1,5 % de extrato hidroalcoólico de própolis (Figura 1 B) aparentemente mediante microscopia de luz não foram observadas alterações histológicas ou lesão celular nas diferentes estruturas no rim dos girinos no experimento.

Scheller *et al.* (1977) e Hollands *et al.* (1991) não observaram anormalidades histológicas nos diversos órgãos analisados de coelhos, chinchila e camundongos, nem sintomas clínicos de intoxicação ou alterações no ganho de peso.

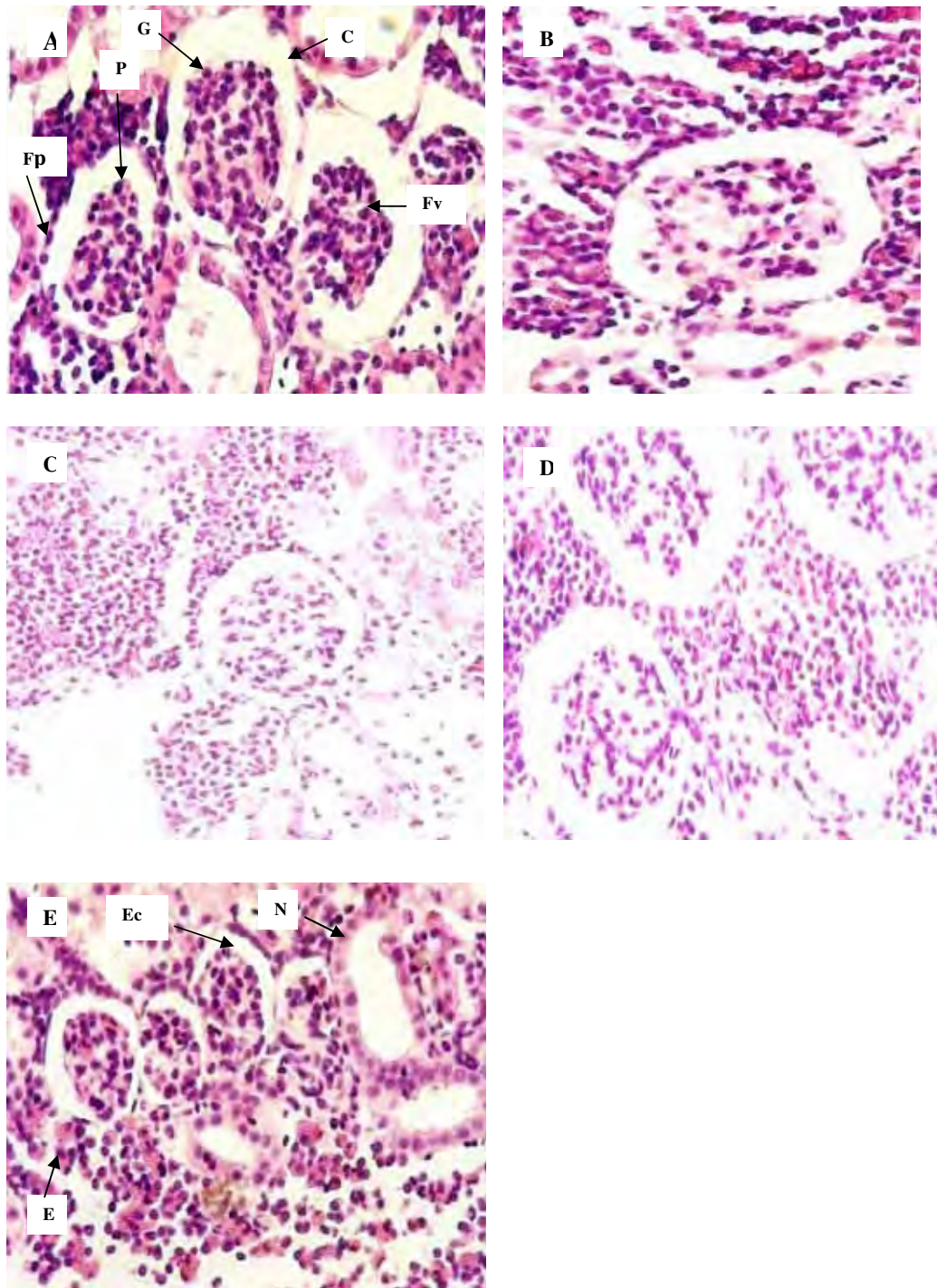


Figura 1. Fotomicrografia do rim (pronefro) de girino de *Rana catesbeina* no estágio 42 de Gosner, exposto a concentrações de própolis, A = Animais controle; B, C, D e E = Animais tratados com 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 e 1,5 % de própolis. H.E. 400 x.

G = Glomérulo, C = Cápsula de Bowman, Ec = Espaço capsular, P = Podócito, Fp = Folheto parietal, Fv = Folheto visceral, E = Eosinófilo, N = Nefron.

Fígado

Todos os girinos no experimento apresentavam fígados aparentemente normais, com coloração marrom avermelhado e consistência firme, sem lesões.

Nas amostras histológicas dos girinos do grupo controle (Figura 2 A) e tratados com extrato hidroalcoólico de própolis em suas dietas (Figura 2 B) mediante microscopia de luz observa-se: hepatócito, núcleo do hepatócito, grânulos de glicogênio, pequenos vacuólos, veia, eosinófilo, eritrócito e ductos.

