



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL – PR
CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA**

HELTON BARTOSZIK

**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E METABÓLICO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO
(*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) SUBMETIDOS A DIFERENTES DIETAS**

LARANJEIRAS DO SUL

2016

HELTON BARTOSZIK

**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E METABÓLICO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO
(*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) SUBMETIDOS A DIFERENTES DIETAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Engenharia de Aquicultura, como
requisito para obtenção de título de Bacharel
em Engenharia de Aquicultura

Orientadora: Prof. Dr.^a Silvia Romão

LARANJEIRAS DO SUL

2016

Bartoszik, Helton
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E METABÓLICO DE GIRINOS DE
RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) SUBMETIDOS
A DIFERENTES DIETAS/ Helton Bartoszik. -- 2016.
60 f.

Orientadora: Silvia Romão.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia de Aquicultura , Laranjeiras do Sul, PR,
2016.

1. Dietas com girinos . 2. Alimentos Alternativos
para girinos de rãs. I. Romão, Silvia, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

HELTON BARTOSZIK

**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E METABÓLICO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO
(*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) SUBMETIDOS A DIFERENTES DIETAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Prof. Dr.^a Silvia Romão

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e Aprovado pela
banca em: 15/12/2016

BANCA EXAMINADORA

L. Cazarolli

Professora Dra. Luísa Helena Cazarolli.

Jorge Garcia P.

Professor Dr. Jorge Erick Garcia Parra.

Silvia Romão

Professora Dra. Silvia Romão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela vida e oportunidades conquistadas, pois ele nos deu o Dom da vida, em ser racionais tornando-nos pensantes nas coisas em que nos convém.

Gostaria de agradecer a oportunidade de poder estudar e obter um título de Engenheiro de Aquicultura.

Gostaria de agradecer a toda minha família em geral que de alguma forma me apoiaram nesses 5 anos, mas principalmente meus pais Carlos Bartoszik e Natalia Bartoszik juntamente com meu irmão Cleiton Bartoszik sua esposa Elaine que me deram todo o suporte nesses anos.

Quero agradecer todos os professores da UFFS com os quais tive contato, quero dizer que foi muito gratificante os ensinamentos, as histórias vividas e experiências adquiridas e transmitidas por eles. Quero agradecer em especial a professora Silvia Romão a qual sempre me apoiou no projetos e experiências dos seus ensinamentos, e agradecer por ter sido minha orientadora de Trabalho de conclusão de curso.

Agradeço a todos meus amigos principalmente do projeto PROEXT os quais sempre estiveram presentes juntos comigo em meu experimento e outros projetos.

Agradeço de forma geral meus amigos Rubens, Valternei, Lucas (vulgar sulina) a Marília (vulgar nena) a Tais a Dyeli e demais amigos e também minha namorada Renata Scandolara os quais compartilhamos muitos momentos bons de lazer, e também muitos momentos de dificuldade que enfrentamos muitas lições de vida, nesse período de Universidade.

A todos o meu muito Obrigado!!!

RESUMO

O desenvolvimento da ranicultura no Brasil e no mundo é dependente de conhecimento científico e formação de mão de obra qualificada, pois há uma grande carência nesta área, para atuar na assistência aos produtores. A carne da rã se destaca das demais por seu alto valor nutricional, sua alta capacidade de digestão, sendo indicada para tratamentos médicos. A Rã-touro *Lithobates catesbeianus* é uma das principais espécies cultivadas no mundo todo, sendo um ponto crítico na produção a ausência de rações específicas para as diferentes fases de desenvolvimento do cultivo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico e perfil metabólico e enzimático de girinos submetidos a diferentes fontes de alimentação, constituídos de quatro grupos de tratamentos: 1) ração de coelho, 2) ração de peixe, 3) ração de coelho com suplementação externa de espinafre em proporção de 50%, 4) ração de peixe com suplementação externa de espinafre em proporção de 50%. Foram realizados dois ensaios, no primeiro 60 animais foram pesados alocados em 60 aquários individuais de 01 L, distribuídos aleatoriamente nos 4 grupos de tratamentos. No segundo, 16 animais foram pesados e distribuídos em 4 aquários de 4 L em densidade de 1 animal/L correspondentes aos quatro grupos de tratamento. Após 40 dias de experimento os animais foram pesados para verificar a taxa de ganho de peso, posteriormente anestesiados e sacrificados para a coleta de tecido muscular, hepático e intestino para realização dos testes bioquímicos marcadores de vias metabólicas importantes. Para identificação de alterações de metabolismo de aminoácidos foram realizadas análises de atividade de transaminases (TGO e TGP) de músculo e fígado. Para identificação de possíveis interferências no sistema de defesa antioxidante foram realizadas análises de peroxidação lipídica (LPO) e atividade da enzima catalase, ambos em fígado e músculo. Para a identificação de possíveis influências na digestão, absorção e metabolismo de carboidratos foram realizadas análises de atividade das enzimas digestivas amilase, sacarase, maltase e lactase em intestino e concentração de glicogênio em fígado e músculo. As dietas fornecidas aos animais não interferiram no desenvolvimento e nas taxas de ganho de peso, seja em ensaio de cultivo individual ou em ensaio agrupados. Porém no tratamento com ração de peixes, com e sem espinafre, foram observados os maiores pesos e foi observada mortalidade de girinos. Não foram observadas variações entre os tratamentos em relação a atividade de TGO, TGP, catalase, níveis de LPO, concentração de glicogênio e nas enzimas digestivas dissacaridases, maltase, lactase e sacarase, porém foi observado menor atividade da enzima amilase em animais tratados com ração de coelho em relação a ração de peixe e as rações suplementadas com espinafre.

Conclui-se que as dietas podem ser utilizadas para a alimentação dos girinos sem alteração no metabolismo ou no crescimento dos animais. Considerando que a ração de coelho apresenta menor custo e que o espinafre pode ser cultivado na propriedade, o estudo demonstra que alternativas mais econômicas de cultivo podem ser selecionadas, contribuindo para o desenvolvimento econômico da ranicultura. Para comprovação desta alternativa, estudos devem ser realizados em escala comercial.

Palavras-Chave: Ranicultura; Atividade Enzimática; Crescimento; Alimentos Alternativos; *Lithobates catesbeianus*.

