

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

NEIDISON CARNEIRO COLOMBANO

**SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM VITAMINA C E
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO
(*Rana catesbeiana*)**

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2005

NEIDISON CARNEIRO COLOMBANO

SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM VITAMINA C E
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO
(*Rana catesbeiana*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

Área de concentração: Patologia de Organismos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Ruas de Moraes

Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Verardino de Stéfani

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2005

C71
8s

Colombano, Neidison Carneiro
Suplementação alimentar com vitamina C e desempenho zootécnico de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) / Neidison Carneiro Colombano. --Jaboticabal, 2005
ii, 38 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2005
Orientador: Flávio Ruas de Moraes
Banca examinadora: João Batista Kochenborger Fernandes,
Maurício Laterça Martins
Bibliografia

1. *Rana catesbeiana*. 2. Desempenho zootécnico. 3. Vitamina C.
I. Título. II. Jaboticabal - Centro de Aqüicultura.

CDU 597.82:577.16

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

Ofereço

A Deus por estar comigo em todos os momentos;

À minha mãe e sem dúvida, ao meu pai "*in memoriam*"

Pela educação e pelo apoio em cada passo de minha vida,

Sempre que precisei...

Dedico

A minha querida filha Isabella e a Andressa,

Aos meus irmãos Nelson e Nelisa,

A todos os meus parentes, por terem me

proporcionado momentos inesquecíveis.

Agradecimentos

- Ao meu estimado orientador Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes e a Profa. Dra. Marta Verardino de Stéfani, pelas lições de vida e sábias orientações.
- Ao Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp), Campus de Jaboticabal.
- Ao Prof. Dr. Maurício Laterça Martins pelos ensinamentos e contribuições profissionais e principalmente pessoais.
- A todos os professores do Caunesp, que não negaram esforços e dedicação para a plenitude de minha formação.
- Aos colegas do Caunesp, pelas amizades, sugestões e companheirismo.
- Aos meus amigos pelo carinho e amor.
- A todos aqueles que por meio de suas críticas, contribuíram para meu aprimoramento humano.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

| | |
|---|-----------|
| Considerações Gerais..... | 1 |
| Referências..... | 13 |
| Capítulo II: SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM VITAMINA C E DESEMPENHO ZOTÉCNICO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (<i>Rana catesbeiana</i>)..... | 20 |
| Resumo..... | 21 |
| Abstract..... | 22 |
| Introdução..... | 23 |
| Material e Métodos..... | 24 |
| Resultados e discussão..... | 26 |
| Referências..... | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | Fórmula e composição calculada das dietas experimentais.... | 36 |
| TABELA 2 | Valores de F, Coeficiente de Variação (CV) e médias obtidas na análise da variância para porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos (%IM) e porcentagem de sobrevivência (%SOB)..... | 37 |
| TABELA 3 | Valores de F, Coeficiente de Variação (CV) e médias obtidas na análise da variância para Ganho de peso e Taxa de crescimento específico..... | 37 |
| TABELA 4 | Valores de F, Coeficiente de Variação (CV) e médias obtidas na análise da variância para características hematológicas dos girinos..... | 38 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | Peso médio de girinos de <i>Rana catesbeiana</i> e temperatura da água nos diferentes tratamentos em função do tempo ($T_0 = RC$; $T_1 = RC + 1.000\text{mg vit C kg}^{-1}$; $T_{1,5} = RC + 1.500\text{mg vit C kg}^{-1}$ e $T_2 = RC + 2.000\text{mg vit C kg}^{-1}$)..... | 38 |
|----------|--|----|

Capítulo I

Considerações Gerais

A aqüicultura é uma atividade em franca expansão que conta com diversos segmentos de produção, entre eles a ranicultura. Segundo FUGLER (1985) muitas espécies de anfíbios e quelônios são utilizadas como fonte de proteína para a população humana principalmente em países tropicais e seu consumo está inserido como iguaria na culinária de países desenvolvidos.

No Brasil a ranicultura iniciou-se na década de 30 com a introdução da rã-touro (*Rana catesbeiana*), no Rio de Janeiro. Entretanto, somente a partir da década de 80 desenvolveu-se e foram aplicadas modernas tecnologias, particularmente no que tange às instalações e alimentação (LIMA e AGOSTINHO, 1992).

Em 1998 o comércio internacional de coxas de rã envolveu mais de 30 países, principalmente os em desenvolvimento e os asiáticos sendo avaliado em aproximadamente US\$ 48,7 milhões (TEIXEIRA et al., 2001). Entretanto, a produção na maioria destes países é extrativista causando preocupação quanto à possibilidade da escassez de várias espécies de rãs em ambiente natural. Sendo assim, é grande o esforço atual no sentido da produção em larga escala de rãs em cativeiro, permitindo melhor controle de qualidade e de sanidade (FUGLER, 1985; TEIXEIRA et al., 2001).

Os sistemas de criação de rãs atualmente utilizados são o sistema inundado, de confinamento e anfigranja (LIMA et al, 1999). Atualmente o Brasil conta com cerca de 600 ranários em atividade sendo a maioria em sistema anfigranja (acima de 55%).

Embora o número de ranários seja inferior ao de 1988, a produção atual de carne é superior, sendo reflexo da melhoria tecnológica dos ranários neste período (FEIX et al., 2005).

Produção

O Brasil detém boa tecnologia de produção de rã-touro em cativeiro e é um dos maiores produtores mundiais. Tal fato ocorre porque a criação em países de clima frio apresenta entressafra reprodutiva mais acentuada comparando-se às regiões tropicais, acarretando diferenças marcantes na produção em cativeiro (PRIM et al., 2003).

O desenvolvimento da ranicultura no Brasil apresenta limitações como a escassez de informações técnicas para o manejo na fase de girinos, a qual determina a boa produção de imagos em qualidade e quantidade (HAYASHI et al., 2004). Nesta fase se o manejo for inadequado haverá a falta de regularidade na oferta e desuniformidade de tamanho dos animais comercializados (LIMA et al., 1999).

O mercado interno vem apresentando aumento significativo em relação à produção mundial. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) a produção nacional aumentou de 29 toneladas/ano em 1988, para 635 toneladas em 2001, (FAO, 2005). Segundo a estatística deste mesmo órgão, a produção média mundial de carne de rã no período de 1988-2001 situou-se em torno de 5.500 toneladas anuais (crescimento de 13%), enquanto que o Brasil no mesmo período superou o crescimento de 2.600 %, demonstrando o aumento da participação nacional no total da produção mundial de carne de rã. Em contrapartida a participação do Brasil na exportação de coxas de rã ainda é pequena, pois o primeiro registro desta atividade ocorreu em 1998. Exportou até 2004 apenas 2,6 toneladas de coxas de rãs frescas, resfriadas ou congeladas (FEIX et al., 2005).

O Brasil destaca-se nesse cenário graças à sua produção racional em cativeiro, ao contrário dos países asiáticos que se concentram no extrativismo, ocasionando redução dos estoques naturais devido à não sustentabilidade do setor (FUGLER, 1985; TEIXEIRA et. al. 2001).

Além da carne outros sub-produtos vem se destacando como economicamente viáveis como aproveitamento do óleo, do fígado e da pele. As propriedades do óleo de rã estão sendo estudadas, com resultados favoráveis para sua utilização pela indústria de cosméticos, enquanto que o fígado é utilizado para a produção de patês. Já a pele pode ser utilizada na indústria farmacêutica e de vestuário (FEIX et al., 2005).

Em contraste ao aumento da produção nacional de rãs, o aumento do consumo desta carne ainda não é expressivo para acompanhar a produção nacional. O consumo total representou em 2001 cinco gramas “per capita”, enquanto que o consumo de carne bovina superou 36,0 kg (LIMA et al., 1999; FEIX et al., 2005).