Nas Figura 2 B não observou alteração ou lesão celular nos hepatócitos dos girinos, causada pelo consumo de extrato hidroalcoólico de própolis na ração.

El-Chazaly e Khayyal, (1995) demonstraram o efeito hepato protetor do extrato aquoso de própolis evitando o vasamento de citosólidos, desta maneira demonstraram a importância para a conservação da biomembrana dos hepatócitos, diminuição da peroxidação de lipídio e redução do vazamento de citosólidos.

As alterações histopatológicas observada por Hipólito (2004) no fígado de rãs-touro adultas causadas pelo consumo de alimento deteriorado e má qualidade da proteína presente na ração foram: degeneração, perda de estrutura trabecular, desorganização celular, perda de formação celular característica, núcleo deslocado, e perda de conteúdo celular normal, vacuolização celular assumindo um aspecto rendilhado, indicando uma refração celular protéica, hepatite, fígado friável, congestão sanguínea degeneração hidrópica, rarefação, degeneração celular protéica, quadro degenerativo nutricional. Em fígados pouco lesados não

foram observadas lesões histopatológicas evidente. Também observou-se que os animais sadios apresentavam fígado com descoloração, o que evidencia deficiência protéica, as amostras histológicas apresentavam aspecto trabecular dos hepatócitos, com vacuolização dos hepatócitos.