ABSTRACT

The development of raniculture in Brazil and in the world is dependent on scientific knowledge and training of skilled labor, since there is a great lack of this area, to act in assisting producers. The meat of the frog stands out from the others for its high nutritional value, its high digestion capacity and is indicated for medical treatments. The Bull Frog *Lithobates catesbeianus* is one of the main species cultivated worldwide, being a critical point in the production the absence of specific rations for the different phases of development of the crop. The objective of this work was to evaluate the zootechnical performance and metabolic and enzymatic profile of tadpoles submitted to different feeding sources, consisting of four treatment groups; 1) rabbit ration, 2) fish ration, 3) rabbit ration with 50% spinach external supplementation, 4) fish ration with 50% external spinach supplementation. First 60 animals were weighed allocated in 60 individual 01 liter aquarium, distributed randomly in the 4 groups of treatments. In the second, 16 animals were weighed and distributed in 4 aquariums of 4 liters in density of 1 animal / liter corresponding to the four treatment groups. After 40 days of experiment, the animals were weighed to verify the rate of weight gain, subsequently anesthetized and sacrificed for the collection of muscle, liver and intestinal tissue to perform biochemical tests for important metabolic pathways. In order to identify alterations in amino acid metabolism, transaminase activity analyzes (TGO and TGP) of muscle and liver were performed. To identify possible interferences in the antioxidant defense system, analyzes of lipid peroxidation (LPO) and activity of the catalase enzyme, both in liver and muscle, were performed. For the identification of possible influences on carbohydrate metabolism, the activity of the digestive enzymes amylase, sucrase, maltase and lactase in intestine and glycogen concentration in liver and muscle were performed. The diets given to the animals did not interfere in the development and, in the weight gain rates, either in the individual culture assay or in pooled assay. However, in the treatment with fish feed, with and without spinach, the largest weights were observed and mortality of tadpoles was observed. No differences were observed between treatments in relation to the activity of TGO, TGP, catalase, LPO levels, glycogen concentration and in the digestive enzymes disaccharidases, maltase, lactase and sucrase, but less activity of the amylase enzyme was observed in animals treated with ration Rabbits in relation to fish meal and rations supplemented with spinach. It is concluded that the diet can be used to feed tadpoles without altering the metabolism or growth of the animals. Considering that rabbit ration presents lower cost and that spinach can be grown on the property, the study demonstrates that more economical cultivation alternatives

can be selected, contributing to the economic development of raniculture. To prove this alternative, studies must be carried out on a commercial scale.

Key Words: Raniculture; Enzymatic activity; Growth; Alternative foods;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Média das taxas de ganho de peso entre os diferentes tratamentos..... Erro! Indicador não definido.
Figura 2: Distribuição dos pesos finais dos animais nos diferentes tratamentos.38
Figura 3: Gráficos de Médias e Desvio Padrão da atividade da Catalase (nmol de H ₂ O ₂ degradado.mg de proteína ⁻¹ .minuto ⁻¹). A: Fígado de animais em cultivos individuais; B: fígado de animais em cultivos agrupados; C: músculo de animais em cultivos individuais; D: músculo de animais em cultivos agrupados.45
Figura 4: Gráficos de Médias e Desvio Padrão para o teste LPO (nmol de H ₂ O ₂ degradado.mg de proteína ⁻¹ .minuto ⁻¹). A: Fígado de animais em cultivos individuais; B: fígado de animais em cultivos agrupados; C: músculo de animais em cultivos individuais; D: músculo de animais em cultivos agrupados.47
Figura 5: Gráficos de Médias e Desvio Padrão para o teste de AMILASE (nmol de H ₂ O ₂ degradado.mg de proteína ⁻¹ .minuto ⁻¹). A: Fígado de animais em cultivos individuais; B: fígado de animais em cultivos agrupados; C: músculo de animais em cultivos individuais; D: músculo de animais em cultivos agrupados.48
Figura 6: Gráficos para Média e Desvio Padrão para os Testes de Maltase, Lactase e Sacarase.50
Figura 7: Gráficos de Médias e Desvio Padrão de concentração de Glicogênio em animais tratados com as diferentes dietas. A: Fígado de animais cultivados em ambiente individual, B: Fígado de animais cultivados em ambiente agrupados C músculo de animais cultivados em ambiente individual e D músculo de animais cultivados em ambiente agrupado.53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Composição dos itens alimentares utilizados nas rações dos girinos (%).	30
Quadro 2: Desenho Experimental da pesquisa. N: número de indivíduos por aquário	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados do Valor da Produção de Rãs, Jacarés, Siris e Caranguejos.	17
Tabela 2: Taxa de Consumo Alimentar Diário Conforme a Biomassa de Girinos.	26
Tabela 3: Taxa Consumo Alimentar Diário Conforme a Biomassa de Rãs.	26
Tabela 4: Composição Nutricional do Espinafre <i>Spinacia Oleracea</i> , segundo o Departamento de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina.	27
Tabela 5: Dados de Média e Desvio Padrão de taxa de ganho de peso (%), variação de pesos finais nos grupos de tratamento (g) e Taxa de sobrevivência conforme cada grupo de Alimentação (%).	37
Tabela 6: Resultados da Média e Desvio Padrão para a atividade de TGP e TGO (U.L ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹).	41
Tabela 7: Resultados da Média e Desvio Padrão para atividade da Catalase (mmol de H ₂ O ₂ degradado.mg de proteína ⁻¹ .minuto ⁻¹).	44
Tabela 8: Resultados da Média e Desvio Padrão para LPO.	46
Tabela 9: Dados de Média e Desvio Padrão conforme cada grupo de Alimentação para atividade da Amilase.	48
Tabela 10: Gráficos para Média e Desvio Padrão para atividade de Maltase, Lactase e Sacarase (U/mg de proteína U=nmol/min/mg de proteína).	50
Tabela 11: Resultados da Média e Desvio Padrão para conteúdo de Glicôgeno.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Enzima Catalase

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

LPO – Lipoperoxidação

MDA – Malondialdeído

mg – Miligrama

mL – Mililitro

PB – Proteína Bruta

PD – Proteína Digestiva

PVC – Policloreto de Vinil

RC – Ração de Coelho

RCE – Ração de Coelho e Espinafre

RP – Ração de Peixe

RPE - Ração de Peixe e Espinafre

RCE A – Ração de Coelho e Espinafre Aquário

RPE A – Ração de Peixe e Espinafre Aquário

rpm– Rotação Por Minuto

TGO – Aspartatoamino-Transferase (transaminase glutâmico-oxalacética)