O baixo consumo de carne de rã é atribuído, principalmente, ao elevado preço de comercialização que atingiu no varejo R\$ 30,00/kg no ano de 2002. Além disso, a irregularidade da oferta do produto nos pontos de venda e a reduzida divulgação aos consumidores colaboram para o baixo consumo. Todavia, a procura por alimentos saudáveis e os avanços da ricultura contribuem para o aumento do consumo, havendo boa perspectiva de mercado (FEIX et al., 2005).

Vitaminas

A alimentação é um dos fatores limitantes na criação de rãs. Apesar das rações serem amplamente utilizadas, seu custo é alto e as exigências nutricionais da rã-touro ainda são desconhecidas. Assim técnicos e produtores lançam mão da utilização inadequada de rações para peixes carnívoros (SILVA, 1988; SEIXAS FILHO et al.,

1998). Isto ocorre porque ainda não se dispõe de informações suficientes sobre as necessidades nutricionais de rãs (STÉFANI, 2001).

As vitaminas são compostos orgânicos distintos das gorduras, carboidratos e proteínas. Estão presentes em pequenas quantidades nos alimentos e são essenciais para a manutenção das funções fisiológicas. Sua ausência ou sub-utilização ocasiona síndrome de deficiência específica sendo necessária uma fonte exógena, freqüentemente adicionada à dieta (LOVELL, 1988; COMBS, 1992; ALMEIDA, 2003).

No entanto várias espécies animais são capazes de sintetizar vitaminas de acordo com suas necessidades metabólicas, como é o caso do ácido ascórbico. Apenas o homem, o porco da índia e alguns peixes não o sintetizam por não possuírem a enzima l-gulonolactona oxidase, necessária na fase final de síntese (COMBS, 1992; ROTTA, 2003).

As exigências em vitaminas são afetadas por fatores como espécie, tamanho corporal, taxa de crescimento, composição da dieta, interações entre os nutrientes, capacidade de síntese por microrganismos no trato gastrointestinal, presença de compostos precursores na dieta, condições ambientais (temperatura, presença de compostos tóxicos, fatores estressantes e patógenos) e sistemas de produção (ALMEIDA, 2003).

As vitaminas são divididas em lipossolúveis e hidrossolúveis, sendo as primeiras absorvidas em tecidos ricos em lipídios (tecido adiposo e fígado) tornando possível a sua liberação conforme a necessidade do animal, ou seja, quando a dieta apresenta baixa concentração destas vitaminas (COMBS, 1992). Quando em excesso são armazenadas no tecido adiposo, podendo atingir níveis tóxicos caracterizando as hipervitaminoses (CYRINO et al., 2004).

As vitaminas lipossolúveis diferentemente das hidrossolúveis apresentam características em comum, pois em cada uma delas encontram-se cinco unidades de carbono isoprenoide derivadas do acetil-CoA daquelas plantas e/ou animais capazes de sintetizá-las (COMBS, 1992).

As vitaminas hidrossolúveis não são armazenadas no organismo em grande quantidade, sendo excretadas rapidamente, com exceção da vitamina B₁₂. Esta sob circunstâncias normais pode ser acumulada no fígado em quantidade adequada para satisfazer as necessidades nutricionais do hospedeiro por até anos. As vitaminas hidrossolúveis apresentam pouca similaridade entre si, pois sua biosíntese, nas espécies capazes de sintetizá-las, não compartilham as mesmas vias metabólicas, ou seja, cada espécie sintetiza a vitamina de uma forma (COMBS, 1992). O fato destas vitaminas não serem armazenadas em grande quantidade torna necessário seu fornecimento constante por meio da dieta, visando a garantia do desenvolvimento do animal (LOVELL, 1988; COMBS, 1992; ALMEIDA, 2003; CYRINO et al. 2004).

As doenças associadas às deficiências de vitaminas representam manifestações clínicas resultantes de perturbações bioquímicas, iniciadas nas subestruturas celulares. Assim, os sinais clínicos de hipovitaminoses ocorrem por meio de uma cadeia de eventos que se inicia com a diminuição do conteúdo vitamínico nas células e tecidos (COMBS, 1992).

Muitos sinais clínicos de deficiência de vitaminas são descritos em peixes e estão relacionados à alterações pouco específicas, como redução do apetite, menor taxa de crescimento, anemia, letargia, pigmentação anormal e maior suscetibilidade a doenças (ALMEIDA, 2003).

A deficiência de algumas vitaminas causa alterações específicas em peixes. No caso da vitamina A causa alterações de visão e no epitélio; a de vitamina K produz hemorragias; a de niacina, espasmos e fraquezas e a de vitamina C deformidades estruturais (LOVELL, 1988; COMBS, 1992; ALMEIDA, 2003; CYRINO et al., 2004).

HALVER et al. (1975) sugeriu a lordose, escoliose, letargia, exoftalmia hemorrágica, ascite, anemia, hemorragia intramuscular e outros sinais de escorbuto como resultado da insuficiência de ácido ascórbico em peixes. Esta mesma vitamina é necessária na dieta de girinos visando à redução de mortalidade e deformações estruturais. Porém pouco se conhece sobre seus efeitos e exigências para estes animais (LEIBOVITZ et al., 1982; STÉFANI et al., 2001).

Vitamina C

A vitamina C é a descrição genérica para todos os compostos que exibem qualitativamente a atividade biológica do ácido ascórbico. Os termos ácido l-ascórbico e ácido ascórbico são designações para o composto 2,3-dideidro-l-tetra-hexano-1,4-lactona, o qual forma o conhecido ácido hexurônico. A forma oxidada é chamada ácido l-deidroascórbico ou ácido deidroascórbico (COMBS, 1992).

A forma reduzida é a mais abundante na natureza, mas as duas são biologicamente reversíveis. O ácido l-ascórbico é a forma biológica mais ativa da vitamina C, é solúvel em água, termolábil e facilmente oxidado para a forma inativa, o ácido dicetogulônico, durante o processamento e estocagem de rações, principalmente na presença de cobre e de íons de metais pesados (LOVELL, 1988; HALVER, 1989; CYRINO et al., 2004).

Para evitar perdas da forma ativa do ácido ascórbico, o alimento deve ser protegido contra a oxidação aeróbica e qualquer alimento úmido deve ser

cuidadosamente protegido de agentes oxidantes, como ar, ferro, cobre e outros metais que catalisam a oxidação do ácido ascórbico para formas biologicamente inativas (HALVER, 1989).

O transporte do ácido ascórbico pelo organismo se dá livremente pelo plasma (COMBS, 1992), mas é dependente de sódio (Na^+) a partir do mecanismo de osmorregulação. Ou seja, o sódio funciona como transportador do ácido ascórbico para sua entrada na célula. Não há gasto direto de energia, mas há a dependência da bomba de Na^+/K^+ , que cria um gradiente de sódio favorável à sua entrada no enterócito. Assim o ácido ascórbico na sua forma reduzida passa por difusão do interior do enterócito para os capilares sanguíneos existentes nas dobras intestinais (ROSE e CHOI, 1990; VERLHAC e GABAUDAN, 1998; BALDISSEROTTO, 2002; ROTTA, 2003).

O número de transportadores específicos de vitamina C na mucosa intestinal é substrato dependente, isto é, quanto maior a suplementação mais eficiente será a absorção (ROTTA, 2003).

Muitos organismos são capazes de sintetizar o ácido ascórbico, principalmente as plantas. No entanto, durante o processo evolutivo a partir do aumento do oxigênio na atmosfera houve a perda do gene para a formação da enzima l-gulonolactona nos organismos mais modernos (NANDI et al. 1997). Assim não são capazes de sintetizar o ácido ascórbico, devido ao fato desta enzima ser a responsável pela rota final da via de síntese deste ácido (LOVELL, 1988; COMBS, 1992; NANDI et al., 1997; ROTTA, 2003; ALMEIDA 2003; CYRINO et al. 2004).