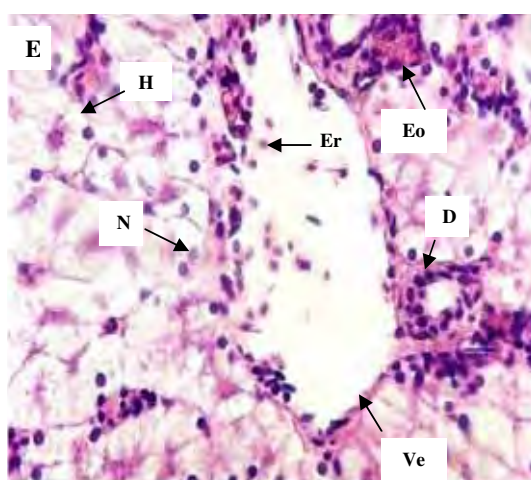
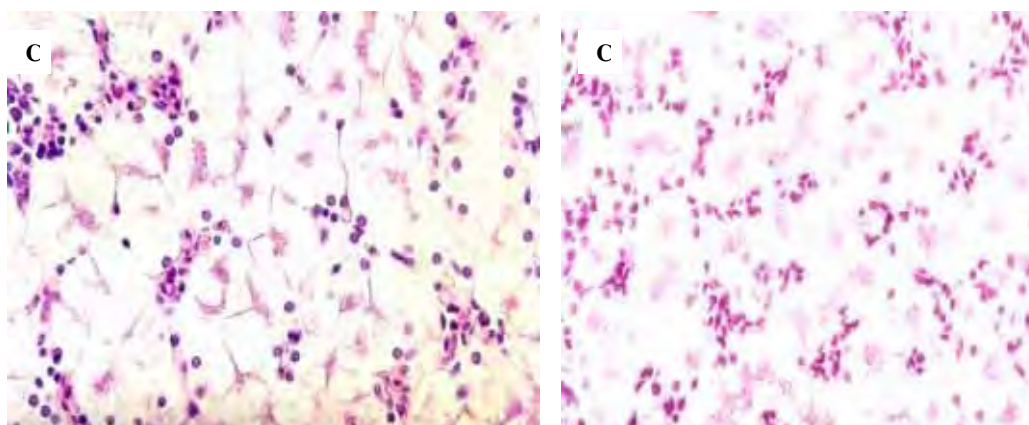
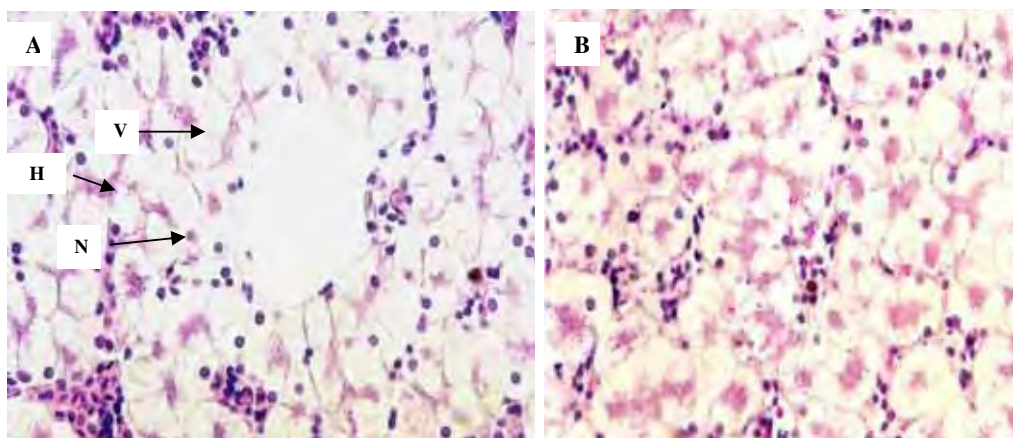


Figura 2. Fotomicrografia do fígado de girino de *Rana catesbeiana* no estágio 42 de Gosner, exposto a diferentes concentrações de própolis A = Animais controle; B, C, D e E = Animais tratados com 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 e 1,5 % de própolis. H.E. 400 x.

H = Hepatócito, N = Núcleo do hepatócito, Ve = Veia, Eo = Eosinófilo, Er = Eritrócito, D = Ducto, V = Vacúolos.

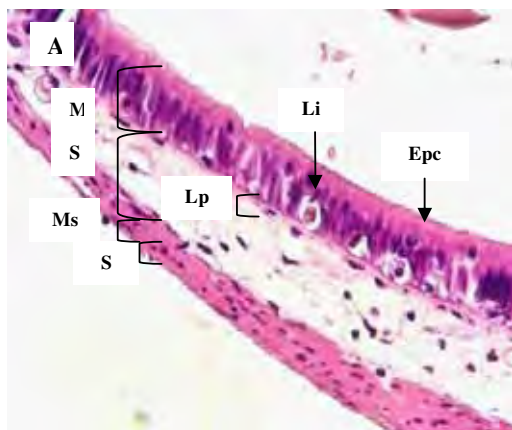
Capucho *et al.* (2005), observaram intumescência celular, pequenos vacúolos e necrose do parênquima hepático em ratos tratados com 10 mg/kg/dia de extrato de própolis.