TGP – Alanina aminotransferase (transaminase glutâmico-pirúvica)

U – Unidade de atividade específica

UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 CARACTERIZAÇÃO.....	19
3.2 TAXONOMIA.....	20
3.3 BIOLOGIA E FISILOGIA	20
3.4 REPRODUÇÃO E FASES DE DESENVOLVIMENTO.....	21
3.5 SISTEMAS DE PRODUÇÃO.....	22
3.6 CATEGORIAS DE PRODUÇÃO E DIVISÃO DE FASES	23
3.6.1 Manutença de Reprodutores	23
3.6.2 Girinos	23
3.6.3 Recria e Engorda	24
3.6.4 Nutrição	24
3.6.4.1 Nutrição de Girinos	24
3.6.4.2 Nutrição de Rãs	25
3.6.4.3 Alimentação com Espinafre	26
3.6.4.4 Alimentação com Ração de Coelho	28
4 JUSTIFICATIVA	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 ENSAIO EXPERIMENTAL	30
5.1.2 Análises De Crescimento	32
5.1.3 Determinação Dos Parâmetros Metabólicos	32
5.1.3.1 Análise de Proteína.....	32
5.1.3.2 Determinação do Conteúdo de Glicogênio	32
5.1.3.3 Atividade de Aminotransferases ou Transaminases.....	33
5.1.3.4 Sistema Antioxidante.....	33
5.1.3.4.1 Enzima Catalase (CAT)	33
5.1.3.4.2 Marcador de Dano – Lipoperoxidação (LPO)	33
5.1.3.5 Enzimas Digestivas	34
5.1.3.5.1 Amilase	34

5.1.3.5.2 <i>Dissacaridases (Maltase, Lactase e Sacarase)</i>	34
5.1.4 Testes Estatísticos	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
6.1 RESULTADOS DE CRESCIMENTOS E SOBREVIVÊNCIA	36
6.2 RESULTADOS DE PARÂMETROS METABÓLICOS	40
6.2.1 Atividade de Aminotransferases	40
6.2.2 Resultados Sistema Antioxidante	43
6.2.2.1 Atividade da Enzima CATALASE	43
6.2.2.2 Resultados de Peroxidação Lipídica	45
6.2.3 Resultados das Atividades das Enzimas digestivas	47
6.2.3.1 Teste Enzima Amilase	48
6.3 DISSACARIDASES	49
6.3.1 Maltase, Lactase e Sacarase	49
6.4 GLICOGÊNIO	52
7. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A carne de rã é classificada como pescado e apresenta-se como uma carne magra, com baixo valor lipídico e calórico, e com alto valor proteico. Este alimento possui todos os aminoácidos essenciais para o ser humano e é recomendada também para tratamentos terapêuticos, como em dietas hipocalóricas e hipolipídicas (PELUZIO *et al.*, 1995).

A carne de rã é consumida em diversos países. Um exemplo de país consumidor é a China, o qual apresenta o hábito de consumo há mais de quarenta séculos, porém, os principais difusores da cultura de consumo de rã foram os países da Europa (TEIXEIRA, 2001). Dentre os principais países consumidores, também podemos destacar a França, que tem seu consumo baseado principalmente em animais de origem silvestre, oriundos da caça predatória. Mesmo com a prática da caça, o país ainda importa por ano, cerca de 800 toneladas de rãs vivas (NEVEU, 2009).

A produção de rãs-touro (*Lithobates castebeianus*) no Brasil teve início em 1935, na região do Rio de Janeiro, através de um técnico canadense que trouxe aproximadamente 300 casais de rãs-touro (FERREIRA; PIMENTA; PAIVA NETO, 2002). Ao contrário de outros países, o cultivo começou em ambiente fechado totalmente confinado, que apesar de ser um método bem rudimentar, permite proteção aos ranários contra a fuga e predadores, que poderiam resultar em perdas dos animais (OLIVEIRA, 2015).

Ao longo de 80 anos a ranicultura no Brasil enfrentou muitos desafios, dentre eles a redução da produção com o fechamento de vários ranários. Na década de 80, eram aproximadamente 2000 ranários ativos no Brasil, passando para 600 na década de 90 e 100 nos dias atuais (CARDOZO JUNIOR, 2014). Um dos motivos que levaram a redução da produção nacional foi a suspensão da exportação da carne por problemas sanitários (OLIVEIRA, 2015).

Apesar da redução da produção ocorrida na década de 80, atualmente a ranicultura brasileira pode ser reconhecida como uma alternativa de empreendimento agropecuário, apresentando como vantagem a necessidade de pequeno espaço, em comparação com outras atividades como a bovinocultura, suinocultura, avicultura, piscicultura, entre outras. Um entrave na criação ainda é a falta de assistência técnica especializada, além de pesquisas que garantam utilização de novas tecnologias e aumento na produção (MOREIRA, 2011).

A produção brasileira de rã, no ano de 2006, foi de aproximadamente 649 toneladas representando 0,34% da produção aquícola. Apesar da baixa produção, apresentou um

crescimento de 53,5% comparando com a produção registrada na década de 90 (IBAMA, 2008).

A produção de rãs ainda não é significativa no país, quando comparada com outras atividades da aquicultura, e por isso há uma ausência de dados estatísticos sobre a produção e comercialização. Considerando os poucos dados que se tem registro, a produção está agrupada com outros animais como jacaré, caranguejos e siris, conforme dados do IBGE (2013) apresentados na Tabela 1. Estes dados demonstram o Estado do Paraná como um dos principais produtores.

Tabela 1: Dados do Valor da Produção de Rãs, Jacarés, Siris e Caranguejos.

Unidades da Federação em ordem decrescente do valor da produção	Quantidade de Municípios Informantes	Valor da Produção de outros Animais na Aquicultura	
		Total (R\$ 1000)	Percentual (%)
Brasil	26	4287	100,0
Paraná	6	1438	33,6
São Paulo	2	1170	27,3
Rio de Janeiro	12	1054	24,6
Goiás	2	375	8,7
Alagoas	1	140	3,3
Espírito Santo	1	66	1,5
Mato Grosso	1	41	1,0
Rio Grande do Sul	1	2	0,1

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2013.