NANDI et al., (1997) estudaram a manifestação do gene da enzima l-gulonolactona oxidase em peixes, anfíbios, répteis, mamíferos, mamíferos voadores e primatas. Observaram que quanto mais recente a posição filogenética do organismo

menor é a manifestação do gene, até que este se torna ausente em alguns animais, como é o caso de alguns peixes, humanos, macacos, mamíferos voadores e cobaias. A supressão deste gene é explicada pelo aumento de oxigênio na atmosfera porque a enzima l-gulonolactona é facilmente oxidada.

FRACALOSSI et al., (2001) estudaram a atividade da enzima l-gulonolactona oxidase no fígado e rim de 13 espécies de peixes, incluindo 11 teleósteos, e verificaram que não há atividade desta enzima nos peixes teleósteos. Porém nos demais estudos (Lepidosireniformes e Miliobatiformes) a enzima encontra-se ativa, mas, como em ambiente natural a dieta é farta em ácido ascórbico, a sua síntese nos animais referidos, em cativeiro, torna-se insuficiente, com necessidade da suplementação de vitamina C na dieta (NANDI et al., 1997; FRACALOSSI et al., 2001). Nos anfíbios esta enzima está presente, porém não sintetiza o ácido ascórbico em quantidades ideais para a manutenção das funções fisiológicas (NANDI et al., 1997).

Suplementação de vitamina C em dietas para peixes

O ácido ascórbico é essencial para os peixes, já que a maioria não é capaz de sintetizá-lo pela ausência da enzima l-gulonolactona oxidase a qual possibilita sua síntese a partir da glicose (STEFFENS, 1989; NRC 1993; TOUHATA et al., 1995; LOVELL, 1998; MELLO et al., 1999; FRACALOSSI et al., 2001; BARROS et al., 2002; CHAGAS e VAL, 2003; CYRINO et al., 2004).

A função da vitamina C em peixes de água doce é a de cofator de várias reações de hidroxilação, sendo importante na manutenção do tecido conectivo e ósseo, juntamente com a vitamina E, previne a oxidação de lipídeos da dieta e dos tecidos corporais e participa do metabolismo do ferro (CYRINO et al., 2004). Sua participação no metabolismo do ferro se dá pelo fato de o ácido ascórbico participar da conversão do

ferro da transferrina da forma oxidada para a forma reduzida favorecendo o seu transporte pelo organismo e sua absorção gástrica pela redução do ferro para o estado ferroso ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) prevenindo a anemia (LOVELL, 1988). Outra função é a de agente redutor nos processos de detoxificação pelo fígado (ROTTA, 2003).

A vitamina C é essencial para a síntese de colágeno, formação de cartilagem, ossos e dentes, nos processos de reparação tecidual (HALVER, 1989; TACON, 1991; NRC 1993; LOVELL, 1998; MORAES et al., 2003). Participa do crescimento animal, reprodução, redução dos efeitos nocivos do estresse, na ativação da vitamina D, redutor no transporte de hidrogênio, desintoxicação por drogas aromáticas, produção de esteróides adrenais e principalmente no sistema imune (ROTTA, 2003; CYRINO et al., 2004).

O nível de inclusão de vitamina C deve considerar o ingrediente a ser utilizado, bem como as interações e perdas no processamento e estocagem (CYRINO et al., 2004). Geralmente níveis baixos ou mínimos são suficientes para o bom crescimento e conversão alimentar que satisfazem a criação comercial. Entretanto, para a resposta adaptativa máxima como resistência às doenças e tolerância ao estresse ambiental são necessárias concentrações elevadas. LIM e LOVELL (1978); LI e LOVELL (1985) observaram que 30 a 60mg de vit C kg^{-1} de ração foram suficientes para evitar o aparecimento de sinais clínicos de deficiência em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*).

As exigências nutricionais de peixes com relação à vitamina C são influenciadas por fatores como idade, tamanho, estado reprodutivo, estresse, entre outros (HALVER, 1995; NRC, 1993). A carência desta vitamina na dieta causa sinais como anemia, hemorragias, deformidade espinhal, opérculo diminuído, exoftalmia e erosão da nadadeira caudal (HALVER, 1995; SOLIMAN et al., 1986a).

A carência de vitamina C em larvas de tilápia mossambica (*Oreochromis mossambicus*), piora a conversão alimentar com redução no crescimento, causa deformação esquelética devido a danos na coluna vertebral (SOLIMAN et al., 1986b) e pigmentação escura da pele e perda de equilíbrio (LIN e SHIAU, 2004). Tais deformidades podem não ocorrer na tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) carentes de vitamina C, mas a concentração de colágeno na coluna é proporcional à concentração de ácido ascórbico da dieta (SHIAU e HSU, 1995). Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas desprovidas de ácido ascórbico exibiram baixa taxa de crescimento, baixos índices de utilização de proteína, reduzida digestibilidade aparente da matéria seca (MS), elevados níveis de umidade e baixos níveis de cinzas e proteínas na carcaça (SOLIMAN et al., 1994).

A suplementação com vitamina C para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) não demonstrou diferença significativa em relação ao ganho de peso, porém a análise de regressão demonstrou tendência ao aumento de peso dos animais suplementados. Não foram encontradas deformidades, tanto nos peixes suplementados com vitamina C quanto nos alimentados com dietas sem a adição desta vitamina (ALMEIDA, 2003). Já FUJIMOTO, 2001 revelou que ocorrências de deformidades evidenciaram a eficácia de suplementação de vitamina C em pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). Onde animais não suplementados com a vitamina tiveram maiores índices de deformidades como deslocamento de boca e fragilidade e também entortamento de nadadeiras.

EMATA et al. (2000) suplementaram *Chanos chanos* com vitaminas C e E e verificaram melhora na qualidade e viabilidade dos ovos mas não na sua produção. Os peixes não suplementados produziram maior número de ovos (23,21 milhões) em 31 ovulações. Com a suplementação das vitaminas houve maior número de ovulações

(36), mas a produção de ovos foi de 21, 51 milhões. A menor produção de ovos (6,53 milhões) e de ovulações (6) se deu nos animais alimentados somente com vitamina E. O maior número de ovos viáveis foi encontrado nos animais alimentados somente com vitamina C.

MARTINS (1998) investigou o efeito da suplementação com ácido ascórbico na dieta para pacu (*P. mesopotamicus*) sobre a infestação de monogenea (*Anacanthorus penilabiatus*). Os pacus alimentados com dietas enriquecidas com vitamina C apresentaram menor índice de parasitismo em relação aos grupos não suplementados.

Larvas de carpas alimentadas com zooplâncton enriquecido de ácido ascórbico apresentaram maior crescimento e maior taxa de sobrevivência (90%), definindo que os requisitos de vitamina C na dieta encontram-se em torno de $1.209 \mu\text{g vit C g}^{-1}$ da dieta seca (MITRA e MUKLOPADHYAY, 2003).

HALVER et al. (1969) verificaram que superdoses de vitamina C em salmão prateado (400 mg kg^{-1} de ração) proporcionou máxima taxa de cicatrização. De acordo com MORAES et al. (2003) $100, 200$ e 500 mg kg^{-1} foram suficientes para acelerar a cicatrização de feridas, o aumento da proliferação de células mucosas, o acúmulo de colágeno, a remodelação tecidual e a formação de escamas com redução proporcional da área lesada em peixe.

Pacus (*P. mesopotamicus*) alimentados com dieta suplementada com vitamina C (500 mg kg^{-1}) apresentaram aumento do acúmulo de macrófagos e a formação de células gigantes em lamínulas de vidro implantadas no tecido sub-cutâneo (PETRIC et al., 2003) mesmo em peixes mantidos em densidade elevada (20 kg/m^3) uma vez que houve diminuição da concentração de cortisol circulante (BRUM, 2003).