Os hepatócitos apresentaram vacúolos e grânulos de glicogênio no grupo controle e nos tratados com própolis (Figura 2 A e B). Viertel e Richter (1999), indicaram que os hepatócitos apresentam alto conteúdo de substância nutritiva e gotas de lipídio no estágio 24 de Gosner (1960).

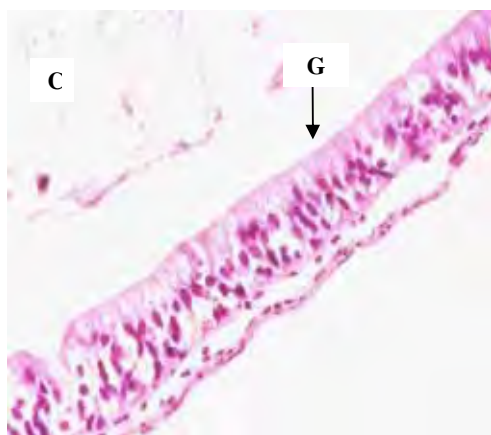
Intestino

Na Figura 3 A e B observa-se que a estrutura morfológica do intestino dos girinos de *Rana catesbeiana* no estágio 42 de Gosner, está composta pela mucosa constituída por epitélio colunar simples com células cilíndricas com borda em escova, células caliciformes e linfócitos intraepiteliais, submucosa formada por células, fibras colágenas e diversos vasos sanguíneos, camada muscular de músculo liso em disposição circular e a camada serosa, constituída por tecido conjuntivo e células pavimentosas.

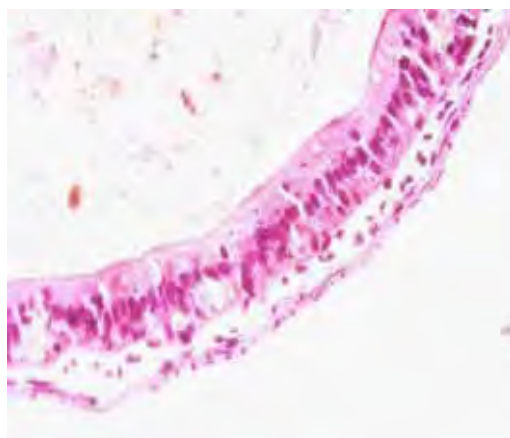
Na Figura 3 B dos girinos tratados com 1,5 % de própolis não observou-se adaptação, alteração, ou lesão celular do intestino dos girinos no experimento.



B



D



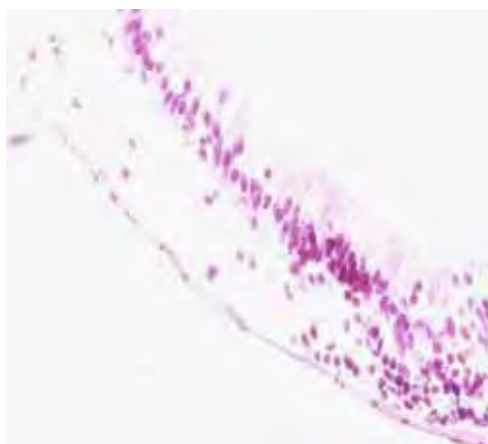


Figura 3. Fotomicrografia do intestino de girino de *Rana catesbeiana* no estágio 42 de Gosner, expostos a diferentes concentrações de própolis, A = Animais controle; B, C, D e E = Animais tratados com 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 e 1,5 % de própolis. Corados com H.E. 400 x.