O sistema de produção adotado para a ranicultura está dividido em quatro fases, sendo elas: i) manutenção de reprodutores; ii) engorda de girinos; iii) metamorfose; iv) engorda de adultos, relacionadas as características fisiológicas e necessidades específicas, sendo que as fases podem ser desenvolvidas todas em um mesmo ranário, ou divididas em diferentes propriedades (CASALI, 2015).

A engorda dos girinos acontece em tanques de terra, devido a maior disponibilidade de alimento natural, tornando assim um cultivo mais econômico. Porém, alguns produtores também praticam a engorda em tanques de alvenaria e de lona plástica. Segundo Lima e Agostinho (1992), não há grande diferença entre a engorda em tanques de terra comparado com a engorda em tanques de lona e alvenaria.

A densidade utilizada em tanques artificiais é de 1 girino a cada 2 L de água. Já para os tanques naturais é utilizado 1 girino para cada 3 L de água. Após postura e fecundação dos gametas, o desenvolvimento embrionário é indireto, contendo fases com características

metabólicas, morfológicas e comportamentais bastante distintas. O desenvolvimento embrionário com a eclosão de uma larva ocorre em 24 a 48 horas. A larva formada passa por 4 fases de girino: G1, caracterizado pela absorção do vitelo, num período de 5 a 7 dias, G2, período em que se inicia a alimentação com ração, num período de dias ou semanas, G3, caracterizado pelo aparecimento dos membros inferiores e superiores, cerca de 75 dias e G4, com absorção da cauda, ausência de alimentação, com duração de 7 a 10 dias, finalizando a metamorfose e dando origem ao imago. O período de engorda de girinos corresponde a passagem pela fase G3, a partir do momento em que as patas inferiores começam a se desenvolver até a formação das patas anteriores (CASALI, 2015; CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013).

Há grande variação do tempo e do peso dos animais ao final desta etapa do processo produtivo. Esta variação está relacionada à variedade de metodologias de manutenção dos animais no período da engorda dos girinos, principalmente devido à ausência de rações comerciais específicas e estudos de desempenho zootécnico que possam auxiliar na seleção de métodos mais apropriados de alimentação. Produtores utilizam principalmente ração de peixe, contendo proteínas de origem animal, para a alimentação dos girinos, apesar do hábito alimentar com forte tendência a herbivoria nesta fase (PINTO, 2014).

Estudos buscando alternativas que gerem melhor desempenho ou condições mais econômicas para a produção de girinos são necessários. Principalmente alternativas de dietas que possam ser produzidas ou complementadas com produtos da propriedade ou locais seriam mais atrativos para o desenvolvimento da atividade. Assim, o presente projeto teve como objetivo avaliar o desempenho zootécnico e metabólico de girinos de rã-touro submetidos a diferentes dietas com intuito de identificar os efeitos da inclusão de espinafre na alimentação desses animais. Avaliando também as diferentes fontes de proteína sendo uma de fonte animal, e vegetal.

2. OBJETIVOS

A seguir apresentam-se o objetivo geral e os objetivos específicos desta pesquisa.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho zootécnico e metabólico de girinos de rã-touro submetidos a dietas com diferentes rações e alimentos alternativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar um sistema de cultivo em laboratório de girinos, da fase G2 à fase G3, submetendo-os a dieta de ração comercial de peixe, ração comercial de coelho, ração comercial de peixe com espinafre e ração comercial de coelho com espinafre;
- b) Observar o tempo de desenvolvimento das diferentes fases dos animais submetidos às diferentes dietas;
- c) Avaliar a aceitação do alimento pelos animais submetidos às diferentes dietas;
- d) Estudar o efeito de diferentes dietas sobre a atividade de enzimas digestivas (Amilase, Sacarase, Maltase e Lactase), em girinos suplementados.
- e) Avaliar a influência das diferentes dietas no conteúdo de glicogênio e na atividade das aminotransferases em fígado e músculo de girinos suplementados.
- f) Avaliar marcadores de estresse oxidativo (Peroxidação lipídica e atividade da catalase) em músculo e fígado de animais submetidos às diferentes dietas;
- g) Comparar o desempenho dos girinos submetidos às diferentes dietas para identificação das melhores condições de dieta em termos zootécnicos, como peso dos animais verificando também sua sobrevivência, metabólicos e econômicos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANFÍBIOS

Os anfíbios possuem como características marcantes a pele com ausência de escamas, pelos, garras e penas. A palavra anfíbio deriva do grego *Amphi Bios*, significando dupla vida, devido a apresentar duas fases distintas, na qual a fase larval desenvolve-se na água e a fase adulta ocorre em ambiente terrestre (TYNING, 1990. *apud* AFONSO, 2004; COGGER; ZWEIFEL, 1998).

Segundo Santos (1994), os anfíbios de ordem anuros, sendo sapos rãs e pererecas possuem como características gerais corpo curto e truncado, providos de quatro membros, sendo, portanto, dois membros anteriores, os braços, e dois posteriores, as pernas. Outra característica está relacionada às brânquias e caudas que desaparecem ao final da fase larval. Algumas espécies possuem dentes e outras somente a língua, sendo que esta é protrátil para facilitar na captura do alimento.

Os sapos possuem características particulares sendo elas: a fase larval ocorre totalmente na água, mas sua vida adulta desenvolve-se na costa terrestre voltando para a água apenas em época de reprodução. Possuem pernas curtas não adaptadas para salto. Já as rãs possuem outras características, como dentes na maxila superior para facilitar na preensão do alimento, pernas longas e adaptadas para o salto, pele lisa, fina e úmida, e vivem próximos a corpos de água. Ainda pode-se distinguir as pererecas, sendo que estas possuem ventosas na ponta de todos os dedos, configurando-se como uma adaptação ao seu ambiente natural, pois elas vivem em árvores (SANTOS, 1994).