Suplementação de vitamina C em dietas para anuros

NANDI et al. (1997) observaram que diferentemente dos peixes, os anfíbios apresentam a enzima l-gulonolactona sendo capazes de sintetizar o ácido ascórbico. No entanto essa produção é insuficiente para as suas necessidades em cativeiro, fazendo-se necessária a suplementação na dieta.

No caso da vitamina C, assim como em peixes, esta participa da formação dos tecidos ósseo e cartilaginoso, sendo responsável pela melhoria no crescimento. Sua carência ocasiona deformações ósseas, hemorragias, falta de apetite, aumento dos efeitos negativos do estresse e (STÉFANI et al., 2001), deformações na cauda (LEIBOVITZ et al., 1982). Estes últimos autores, não observaram diferenças significativas na taxa de sobrevivência de girinos de rã-touro alimentados com dietas suplementadas com vitamina C.

Estudando o efeito da suplementação de vitamina C e E na dieta de girinos de rã-touro, STÉFANI et al. (2001) verificaram diferença em ganho de peso aos animais que receberam 50, 250 e 500 mg vit.C kg⁻¹ e 50, 250 e 500 mg vit. E kg⁻¹. Mas a taxa de sobrevivência dos animais suplementados com 500 mg vit. C kg⁻¹ foi significativamente maior do que do grupo controle (62,83% e 40,48% respectivamente). A vitamina E não influenciou o ganho de peso e a taxa de sobrevivência.

Assim a nutrição de rãs sofre grande carência de conhecimentos, tornando necessário o estudo da suplementação dietética com vitaminas e minerais, visando à melhoria no desempenho e redução no custo de produção. E então o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da suplementação com vitamina C no desempenho de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.S.C. **Suplementação dietética de vitamina C, desenvolvimento e sanidade do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**. 2003. 47f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

BALDISSEROTTO, B. Digestão. In: BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002, p. 19-39.

BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; KLEEMANN, G, K. Levels of vitamin C e iron for nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2149-2156, 2002.

BRUM, C.D. **Vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 mantidos em diferentes densidades**. 2003. 58 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 2003.

CHAGAS, E.C.; VAL, A. L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, 9p, 2003.

COMBS, G.F. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition e health**. New York: Academic Press, 1992. 526p.

CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos em Piscicultura de água doce Tropical Intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. 533p.

EMATA, A.C.; BORLONGAN, I.G.; DAMASO, J.P. Dietary vitamin C e E supplementation e reproduction of milk fish (*Chanos chanos*) forsskal. **Aquaculture Research**, Oxford, v.31, p. 557-564, 2000.

FAO. Base de dados estatísticos (faostat). Disponível em :<www.fao.org> acessado em 01/04/2005.

FEIX, R.D.; ABDALLAH, P.R.; FIGUEIREDO, M.R.C.. **Análise econômica da criação de rãs em regiões de clima temperado**. 2005 (no prelo). Disponível em: <http://www.ufv.br/dta.ran/public.htm> acessado em 13/03/2005.

FRACALOSSO, D.M.; ALLEN, M.E.; YUYAMA, L.K.; OFEDAL, O.T. Ascorbic acid biosíntesis in amazonian fishes. **Aquaculture**. Amsterdam, v.192, p. 321-332, 2001.

FUGLER, C.M. **A proposed management programmed for the indian bullfrog, *Rana tigrina*, in bangladesh, comments pertaining to its intensive cultivation with observation on the status of the exploited chelonians, 1985**. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/field/003/ac353e/ac353e00.htm> > acesso em 13 mar. 2005.

FUJIMOTO, R.Y. **Adição de ascorbil polifosfato com fonte de vitamina C em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829)**. 2001. 36f. Dissertação (Mestrado) – “Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal”-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

HALVER, J.E., ASHILEY, L.M., SMITH, R.R. Ascorbic acid requirements of coho salmon e rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 98, p. 762-771, 1969.

HALVER, J.E., SMITH, R.R., TOLBERT, B.M. Utilization of ascorbic acid in fish. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v.258, p.70-71, 1975.

HALVER, J.E. The vitamins. In: Halver, J.E. **Fish nutrition**. Washington: Academic press, 1989. Cap 2, p. 31-109.

HAYASHI, C.; SOARES, C.M; GALDIOLI, E.M.; FURUYA, V.R.B.; BOSCOLO, W.R. Desenvolvimento de girinos rã touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.33, n.1, p. 14-20, 2004.

LEIBOVITZ, H.E.; CULLEY JR, D.D.; GEAGHAN, J.P. Effects of vitamin c e sodium benzoate on survival, growth e skeletal deformities of intensively cultured bullfrog larvae *Rana catesbeiana* reared at two pH levels. **Journal of the World Mariculture Society**. [S.l.], v.13, p. 322-328, 1982.

LI, Y. P.; LOVELL, R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. **Journal of Nutrition**. Bethesda, v. 115, p. 123-131, 1985.

LIM, C.; LOVELL, R.T. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Nutrition**. Bethesda, v. 108, p. 1137-1146, 1978.

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. Ranicultura: técnicas e propostas para alimentação de rãs. In: **ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA**, 4., 1984, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Goiânia dos criadores de rãs. p. 123-134. 1984.

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa: UFV, 1992. 168p.

LIMA, S.L.; CRUZ, T.A.; MOURA, O. M. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Ed. Folha de Viçosa Ltda, 1999. 170p.

LIN, M.F.; SHIAU, S.Y. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg e L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) e its effects on immune responses of grouper, *Einephelus malabaricus*. **Aquaculture Nutrition**, London, v.10, p. 327-333, 2004.

LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. Van nostrad rein hold, New Work, 1988, 260p.

LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998, 267p.

MARTINS, M.L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Claracidae) on the infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (monogenea). **Brazilian Journal of Medical an Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 655-658, 1998.

MELLO, R.F.; MOURA, M.A.M; VIEIRA, I.; CYRINO, J.E.P. Suplementação da dieta de alevinos de piauçu (*Leporinus obtusidens*) com vitamina C. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1213-1223, 1999.

MITRA, G.; MUKLOPADHYAY, P.K. Dietary essentiality of ascorbic acid in rohy larvae: Quantification with ascorbic acid enriched zooplankton. **Aquaculture Internacional**, London, v. 11, n. 1-2, p. 81-93, 2003.

MORAES, J.R.E.; FREITAS, J.B.; BOZZO, F.R.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. A suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.29, n.1, p.57-67, 2003.

NANDI, A.; MUKHOPADHYAY, C.K.; GHOSH, M.K.; CHATTOPADHYAY, D.J.; CHATTERJEE, I.R. Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 22, n. 6, p. 1047–1954, 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish**. Washington: National Academic Press, 1993, 114p.

PETRIC, M.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M. ; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MALHEIROS, E.B. Suplementação alimentar com vitamina C potencia a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.29, n.1, p.69-76, 2003.

PRIM, E.C.; PADUA, J.T.; BATAUS, L.A.M; Variabilidade genética da rã-touro-gigante (*Rana catesbeiana*) proveniente de populações de estados de Goiás, Pará e Paraná, criadas em sistemas intensivo de cultivo. **Ciência Animal Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, n.1, p. 1-6, 2003.

ROSE, R.C.; CHOI, J.L. Intestinal-absorption e metabolism of ascorbic acid in rainbow-trout. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 258, n. 5, p. R1238-R1241, part.2. 1990.

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

SEIXAS FILHO, J.T.; MELLO, S.C.R.P.; SILVA, J.M.F.; THOMAS, J.E.; MELO, C.M.S. Efeitos de níveis de energia e proteína bruta no desempenho de girinos (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.27, n. 4, p. 664-669, 1998.