Epc = Epitélio colunar simples, Li = Linfócito intra epiteliais, Lp = Lamina própria, M = Mucosa, Sm = Submucosa, Ms = Muscular, S = Serosa, G = Gandula caliciforme, V = Vaso.

A análise estatística da espessura do epitélio colunar simples do intestino dos girinos de rã-touro encontra-se na Tabela 2. Pode-se observar que as diferentes concentrações da própolis não alteraram ($P > 0,05$) a espessura do epitélio no intestino de girinos de rã-touro.

Na literatura consultada não foram encontrados dados referentes à espessura do epitélio intestinal em anfíbios para a comparação com os resultados obtidos.

Tabela 2. Valores de (F), coeficiente de variação (CV) e médias do espessura do epitélio intestinal (μm) dos girinos de rã-touro nos tratamentos com extrato hidroalcolico de própolis.

		Espessura do epitélio intestinal (μm)
F para Tratamentos		2,29 ^{NS}
CV (%)		4,33
Médias	T1 (0,0)	40,66
	T2 (0,2)	43,33
	T3 (0,5)	42,66
	T4 (1,0)	40,00
	T5 (1,5)	40,00

^{NS} - não significativo.

T5 = 0,0 % de própolis; T2 = 0,2 % de própolis; T3 = 0,5 % de própolis ; T4= 1,0% de própolis ;T5 = 1,5 % de própolis.

Hipólito (2004) observou alterações histopatológicas do intestino de rã-touro adulta por intoxicação nutricional com deficiência protéica. Essas alterações eram descamações e atrofia das vilosidades do epitélio no intestino, o qual não foi observado nas amostras do epitélio intestinal dos girinos no experimento.

Conclusão

Mediante microscopia de luz não observaram-se alterações ou lesão celular do epitélio do intestino, rins e fígado e nem alteração da espessura do epitélio do intestino de girinos de rã-touro submetidos a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis.

Referências

BAMBOZZI, C.A. *et al.* Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *R. Bras. Zootc.* Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-17, 2004.

BASNET, P. *et al.* Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch*, Juebingen, v. 52, n. 1, p. 828-855, 1997.

CAPUCHO, C. *et al.* Efect of the própolis in wistar rats liver. *J. Brás. Morphol. Sci.-Supp.*, São Paulo, p. 100, 2005.

CULLEY Jr, D.D. Have we turnet the corner on bullfrog culture. *Aquacult. Maga.* Stuttgart, USA., v. 7, n. 3, p. 20-24, 1981.

DODD, M. H. I.; DODD, J. M. The biology of metamorfhosis In: LOFTS, B. *Physiology of the amphibian*. New York: Academic Perss, 1976. cap. 2, p. 467-599.

EL-CHAZALY, M.A.; KHAYYAL M.T. The use of aqueous propolis extract against radiation-induced damage. *Drugs Exp. Clin. Res.* Carange-Genova, v. 21, p. 229-236, 1995.

EL-KHATIB, A. S. et al. Prophylactic Effect of Aqueous Propolis Extrat against Acute Experimental Hepatotoxicity in vivo. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Cairo University, *Z. Naturforsch*, Juebingen, v. 57, n, 1, p. 379-385, 2002.

FARRÉ, R. et al. El Própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, Valencia, v. 45, n. 1, p. 21-43, 2004.

GEORGE, L.L.; CASTRO, R.R. *Histologia comparada*. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, 1998.

GOSNER, K.L. A simplified table, for staging anura embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, Jonson City, v. 16, n. 2, p. 183-190, 1960.

HAYASHI. C. et al. Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanque-rede. *R. Bras. Zootc.* Viçosa, v. 33, n. 1, p. 14-20, 2004.

HIPOLITO, M. *Avaliação bioquímica no desenvolvimento da rã-touro Rana catesbeiana (Shaw, 1802) tratada com dietas comerciais e experimental*. 2004. Tese (Doutorado) Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

HIPOLITO, M. et al. Lesões anatômo-histopatológicas em rãs-touro (*Rana catesbeiana*, shaw, 1802) associadas à deterioração da ração. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 111-114, 2001.