3.2 TAXONOMIA

Segundo Cogger e Zweifel (1998) a classificação das rãs-touro segue a descrição conforme abaixo:

- Reino: Animalia;
- Filo: Chordata;
- Subfilo: Craniata;
- Classe: *Amphibia*
- Subclasse: *Lissamphibia* (anfíbios modernos);
- Ordem: Anura (sapos, rãs e pererecas);
- Superfamília: Ranoidea;
- Família: Ranidea (rãs verdadeiras);
- Gênero: *Rana* /*Lithobates* (FROST *et.al.*, 2006);
- Espécie: *Rana Castebeianus* / *Lithobates Castebeianus*.

O gênero *Rana* foi substituído por *Lithobates* devido a estudos de Frost *et al.* (2006).

3.3 BIOLOGIA E FISILOGIA

A rã-touro é um anfíbio originário do Norte da América do Norte, como Canadá e Estados Unidos, as quais possuem como principal característica o seu ciclo de vida, que se desenvolve parte em água e parte em via terrestre (PEREIRA, 2013).

As rãs possuem membros anteriores constituídos de braços, antebraços, pulsos e mãos que tem pequenas palmas, quatro dedos e um polegar vestigial. Este último é importante para o período reprodutivo, pois o dedo se espessa nos machos facilitando a preensão nas fêmeas para a o estímulo à ovulação. Já os membros posteriores são compostos por pernas, coxas e

tornozelos, possuindo longos pés, os quais possuem ainda cinco dedos, interligados por membranas (PLANETA DE AGOSTIN, 1998).

Segundo Storer e Usinger (1977) o corpo das rãs é composta por uma ampla região gular, ou seja, o papo, situado sob a cabeça, e o tórax situado entre os braços, abdômen, além da região pélvica entre as pernas. A coloração da rã-touro é geralmente verde, podendo ser marrom, amarela ou albina (TYNING, 1990).

3.4 REPRODUÇÃO E FASES DE DESENVOLVIMENTO

Segundo Lima *et al.* (1998) a primeira maturação gonadal das fêmeas ocorre quando o animal apresenta peso médio de 109 g, e 10,3 cm de comprimento. Já para os machos, nesta fase os animais apresentam comprimento e peso de 8,09 cm e 45 g, respectivamente.

No comportamento reprodutivo das rãs descrito por Tynning (1990), os machos são caracterizados por serem territorialistas e fazem o canto para atrair a fêmea. As fêmeas escolhem com qual macho vão acasalar, e o macho permite que ela se aproxime. No entanto, o macho somente abraça a fêmea quando tocado com as pernas ou com a ponta do focinho. O abraço ou amplexo nupcial pode acontecer por várias horas, até que termine o processo de desova.

Ainda conforme o autor, a fecundação dos ovócitos ocorre externamente. Os dois animais ficam submersos em água próximos à superfície, sendo que o macho fica em cima da fêmea. A fêmea fica com o corpo arqueado de maneira que a sua cloaca fique direcionada para a superfície. Quando a fêmea libera uma massa de ovos, o macho acompanha o processo liberando juntamente os espermatozoides, fazendo assim a fecundação. Através do movimento com as pernas ele espalha a desova pelo ambiente.

No ambiente natural, as rãs procuram corpos de água relativamente rasas, calmas e limpa para se reproduzirem. Nesses locais, os embriões poderão se desenvolver como girinos, até que ocorra a metamorfose (PLANETA DE AGOSTINI, 1998).

Em sistemas de produção, a fase larval é dividida em relação às características de comportamento alimentar e necessidades diferenciadas de manejo. A fase larval inicia-se no estágio chamado de G1, o qual possui um período de 5 a 7 dias, variando de acordo com a luminosidade e temperatura. As principais características dessa fase são a ausência do trato digestório, presença de bolsa vitelínica e brânquias externas nas laterais (PLANETA DE AGOSTINI, 1998).

A fase seguinte é denominada de G2. Nessa fase as brânquias já se interiorizam, tendo como principal característica a procura constante por alimento. É nesse momento que se dá o início de oferta de ração aos girinos, além de outros alimentos. Nessa fase os girinos são transferidos para tanques com dimensões maiores, para promover o crescimento e desenvolvimento das larvas (PLANETA DE AGOSTINI, 1998).

Após alguns dias, dependendo muito do manejo, o animal começa a desenvolver pernas na parte inferior próximo à cauda, sendo essa fase denominada de G3. Nessa fase, o manejo continua praticamente o mesmo, sendo a única diferença a proximidade com a metamorfose. O indicado nesse período é transferir os animais, separando aqueles que ainda não possuem as pernas daqueles que já possuem, alojando estes nos tanques de metamorfose, até que surjam os braços, período que dura cerca de 75 dias (PLANETA DE AGOSTINI, 1998).

O surgimento dos braços indica o início da fase G4, sendo que nessa fase os girinos param de se alimentar e absorvem toda a cauda, que é sua reserva energética, até que seu trato digestório seja modificado. Após este período, com duração de 7 a 10 dias, os animais passam a ser chamados de imagos. São retirados então dos tanques e levados para as baias de engorda (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013). Como o seu hábito alimentar é onívoro, passam a se alimentar de tudo que possam raspar com seu aparato bucal, como algas, vegetais, zooplâncton e outros.

3.5 SISTEMAS DE PRODUÇÃO

Diferentes sistemas de produção foram elaborados ao longo do tempo, sendo que dentre eles, pode-se citar o desenvolvido por Luiz Dino Vizotto, considerado “Pai da Ranicultura Brasileira”, que propôs o sistema de baias estreitas, com projeção em forma de plataforma em uma das laterais, onde eram depositados substratos orgânicos para atrativos de moscas (VIZOTTO, 1975).

Dorival Fontanello propôs o sistema tanque-ilha, utilizando baias com uma ilha central, onde eram depositados produtos orgânicos para a proliferação de insetos (FONTANELLO, 1980). Já Alves de Oliveira propôs um sistema de confinamento, composto de baias de alvenaria, com alta densidade e seleção periódica de rãs pelo tamanho, com uma área alagada de 25% (OLIVEIRA, 1983).

O sistema inundado descreve os sistemas de Haroldo Aguiar, com a criação do Ranabox, sistemas de baias com dimensões menores, muito utilizadas experimentalmente. Na

produção comercial, o Ranabox possui algumas falhas que dificultam a sua viabilidade econômica, como dificuldades de manejo nas baias espaço reduzido para os animais entre outros. Além desse sistema, existe também o sistema Rana Piscina descrito por Luiz Carlos Dias Faria, o qual consiste na criação de rãs em piscinas de lona. Nesse sistema inundando, é permitido uma densidade de 100 a 400 animais/m² (MELLO, 2001; FERREIRA; PIMENTA; PAIVA NETO, 2002).