SILVA, N.R. Alimentação e nutrição de rãs. In: **ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA**, 5., 1988, Rio de Janeiro. **Anais e Coletânea...** Rio de Janeiro: ARERJ, 1988, p. 103-119.

SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. The effects of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochormis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 52, p. 1-10, 1986a

SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. The effects of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochormis mossambicus* (Peters). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 59, p. 197-208, 1986b.

SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. Water soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia *Oreochormis niloticus* (L.). **Aquaculture and Fisheries Management**, [S.l.], v. 25, p. 269-278, 1994.

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

STÉFANI, M.V. Alimentação e nutrição. In: I CICLO DE PALESTRAS SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA, 1., 2001, São Paulo. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**. São Paulo, 2001. p. 31-49.

STEFFENS, W. **Principles of fish nutrition**. Chichester: Ellis Horwood, 1989. 348p.

TACON, A.G.J. Vitamin nutrition in shrimp and fish. In: **AQUACULTURES FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP**, 1991, Singapore. **Proceedings...** Singapore: American Soybean Association, 1991. p. 11-41.

TEIXEIRA, R.D.; PEREIRA MELLO, S.D.R.; LIMA DOS SANTOS, C.A.M. The world market for frog legs. In: FAO/GLOBEFISH. **Research Programme**, v. 68. Rome: FAO, 2001. 44p.

TOUHATA, K.; TOYOHARA, H; MITANI, T.; KINOSHITA, M; SATOU, M.; SAKAGUCHI, M. Distribution of L-gulono-1,4-lactone oxidase among fishes. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 61, n. 4, p. 729-730, 1995.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on fish health**. Saint Louis Cedex: Roche, 1998. 30p. Disponível em: <http://www.roche-vitamins.com/home/what/what-anh/what-anh-vitamins/what-anh-vitamin-c.htm>. Acesso em: 11 mar. 2005.

CAPÍTULO II

SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM VITAMINA C E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*)

Neidison Carneiro Colombano¹, Jaime Fenerick¹ Júnior; Marta Verardino De Stéfani^{1,2};
Flavio Ruas de Moraes^{1,3}

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

² Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14844-900.

³ Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14844-900.

Correspondência: Flavio Ruas de Moraes - Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14844-900. fruas@fcav.unesp.br

Título abreviado: Vitamina C, desempenho zootécnico em *Rana catesbeiana*

Obs: O artigo foi escrito de acordo com as normas da revista *Acta Scientiarum*

RESUMO - O presente trabalho avaliou os efeitos da suplementação de vitamina C sobre o desempenho zootécnico de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*), com peso médio de $0,0123\text{g} \pm 0,002\text{g}$. Distribuídos em quatro grupos, alocados em 16 caixas de amianto impermeabilizadas, com capacidade para 40 L de água, na densidade de um girino L^{-1} , os animais receberam dieta suplementada com zero (controle), 1.000, 1.500 e 2.000mg de vitamina C kg^{-1} de ração, constituindo os grupos T_0 , T_1 , $T_{1,5}$ e T_2 , durante 75 dias. Foram avaliados a taxa de sobrevivência, porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos, ganho de peso, taxa de crescimento específico e contagem diferencial de células no sangue. Os resultados mostraram que a melhor taxa de sobrevivência (93%), a melhor porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos (29%), o maior ganho de peso (4,22g), e a melhor taxa de crescimento específico (6,03%/dia), foi observado nos girinos que receberam a suplementação de 2000mg vit C kg^{-1} ração. O pior desempenho foi observado nos girinos que não receberam vitamina C. Não se observou diferença significativa na contagem diferencial de células (leucócitos, trombócitos) entre os diferentes tratamentos. Os resultados sugerem que 2000/mg de vitamina C Kg^{-1} é uma boa opção para melhorar os índices de ganho de peso, taxa de crescimento específico, porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos e taxa de sobrevivência na criação de girinos de rã-touro.

Palavras chave: *Rana catesbeiana*, rã-touro, girinos, Vitamina C , sobrevivência, metamorfose.

ABSTRACT The present study evaluated the effects of vitamin C supplementation about the performance indexes of bull frog tadpoles (*Rana catesbeiana*) with middleweight of $0,0123g \pm 0,002g$. Distributed in four groups, allocated in 16 boxes of water proof (40 L), the density was of 1 tadpole L^{-1} , The animals received diet supplemented with zero (control), 1,000, 1,500 e 2,000 mg of vitamin C Kg^{-1} of food, constituting the groups T1, T2, T3 e T4, for 75 days. They were evaluated in this survival rate, tadpole percentage that were metamorphosed in imago, weight gain, specific growth rate and cells differential counting in the blood. The results showed: the best survival rate (93%), the best tadpoles percentage that were metamorphosed in imago (29%), the biggest weight gain of the tadpoles (4,22g), and the best rate of specific growth (6,03%), was observed in the tadpoles that received a supplementation of 2,000mg vit C kg^{-1} ration. The worst performance was observed in the tadpoles that did not receive vitamin C. Significant difference in the cells differential counting was not observed (Leukocytes and trombocytes) among different treatments. The results suggest that 2000mg of vitamin C Kg^{-1} is a good option to improve the weight gain indices, specific growth rate, tadpoles percentage that were metamorphosed in imago and survival rate of the frog-bull tadpoles creation.

Key words: *Rana catesbeiana*, bullfrog, tadpoles, Vitamin C, survival, metamorphosis.

INTRODUÇÃO

As vitaminas são compostos orgânicos presentes em pequenas quantidades nos alimentos naturais e essenciais para a manutenção das funções fisiológicas. Sua deficiência causa o comprometimento de funções específicas (LOVELL, 1988; COMBS, 1992; ALMEIDA, 2003). A vitamina C em girinos, assim como em peixes, participa na formação dos tecidos ósseo e cartilaginoso, sendo responsável pela melhoria no crescimento. Sua carência ocasiona deformações ósseas, hemorragias, falta de apetite e aumento dos efeitos nocivos do estresse (HALVER, 1995 apud STÉFANI et al., 2001), além de deformações na cauda (LEIBOVITZ et al., 1982).

A suplementação dietética com vitamina C para peixes teleósteos deve-se ao fato de que estes não possuem a enzima L-gulonolactona necessária para a síntese de ácido ascórbico, sendo dependentes de fontes exógenas para manutenção ideal da homeostase (DABROWSKI, 1990). Os anfíbios, embora sejam capazes de sintetizar o ácido ascórbico, o faz em quantidades insuficientes, sendo necessária sua suplementação quando em cativeiro (NANDI et al., 1997).

A alimentação é um dos fatores limitantes na criação de rãs, pois embora as rações sejam amplamente utilizadas, seu custo é alto e as exigências nutricionais da rã-touro ainda são pouco conhecidas (SILVA, 1988; SEIXAS FILHO et al., 1998a).

LEIBOVITZ et al. (1982), não observaram diferenças significativas na taxa de sobrevivência de girinos de rã-touro alimentados com dietas suplementadas com vitamina C. Segundo STÉFANI et al. (2001), a suplementação com vitamina C e E não conferiu maior ganho de peso aos animais, mas a taxa de sobrevivência dos animais suplementados com 500 mg vit. C kg⁻¹ foi significativamente maior do que a do grupo

controle (62,83% e 40,48% respectivamente). A vitamina E não influenciou o ganho de peso e a taxa de sobrevivência.