HOLLANDS, I. et al. Demostración ultraestructural del efecto citohepatoprotector del propoleo. *Rev. cubana de Cienc. Vet*, Habana, v. 22, p. 85-90, 1991.

JUSTO, L.C. *et al.* Ganho de peso de girinos de (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) em criação intensiva, sob diferentes densidades populacionais. *Bol. Inst. Pesca.*, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 31-37, 1985.

KHAYYAL, M.T. *et al.* Mechanisms in the anti-inflammatory, effect of propolis extract. *Drugs Exp. Clin. Res.*, Caronge-Genova, v. 19, n. 5, p. 197-203, 1993.

KOO, H. *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis and Amrnica Montana against oral pathogens. *Arch. Oral Biol*, Kiddinton, v. 45, n. 2, p. 141-148, 2000.

KUMAR, V. *et al.* *Patologia básica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

LIMA, S.L. *et al.* Desempenho zootécnico e tabela de alimentação de girinos de ratouro (*Rana catesbeiana*) criados no sistema anfigranja. *R. Bras. Zootc.*, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 512-518, 2003.

MacLACHLAN, N.J.; CULLEN, J.M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exocrino. In: THOMSON, R. G. *Patologia veterinária especial*. São Paulo: Manole, 1990. p. 265-307.

MAHRAN L. G. *et al.* The protective effect of aqueous propolis extract on isolated rat hepatocytes against carbon tetrachloride toxicity. *Drugs exp. Clin. Res.*, Carange-Genova, v. 22, p. 309-316. 1996.

OLIVEIRA-BAHIA, *et al.* Development of the gastroenteric rejion in *catesbeiana* during the metamorphosis prosess. *Braz. J. Morphol. Sci.*, São Paulo, v. 22, Suppl., p. 158-159, 2005.

ORSI, O.R. *et al.* Effect of brazilian and bulgarian própolis on bactecidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. *Internat. Immunopharmac.*, USA., v. 5, n. 2. p. 359-368, 2005.

ORSOLIC, N. e BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Ethnopharmacology*, USA. v. 84, n. 2, p. 265-273. 2003.

OZTURK, F. *et al.* The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Res.*, Turkey, v. 32, p. 13-18. 2000.

REEDER, W.G. The digestive system. In: MOORE, J. A. *Physiology of amphibian*. New York: Academic Press, 1964. p. 99-150.

SCHELLER, S. *et al.* Biological properties and clinical application of propolis. VII. Investigation of immunogenic properties of ethanol extract of propolis. *Arzneimi-Forsch. drug Res.*, Aulendorf, v. 27, p. 12, 1977.

UTNE, F. Standart methods and therminology in finfish nutrition, em 1978. In: SIMPOSIUM OF FINFISH OF NUTRITION AND FEED TECHNOLOGY, 1978, Hamburg. *Proceedings...*Hamburg: EIFAC/FAO, 1978. p.14.

VARANDA E.A. *et al.* Inhivitory effect of propolis and bee venom on the mutegenicity of some direct and indirect-acting mutagens. *Teratog Carcinog Mutagen.*, New York, v.19, n. 6, p. 403-413. 1999.

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy Viscera and Endocrines In: Tadpoles the biology of anuran larvae. In: McDIARMID, R. W. ALTING, R. *Tadpoles the biology of anuran larvae*. Chicago: University of Chicago, 1999, cap. 5. p. 92- 38. 1999.

CAPÍTULO V

Conclusões gerais

Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

Conclusão geral

Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

Torna-se necessário o desenvolvimento de futuros ensaios, testando outros níveis de própolis para observação de seu efeito bactericida e/ou bacteriostático, bem como a realização de uma análise econômica para observar se há viabilidade do seu uso na ricultura comercial.