3.6 CATEGORIAS DE PRODUÇÃO E DIVISÃO DE FASES

3.6.1 Manutenção de Reprodutores

A manutenção de reprodutores são as baias onde os animais, principalmente os reprodutores, ficam alojados para se recomporem do período de acasalamento. Em geral, esse período leva cerca de 6 meses, em condições favoráveis de temperatura e alimentação. Esse período e lugar são importantes para que as fêmeas desenvolvam suas gônadas e estejam preparadas com uma quantidade de ovócitos considerável para fazer acasalamento novamente (CASALI, 2015).

3.6.2 Girinos

A engorda dos girinos pode ocorrer em tanques de terra, em tanques de alvenaria e de lona plástica. Segundo Lima e Agostinho (1992), não há grande diferença na engorda entre os ambientes de cultivo.

A densidade utilizada em tanques artificiais é de 1 girino a cada 2 L de água. Já para os tanques naturais tem-se utilizado 1 girino para cada 3 L de água. O período de engorda leva cerca de 75 dias, a partir do momento em que as patas inferiores começam a se desenvolver. Nesse ponto, é realizada a despesca do tanque, transferindo os animais para os tanques de alvenaria, para que realizem a metamorfose (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013; CASALI, 2015).

Os tanques de engorda para rãs são relativamente pequenos quando comparados com os de engorda de camarões ou peixes. A maioria possui em torno de 30 a 40 m², e são equipados com caixa de despesca. Assim, quando a água é toda drenada os animais ficam na caixa tornando mais fácil e ágil o processo (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013).

Antes de receberem os girinos, os tanques passam por um manejo, sendo retirado o excesso de lodo na caixa, cortado a grama em volta e demais manutenções necessárias. Cerca

de dez dias antes de alojar os animais é realizada a preparação do mesmo, utilizando calcário na proporção de 100 g/m² e adubo orgânico na proporção de 200 g/m² (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013).

3.6.3 Recria e Engorda

A engorda das rãs é realizada em baias com tamanhos que variam de 12 a 40 m² aproximadamente, sendo todas com o fundo revestido com cerâmica para melhorar sua limpeza e evitar que o piso cause lesões nos animais. A densidade final varia de 80 a 100 animais/m² em cada baia, variando de acordo com o sistema adotado, sistema de tanque ilha ou sistema inundado (CASALI, 2015).

Quando chegam ao ranário, antes de serem soltos nas baias de recria, os animais passam por um banho de iodo para a desinfecção, em seguida são alojados nas baias entre 800 e 1200 imagos. Conforme ocorre o crescimento, o produtor seleciona os animais maiores transferindo-os para as baias de engorda definitivas (OLIVEIRA, 1983).

Com o intuito de melhorar os sistemas de cultivo, Lima, Cruz e Moura (1999), adotaram sistemas com baias feitas de lonas PVC, e também realizaram mudanças nos cochos de alimentação com sistema de vibração. Já para Mazzoni (1997) esse sistema sofreu mudanças, passando a utilizar o sistema inundado, utilizando ração de peixe extrusada, lançada diretamente na água.

3.6.4 Nutrição

3.6.4.1 Nutrição de Girinos

A rã-touro possui uma vasta gama de alimentos conforme sua fase de vida. Os girinos possuem uma característica de hábito alimentar considerado detritívoro ou herbívoro, sendo as algas a principal fonte de alimento no ambiente natural nas fases iniciais (SCHOONBEE; PRINSLOO; NXIWENI, 1992).

Para alcançar bons resultados, o crescimento dos girinos depende muito da qualidade e quantidade de alimento ofertado, da composição nutricional do alimento, e também da qualidade de água, sendo que esses fatores influenciam diretamente no cultivo (SIPAÚBA-TAVARES; MORAIS, STÉFANI, 2008).

Estudos indicam necessidades de proteína bruta (PB) variando de 22 a 40% na ração, resultados experimentais demonstram níveis de PB de 28, 32, 36, 40%, os quais foram

aumentando gradativamente no período de engorda, sendo a cada 15 dias realizada biometria, e aumentado o nível de proteína na ração (SEIXAS FILHO *et al.*, 2013).

Outros estudos relatam que a porcentagem de proteína digestível (PD), a quantidade que realmente o animal consegue assimilar e converter em músculo, que melhor apresentou resultado foi de 27 % de PD sendo esta de origem animal, apresentando melhores resultados com a conversão alimentar, sobrevivência e aceitação de alimento. Abaixo desse teor de PD, os animais tiveram uma deficiência, portanto procurando mais alimento para saciar a taxa de proteína, e acima deste valor houve uma deformação dos animais durante o desenvolvimento, ocasionando em morte e perdas, o que não é interessante em produções comerciais. Portanto teores de PD são fatores a serem observados, pois uma dieta pode conter altos teores de PB e baixos teores de PD, não sendo interessante ao cultivo, pois eleva o custo de produção (PINTO, 2014).

Em geral, os girinos aceitam bem alimento de fonte externa, alcançando bons resultados com o uso de ração ou a combinação de ração mais alimento natural (CARMONA-OSALDE *et al.*, 1997). No Brasil não são encontradas rações comerciais específicas para rãs. No departamento de conservação de Missouri nos Estados Unidos, relata-se a alimentação de girinos com ração de coelhos e utilização de espinafre como complemento. Outras recomendações incluem ração para peixe e também legumes e frutas como por exemplo: tomate, abóbora, beterraba, folhas de alface, entre outros (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013; CASALI, 2015).

3.6.4.2 Nutrição de Rãs

A rã-touro na fase adulta possui hábito alimentar considerado como carnívoro restrito, sendo exigente em proteína de origem animal. Ela somente se alimenta de alimentos vivos, que possuam movimento. Isso se torna um problema na criação, pois no início dos cultivos no Brasil eram alimentadas com larvas de moscas, minhocas, girinos, camundongos, entre outros, causando inviabilidade na produção (OLIVEIRA *et.al*, 2009).