Tendo em vista estes fatores a suplementação alimentar com ácido ascórbico na dieta de girinos pode ser alternativa viável para a melhora do desempenho zootécnico e da qualidade dos animais (HALVER, 1989). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da suplementação com vitamina C no desempenho de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no setor de ranicultura do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Caunesp, Jaboticabal – SP (21°15'22" Latitude S e 48°18'58" Longitude W, com altitude de 595 metros), no período de 22 de março a 04 de junho de 2004 (75 dias). Foram utilizados 640 girinos de rã-touro (*R. catesbeiana*), originários da mesma desova, com peso médio inicial de 0,0123g \pm 0,002g. Os girinos foram distribuídos em 16 caixas de cimento amianto impermeabilizadas, com 40 L de água, na densidade de um girino por litro de acordo com o recomendado pela literatura (ADAMS e BRUISMA, 1987; SEIXAS FILHO et al., 1998 a x b; CASTRO e PINTO, 2000; HAYASHI et al., 2004). A água utilizada era proveniente de poço artesiano, livre de cloro, com renovação constante durante 24 horas em todas as caixas. As caixas foram mantidas no interior de uma baia do galpão de engorda mantendo-se o ambiente fechado para evitar reduções bruscas de temperatura.

Neste ensaio foram testados quatro níveis de suplementação com ácido ascórbico polifosfato protegido com etilcelulose Roche®, totalizando quatro tratamentos (T₀ – Ração controle (RC); T₁ – RC + 1.000 mg vit C kg⁻¹; T_{1,5} – RC + 1.500 mg vit C kg⁻¹;

¹ e T₂ – RC + 2.000 mg vit C kg⁻¹) e quatro repetições, com 16 parcelas. Todas as rações tinham a mesma formulação (Tabela 1) diferindo apenas na concentração de vitamina C, com aproximadamente 32% de proteína bruta e 4000 kcal kg⁻¹ de energia bruta.

As rações foram pesadas e separadas em lotes de 400 g para cada tratamento, sendo mantidas em recipientes plásticos escuros e mantidos a 4°C.

A ração foi moída e oferecida *ad libitum* aos animais três vezes ao dia (9:00, 13:00 e 17:00 horas). Diariamente, antes da primeira alimentação as caixas foram sifonadas, a fim de retirar os dejetos e sobras de ração.

A cada 15 dias, 20% dos girinos foram pesados e realizadas análises físico-químicas da água das caixas, observando-se que as variáveis mantiveram-se em condições adequadas para a criação de organismos aquáticos de acordo com SIPAUBA-TAVARES (1994). A temperatura variou de 27,24°C a 30,12°C; o pH entre 7,15 a 7,18; a condutividade elétrica entre 162,30 a 164, 45 µS.cm⁻¹ e o oxigênio dissolvido entre 6,55 a 7,04 mg L⁻¹.

Para a determinação do desempenho zootécnico foram calculados os seguintes índices: taxa de sobrevivência (TS, %), porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos (TM, %), ganho de peso (GP, gramas), taxa de crescimento específico (TCE, % dia⁻¹), Peso médio (PM), sendo:

$$GP (g) = PF - PI$$

$$TCE = 100 \times [(\ln PF - \ln PI) \div Per]$$

Onde:

PI = peso inicial

PF = peso final

Per = período experimental (em dias)

Ao final do período experimental foram selecionados dois girinos por tanque, totalizando oito animais por tratamento, para análise hematológica. A coleta de sangue foi realizada a partir da veia caudal com auxílio de agulha e seringa plástica contendo anticoagulante (EDTA a 10%). Após a coleta foi realizada a contagem diferencial de células de defesa orgânica que incluíram leucócitos e trombócitos. As contagens de linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, e trombócitos foram realizadas em extensões coradas pancromaticamente pelo método de ROSENFELD (1947), em microscopia de luz comum. Foram contadas 200 células por lâmina, estabelecendo-se o percentual de cada componente de interesse.

Análise estatística

Para análise estatística das características de taxa de sobrevivência, porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos e hematológicas, dos girinos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para a análise dos dados de ganho de peso e taxa de crescimento específico foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com repetições (indivíduos) dentro das parcelas (tanques). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos para porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos e porcentagem de sobrevivência estão apresentados na Tabela 2. Os resultados demonstraram que os diferentes tratamentos influenciaram

significativamente ($p < 0,01$) a porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos e porcentagem de sobrevivência dos animais. A pior porcentagem de sobrevivência (68%) ocorreu nos girinos que não receberam suplementação com vitamina C, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Apesar de não ocorrer diferença significativa na porcentagem de sobrevivência entre os diferentes níveis de suplementação (T_1 , $T_{1,5}$ e T_2), para o produtor essas diferenças são bem marcantes, obtendo-se uma sobrevivência de 93% para girinos suplementados com 2000 mg vit C kg^{-1} , contra 80% de sobrevivência para girinos suplementados com 1000 mg vit C kg^{-1} . Esses resultados são similares aos observados por STÉFANI et al. (2001) que obtiveram menor taxa de sobrevivência de girinos de rã-touro no tratamento controle (40,48%) e maior taxa (62,83%) no tratamento com maior suplementação com vitamina C (500 mg vit C kg^{-1}).

Este aumento na taxa de sobrevivência pode ser atribuído à maior eficiência dos mecanismos de defesa orgânica como efeito da suplementação com vitamina C, conforme observado para peixes por PETRIC et al. (2003) e BRUM (2003). MARTINS (1998) observou significativa diminuição no número de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea) nas brânquias de *P. mesopotamicus*, alimentados com 2.000mg vit C kg^{-1} de ração durante 24 semanas. Demonstrando os efeitos positivos da adição de vitamina C e E na ração de *Oncorhynchus mykiss*, Whali et al (1998), verificaram que de 2.000 mg vit C Kg^{-1} e 800mg vit E Kg^{-1} respectivamente, diminuíram a mortalidade de peixes infectados com *Yersinia ruckeri* e *Ichthyophthirius multifiliis*.

SHIAU e HSU (1995), também observaram que híbridos jovens de tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) alimentados com vitamina C e E apresentaram taxa de sobrevivência acima de 97,0%.

MITRA e MUKLOPADHYAY (2003) verificaram que larvas de carpas alimentadas com zooplâncton enriquecido com ácido ascórbico (aa) apresentaram menor mortalidade (90% de sobrevivência), definindo que os requisitos de ácido ascórbico na dieta encontram-se em torno de $1.209 \mu\text{g aa g}^{-1}$ da dieta seca, e colabora para o aumento da resistência das larvas quanto a patógenos e modificações ambientais.

LIN e SHIAU (2004) detectaram diferença significativa com relação à taxa de sobrevivência em *Epinephelus malabaricus* alimentados com l-ascorbil-monofosfato-Mg e l-ascorbil-2-monofosfato-Na, em relação ao grupo não alimentado com dietas enriquecidas com ácido ascórbico, tendo para os grupos alimentados com ácido ascórbico maior taxa de sobrevivência (acima de 80%).

A porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos (Tabela 2) foi influenciada pelos diferentes níveis de suplementação com vitamina C. Observou-se menor porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos (6%) nos animais que não receberam suplementação (T_0), a qual diferiu significativamente ($P < 0,01$) das demais. A maior taxa de girinos que se metamorfosearam em imagos (29%) foi observada nos animais suplementados com $2000 \text{ mg vit C kg}^{-1}$ de ração. Entre os tratamentos T_1 e $T_{1,5}$ não foram observadas diferenças significativas. A maior porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos encontrada no T_2 , pode ser atribuída ao fato de que girinos sob condições ótimas de alimentação apresentam rápida metamorfose (MARTINEZ et al., 1994).

A análise de variância e os valores médio do ganho de peso e taxa de crescimento específico encontra-se na Tabela 3 . Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os indivíduos do mesmo tratamento para ganho de peso e taxa de crescimento específico. No entanto, com relação aos tratamentos observou-se diferença significativa ($p<0,01$) em ambas as variáveis. O maior ganho de peso dos girinos (4,22g), foi observado no T₂ (2000 mg vit C kg⁻¹ ração), a qual não diferiu significativamente do T₁ (4,03g). O pior ganho de peso (2,93g) foi observado nos girinos que não receberam suplementação de vitamina C (T₀). O mesmo comportamento foi observado para taxa de crescimento específico, onde os girinos suplementados com 2000mg vit C kg⁻¹ ração apresentam a maior taxa (6,03 % . dia⁻¹).