A partir da criação do sistema de anfigranja sendo baias pequenas com uma alta densidade de animais confinados. para a engorda dos animais passou a ser utilizada ração comercial em complemento com larvas. Como a ração não possui movimento, era ofertada junto com as larvas, as quais criavam certo movimento, estimulando a captura pelas rãs (LIMA; AGOSTINHO, 1984).

Um grande avanço no desenvolvimento da cadeia ranícola foi a utilização da ração extrusada. Essa técnica foi desenvolvida na China e implantada na América do Sul por Mazzoni et al (1995), que transformou a área alagada em que os animais ficavam em um comedouro aquático, no qual o próprio movimento das rãs causa o movimento na ração estimulando assim a predação (OLIVEIRA *et. al.*, 2009).

O consumo diário de ração varia conforme o tamanho do animal, fase de crescimento e a temperatura do ambiente e da água, conforme apresentado nas tabelas 2 e 3 abaixo.

Tabela 2: Taxa de Consumo Alimentar Diário Conforme a Biomassa de Girinos.

*PESO MÉDIO	CONSUMO ESTIMADO DE RAÇÃO
0,1 g	10%
0,2 g	9%
1,0 g	8%
3,0 g	7%
4,0 g	5%

Fonte: Lima e Agostinho, 1988.

Tabela 3: Taxa Consumo Alimentar Diário Conforme a Biomassa de Rãs.

*PESO MÉDIO	CONSUMO ESTIMADO
Até 10 g	12%
Até 20 g	11%
Até 30 g	10%
Até 50 g	9%
Até 65 g	8%
Até 90 g	7%
Até 110 g	6%
Até 150	5%
Acima de 150 g	5%

Fonte: Lima e Agostinho, 1988.

3.6.4.3 Alimentação com Espinafre

O espinafre *Spinacia oleracea* utilizado na alimentação possui efeito antioxidativo. Segundo Pieniz *et al.* (2008) em testes realizados para oxidação de fígado de rato, utilizando como alimento frutas e hortaliças, dentre as quais inclui-se o espinafre, observou-se que este último foi o que mais se destacou no poder de redução da peroxidação lipídica hepática entre os tratamentos, tanto utilizado cru como cozido, com e sem adição de ferro para indução de oxidação lipídica hepática.

Segundo Melo *et al.* (2006) o poder antioxidante do espinafre se dá devido à alta concentração de produtos fenólicos que, segundo testes do mesmo autor, em uma amostra de 0,03 a 0,4 g de amostra de espinafre refogado diluído em 0,1mL, resultou em 112,18 µg/0,1ml, e uma porcentagem de inibição da oxidação acima de 70%. Segundo Ou *et al.* (2002), dentre os vegetais com capacidade de sequestrar radicais livres, a maior ação antioxidante foi do espinafre, seguido pela cebola roxa, e couve-flor. A tabela 4 demonstra a composição básica do espinafre cozido em uma porção de 100 gramas.

Tabela 4: Composição Nutricional do Espinafre *Spinacia Oleracea*, segundo o Departamento de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina.

Componentes Principais	Unidade	Porção de 100 g.
Água	G	91,40
Valor Energético	Kcal	23
Proteína	G	2,86
Gorduras totais	G	0,39
Carboidratos	G	3,63
Fibra alimentar	G	2,2
Monossacarídeos	G	0,42
Minerais		
Cálcio	Mg	136
Ferro	Mg	3,57
Magnésio	Mg	87
Fósforo	Mg	56
Potássio	Mg	466
Sódio	Mg	70
Zinco	Mg	0,76
Vitaminas		
Vitamina C, ácido ascórbico	Mg	9,8
Vitamina B6	Mg	0,242

Ácido fólico	µg	146
Vitamina A	µg	524
Vitamina E	Mg	2,08
Vitamina K	µg	493,6
Lipídios		
Gorduras saturadas	G	0,043
Gorduras monoinsaturadas	G	0,006
Gorduras poli-insaturadas	G	0,109

Fonte: UNIFESP. Escola Paulista de medicina. Departamento de Informática em Saúde. Escola Paulista de Medicina, 2016.

3.6.4.4 Alimentação com Ração de Coelho

A cunicultura nada mais é que a denominação da criação de coelhos. Estes possuem habito alimentar herbívoro, necessitando de uma alimentação equilibrada conforme suas exigências nutricionais (MACHADO *et al.*, 2011). Os coelhos na fase de engorda, segundo pesquisas nacionais, demonstram que necessitam entre 16% a 18% de PB na formulação de ração (FERREIRA *et al.*, 2006).

Por possuir essa característica, a principal fonte de proteína na ração é de origem vegetal, sendo, o farelo de soja uma das fontes mais usadas, caracterizado por ter um bom balanço entre aminoácidos e também uma boa fonte de lisina. Outras fontes de proteínas também estão sendo testadas como, por exemplo: farelo de girassol, farelo de algodão, farelo de amendoim, e também farelo de canola, sendo alguns como fonte de proteína e outros como fontes de fibra (MACHADO *et al.*, 2011).

4 JUSTIFICATIVA

Alguns fatores podem limitar a cadeia ranícola, sendo um dos principais a falta de conhecimento sobre técnicas de manejo, principalmente na fase de girinagem. Essa fase é extremamente importante, pois ela visa produzir imagos de boa qualidade e em grande quantidade para a engorda (CASTRO & PINTO 2000; SOARES, *et al.*, 2001).

A sobrevivência dos girinos e o tempo da metamorfose, juntamente com o crescimento, são influenciados diretamente pela competição por alimento, qualidade e quantidade destes, além da qualidade de água no cultivo (BROWNE; POMERING; HAMER, 2003).

A taxa de mortalidade de girinos é, em média, cerca de 30%, sendo que um dos principais fatores que interferem na mortalidade é a deficiência alimentar, juntamente com a qualidade de água, além das práticas de manejo, principalmente nas primeiras semanas devido ao período de adaptação (LIMA; AGOSTINHO, 1992).

A fase de girinagem é um dos grandes problemas enfrentados pela cadeia da ranicultura, isso devido a necessidade de alterações no sistema de produção ocasionada por doenças e mortalidade decorrente dos procedimentos adotados. Nesse sentido, o principal procedimento identificado é a administração de alimentos inadequados, devido à falta de conhecimento sobre as exigências nutricionais das rãs, gerando deficiências no desenvolvimento das mesmas (SEIXAS FILHO, *et al.*, 2011).