A literatura sobre suplementação com vitamina C em dieta para girinos de rã-touro, não há indicações de interferência sobre o ganho de peso (LEIBOVITZ et al., 1982; STÉFANI et al., 2001), provavelmente porque os níveis utilizados de vitamina C foram inferiores aos do presente trabalho. Por outro lado, SOLIMAN et al. (1994), observaram que tilápias do Nilo, suplementadas com vitamina C, apresentaram maior crescimento que o comparado com os alimentados sem suplementação de vitamina C. Os autores concluíram que a deficiência em ácido ascórbico reduz a absorção de iodo pela tireóide com aumento da concentração plasmática desse mineral, sugerindo a hipoatividade tireoideana. Deste modo o retardo do crescimento pode ser atribuído à redução dos níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos reguladores do crescimento.

Esses resultados diferem dos observados por FUJIMOTO (2001) em alevinos de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e de ALMEIDA (2003) em pacu (*P. mesopotamicus*), que não observaram diferença significativa entre os tratamentos para

ganho de peso e taxa de crescimento específico. No entanto, ambos observaram tendência ao aumento das variáveis acima mencionadas em função do aumento da concentração de vitamina C na dieta. A taxa de crescimento específico observada neste ensaio foi superior à encontrada por ALMEIDA (2003) (média de 2,72% dia⁻¹) em pacu e por LEE et al. (1998) (0,44 a 1,08% dia⁻¹) em *Sebastes schlegeli* em dietas suplementadas com vitamina C.

A Fig. 1, mostra que após 30 dias de período experimental houve redução do peso dos girinos devido a diminuição da temperatura e conseqüente diminuição no consumo de ração. Após 45 dias, o peso dos girinos aumentou novamente, observando-se que os animais do T₂ (2000 mg vit C kg⁻¹ ração) e T₁ (1000 mg vit C kg⁻¹ ração) apresentaram peso médio final mais elevado.

As contagens de leucócitos e trombócitos não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, para quaisquer das variáveis analisadas (Tabela 4), estando de acordo com os resultados encontrados por MARTINS et al., (1995) em alevinos de *P. mesopotamicus*; FUJIMOTO (2001) em alevinos de pintado *P. coruscans*; BARROS et al., (2002) em *O. niloticus*; e ALMEIDA (2003) em *P. mesopotamicus*, alimentados com dietas suplementadas com vitamina C.

Os resultados deste ensaio sugerem que a suplementação com vitamina C na dieta para girinos de rã-touro (*R. catesbeiana*), melhora o desempenho zootécnico sendo que com 2.000 mg vit C kg⁻¹ obtiveram os melhores índices. Portanto a suplementação alimentar com vitamina C pode ser indicada para a obtenção de animais de boa qualidade em criação comercial.

REFERÊNCIAS

ADAMS, I.K., BRUISMA, E.C.; Intensive commercial bullfrog culture: a brasilian experience. **Aquaculture Economics and Management**, Oxford, v. 358, n.4, p. 28-44, 1987.

ALMEIDA, G.S.C. **Suplementação dietética de vitamina C, desenvolvimento e sanidade do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**. 2003. 47f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; KLEEMANN, G, K. Levels of vitamin C e iron for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2149-2156, 2002.

BRUM, C.D. **Vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 mantidos em diferentes densidades**. 2003. 58 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 2003.

CASTRO, J.C.; PINTO, A.T. Qualidade de água em tanque de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802, cultivados em diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n.6, p. 1903-1911, 2000.

COMBS, G.F. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition e health.** New York: Academic Press, 1992. 526p.

DABROWSKI, K. Gulonolactone oxidase is missing in teleost fish. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v.371, p.207-214, 1990.

FUJIMOTO, R.Y. **Adição de ascorbil polifosfato com fonte de vitamina C em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829).** 2001. 36f. Dissertação (Mestrado) – “Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal”-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

HALVER, J.E. The vitamins. In: Halver, J.E. **Fish nutrition.** Washington: Academic press, 1989. Cap 2, p. 31-109.

HALVER, J.E. Vitamim requirement study techniques. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v.13, p. 215-228, 1995.

HAYASHI, C.; SOARES, C.M; GALDIOLI, E.M.; FURUYA, V.R.B.; BOSCOLO, W.R. Desenvolvimento de girinos rã touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.1, p. 14-20, 2004.

LEE, K.J., KIM, K.W., BAI, S.C. Effects of different dietary levels of L-ascorbic acid on growth e tissue vitamin C concentration in juvenile Korean rockfisc, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 237-244, 1998.

LEIBOVITZ, H.E.; CULLEY JR, D.D.; GEAGHAN, J.P. Effects of vitamin c e sodium benzoate on survival, growth e skeletal deformities of intensively cultured bullfrog larvae *Rana catesbeiana* reared at two pH levels. **Journal of the World Mariculture Society**. [S.I.], v.13, p. 322-328, 1982.

LIN, M.F.; SHIAU, S.Y. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg e L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) e its effects on immune responses of grouper, *Einiphelus malabaricus*. **Aquaculture Nutrition**, London, v.10, p. 327-333, 2004.

LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. Van nostrad reinhold, New Work, 1988, 260p.

MARTINEZ, I.P.; HERRAEZ, M.P.; ALVAREZ, R. Response of hatchery-reared *Rana perezii* larvae fed different diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 1, n. 128, p. 235-244, 1994.

MARTINS, M.L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Claracidae) on the infropopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (monogenea). **Brazilian Journal of Medical an Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 655-658, 1998.

MARTINS, M.L., CASTAGNOLLI, N., ZUIM, S.M.F., URBINATI, E.C., Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre parâmetros hematológicos de alevinos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 12, p. 609-618, 1995.

MITRA, G.; MUKLOPADHYAY, P.K. Dietary essentiality of ascorbic acid in rohy larvae: Quantification with ascorbic acid enriched zooplankton. **Aquaculture Internacional**, London, v. 11, n. 1-2, p. 81-93, 2003.

NANDI, A.; MUKHOPADHYAY, C.K; GHOSH, M.K.; CHATTOPADHYAY, D.J.; CHATTERJEE, I.R. Evolutionary sigficance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 22, n. 6, p. 1047–1954, 1997.

PETRIC, M.C.(M); MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M (D).; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MALHEIROS, E.B. Suplementação alimentar com vitamina C potencia a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.29, n.1, p.69-76, 2003.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butant.**, São Paulo, v.20, p. 329-334, 1947.

SEIXAS FILHO, J.T.; MELLO, S.C.R.P.; SILVA, J.M.F.; THOMAS, J.E.; MELO, C.M.S. Efeitos de níveis de energia e proteína bruta no desempenho de girinos (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.27, n. 4, p. 664-669, 1998a.

SEIXAS FILHO, J.T.; MELLO, S.C.R.P.; VEIGA, R.C.A.; MIREA, R.G.B.; SANTOS, C.A.N. Efeito da granulometria da ração sobre desenvolvimento de girinos de *Rana catesbeiana*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 224-230, 1998b.

SHIAU, S.Y; HSU, T.S. L-Ascorbyl-2-sulfate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbyl-2-monophosphate for tilapia *Oreochormis niloticus* x *Oreochormis aureus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 133, p. 147-157, 1995.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. Jaboticabal: Funep/UNESP, 1994. 70p. (Boletim Técnico nº 1)

SILVA, N.R. Alimentação e nutrição de rãs. In: **ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA**, 5., 1988, Rio de Janeiro. **Anais e Coletânea...** Rio de Janeiro: ARERJ, 1988, p. 103-109.

SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. Water soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia *Oreochormis niloticus* (L.). **Aquaculture and Fisheries Management**, [S.l.], v. 25, p. 269-278, 1994.

STÉFANI, M.V., MARCANTONIO, A.J., MARTINS, M.L. Suplementação com vitamina C e E sobre o desenvolvimento e sobrevivência de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 869 – 871, 2001.

WAHLI, T.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. et al. Influence of combined vitamin C e E on non-specific immunity e disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walibaum). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 21, p. 127-137, 1998.

Tabela 1. Fórmula e composição calculada das dietas experimentais.

| Ingredientes | % |
|----------------------------------|-------|
| Farelo de soja | 37,5 |
| Milho | 22,5 |
| Farinha de peixe | 16,1 |
| Farinha de trigo | 14,0 |
| Farelo de Arroz | 7,9 |
| Óleo de soja | 0,5 |
| Suplemento vitamínico e mineral* | 1,0 |
| Metionina | 0,4 |
| CMC (Carboxi metil celulose) | 0,1 |
| Composição centesimal** | |
| PB (%) | 31,16 |
| EB (Kcal/Kg ração) | 4043 |
| FB (%) | 5,62 |
| EE (%) | 4,50 |
| MM (%) | 8,33 |
| ENN (%) | 39,28 |
| Ca (%) | 1,21 |
| P (%) | 1,10 |

*Composição do suplemento mineral e vitamínico: Ferro 15000mg, Cobre 5000mg, Iodo 500mg, Manganês 17000mg, Zinco 12000mg, Selênio 70mg, veículo 1000g, vitamina A 12000 UI, vitamina D₃ 1500 UI, vitamina E 50mg, vitamina k 4mg, vitamina B₁₂ 7mg, vitamina B₂ 7mg, ácido pantotênico 60mg, ac. Nicotínico 120mg, cloreto de colina 600mg, metionina 700mg, antioxidante 500mg, veículo 1000g.

**Proteína bruta (PB); Energia bruta (EB); Fibra bruta (FB); Extrato etéreo (EE); Matéria mineral (MM); Extrato não nitrogenado (ENN); Cálcio (Ca); Fósforo (P).

Tabela 2. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas na análise da variância para porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos (%TM) e porcentagem de sobrevivência (%SOB).

| Estatísticas | Variáveis | |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------|
| | Girinos que se metamorfosearam % | Sobrevivência % |
| F para tratamento (T) | 29,80** | 12,73** |
| CV (%) | 20,43% | 7,18% |
| T ₀ | 06 ^c | 68 ^b |
| T ₁ | 17 ^b | 80 ^a |
| T _{1,5} | 16 ^b | 84 ^a |
| T ₂ | 29 ^a | 93 ^a |

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey (P<0,05)

Tabela 3. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas na análise da variância para ganho de peso e taxa de crescimento específico.

| Estatísticas | Variáveis | | |
|-----------------------|---------------------|---|--------------------|
| | Ganho de peso (g) | Taxa de crescimento específico (% \cdot dia ⁻¹) | |
| F para tratamento (T) | 8,32** | 8,32** | |
| F para IND(T) | 1,54 ^{n/s} | 1,54 ^{n/s} | |
| CV parcela (%) | 41,41 | 41,41 | |
| CV sub-parcela (%) | 33,35 | 33,35 | |
| Médias | T ₀ | 2,93 ^c | 4,18 ^c |
| | T ₁ | 4,03 ^{ab} | 5,76 ^{ab} |
| | T _{1,5} | 3,27 ^{bc} | 4,67 ^{bc} |
| | T ₂ | 4,22 ^a | 6,03 ^a |

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey (P<0,05)

Tabela 4. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas na análise da variância para características hematológicas dos girinos.

| Estatística | Variáveis (%) | | | | | |
|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Leuc. | Neut. | Eosin. | Basof. | Linf. | Tromb. |
| F para tratamento (T) | 0,82 ^{N/S} | 0,83 ^{N/S} | 1,49 ^{N/S} | 0,45 ^{N/S} | 0,63 ^{N/S} | 0,72 ^{N/S} |
| F para Tanque (TQ) | 0,66 ^{N/S} | 1,08 ^{N/S} | 2,21 ^{N/S} | 1,64 ^{N/S} | 1,94 ^{N/S} | 0,58 ^{N/S} |
| F para Animal d.TQ | 0,41 ^{N/S} | 0,25 ^{N/S} | 2,51 ^{N/S} | 0,07 ^{N/S} | 0,45 ^{N/S} | 1,39 ^{N/S} |
| CV (%) | 7,04 | 29,88 | 19,44 | 16,50 | 5,81 | 32,76 |
| T ₀ | 8,66 | 2,96 | 1,50 | 5,09 | 7,98 | 0,77 |
| T ₁ | 8,28 | 3,21 | 1,33 | 5,29 | 8,08 | 0,95 |
| T _{1,5} | 8,28 | 2,62 | 1,36 | 5,25 | 8,03 | 0,84 |
| T ₂ | 8,54 | 2,66 | 1,59 | 4,85 | 8,28 | 0,95 |

N/S = Não significativo ($p > 0,05$)

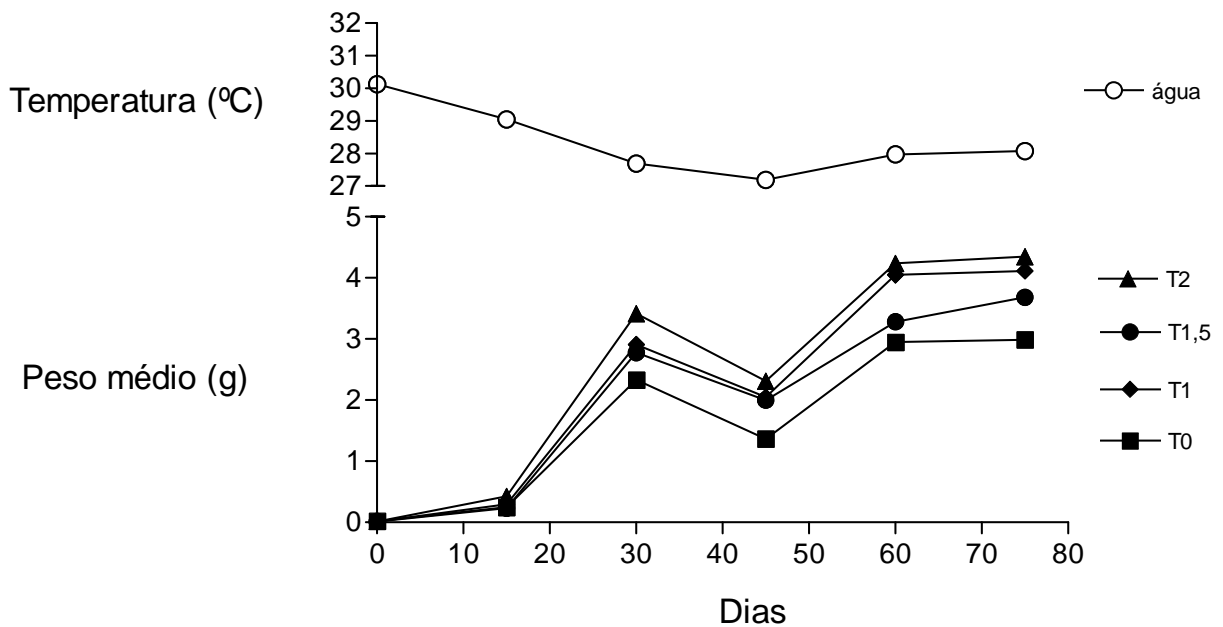


Figura 1. Peso médio de girinos de *Rana catesbeiana* e temperatura da água nos diferentes tratamentos em função do tempo (T₀ = RC; T₁ = RC + 1.000mg vit C kg⁻¹; T_{1,5} = RC + 1.500mg vit C kg⁻¹ e T₂ = RC + 2.000mg vit C kg⁻¹).