A eficiência no cultivo de girinos passa obrigatoriamente pelo fornecimento de uma dieta que satisfaça as necessidades nutricionais para a obtenção de um crescimento adequado. A concentração de nutrientes na ração é um dos parâmetros que deve ser levado em consideração, pois interfere diretamente no desenvolvimento (NAVARRO *et al.*, 2007).

Uma das principais fontes de alimento utilizada na ranicultura é a ração para peixe, a qual possui como principal fonte de proteína de origem animal a farinha de peixe. A ração por sua vez, apresenta baixa eficiência, devido ao hábito vegetariano das rãs nesta fase de desenvolvimento, períodos de produção variada e alto custo, gerando uma elevação no custo de produção para o ranicultor (ALBINATI *et al.*, 2000). Para Lima e Agostinho (1992) o custo com a ração representa cerca de 57% do total da produção, com isso a implantação de uma alternativa mais barata, como o espinafre que é de fácil cultivo, pode trazer uma rentabilidade maior ao produtor, e com os mesmos resultados, comparados com sistemas tradicionais em que são alimentados somente com ração tornando assim a cadeia de produção mais rentável economicamente.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico de girinos de rã-touro com dietas de fontes alimentares alternativas à ração para peixe, buscando melhorar o desempenho e reduzindo o custo de produção. Para isso, descreve-se a seguir os principais materiais e métodos a serem utilizados para o desenvolvimento da pesquisa.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no laboratório de Patologia do departamento de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, *Campus* Laranjeiras do Sul, na cidade de Laranjeiras do Sul- PR, após a submissão à Comissão de Ética no Uso de

Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), certificado CR025/CEUA/UFFS/2016.

5.1 ENSAIO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 76 animais - provenientes de uma mesma desova, os quais foram adquiridos em ranário comercial na fase de girino - G1. Os girinos foram pesados e estocados, sendo que a pesagem ocorreu de forma aleatória de 10 animais realizando uma média de peso, posteriormente sendo divididos em 15 animais por tratamento, os animais pesados foram colocados em outro recipiente e a média do grupo foi utilizada para a divisão nos aquários individuais e 4 animais por tratamento agrupados, cultivados em um aquário por tratamento.

Os animais foram mantidos em densidade de 01 animal por litro. Para os tratamentos individuais, os animais foram dispostos em aquários montados com garrafas descartáveis, com 01 litro de água, distribuídos ao acaso. Para os tratamentos agrupados, foi disposto 4 animais por tratamento, em aquário de 4 litros. Após a aclimatação de 3 dias, o experimento foi desenvolvido no decorrer de 40 dias, com acompanhamento do desenvolvimento dos girinos durante a passagem das fases G1, G2 e G3.

Os girinos em estágio de G1 foram distribuídos em quatro tratamentos de fornecimento de ração conforme segue:

- Tratamento 01: Ração comercial de peixes 24% PB, representado pelas letras RP, e acréscimo da letra A para tratamentos agrupados;
- Tratamento 02: Ração comercial de coelho 13% PB, representados pelas letras RC, e acréscimo da letra A para tratamentos agrupados;
- Tratamento 03: Ração de peixe 24% PB juntamente com espinafre (em proporção de 50% do peso), representados pelas letras RPE, para individuais e RPEA para tratamentos agrupados.
- Tratamento 04: Ração de coelho 13% PB juntamente com espinafre (em proporção de 50% do peso), representados pelas letras RCE, para individuais e RCEA para tratamentos agrupados.

A composição alimentar utilizada está disposta no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1: Composição dos itens alimentares utilizados nas rações dos girinos (%).

Alimentos	Umidade	Proteína	Fibra
Ração de coelho	12	13	18

Ração de Peixe	12	24	10
Espinafre seco (HUSSIAM et al. (2009))	11,96	23,7	7,92
Ração de coelho mais espinafre (estimado 1:1)	14	18,35	12,96
Ração de Peixe mais espinafre (estimado 1:1)	14	23,85	8,96

Fonte: Elaborado pelo autor 2016.

Para o fornecimento do espinafre, o mesmo passou por um processo de liofilização. Este processo consistiu em retirada das folhas, que passaram por uma lavagem, trituração, congelamento e liofilização.

A alimentação foi fornecida 2 vezes ao dia, com taxa inicial de 10 % da biomassa diária, corrigida com 20 dias, após a realização de biometria, conforme Lima e Agostinho (1988). Devido à perda de animais durante o manejo de pesagem, foram realizadas apenas três biometrias: 1) a inicial, utilizando amostragem; 2) intermediária, pesando todos os animais após 20 dias de cultivo; 3) final, de todos os animais ao final do período de ensaio. Após a segunda biometria, e juntamente com a observação do hábito alimentar dos animais durante o experimento (ausência de sobra de ração), identificou-se necessidade de aumento da taxa de alimentação de 10 para 15% da biomassa diária.

Para verificação dos animais, o comportamento alimentar foi observado após cada fornecimento da ração, por um período de 5 minutos, assim como foi realizada observação das fezes dos animais. Segue abaixo o Quadro Geral 2 do desenho experimental.

Quadro 2: Desenho Experimental da pesquisa. N: número de indivíduos por aquário

Aquários Cultivos Individuais por Tratamento														
RP 01 N: 01	RP 02 N: 01	RP 03 N: 01	RP 04 N: 01	RP 05 N: 01	RP 06 N: 01	RP 07 N: 01	RP 08 N: 01	RP 09 N: 01	RP 10 N: 01	RP 11 N: 01	RP 12 N: 01	RP13 N: 01	RP14 N: 01	RP 15 N: 01
RC 01 N: 01	RC 02 N: 01	RC 03 N: 01	RC 04 N: 01	RC 05 N: 01	RC 06 N: 01	RC 07 N: 01	RC 08 N: 01	RC 09 N: 01	RC 10 N: 01	RC 11 N: 01	RC 12 N: 01	RC13 N: 01	RC14 N: 01	RC 15 N: 01
RPE 01 N: 01	RPE 02 N: 01	RPE 03 N: 01	RPE 04 N: 01	RPE 05 N: 01	RPE 06 N: 01	RPE 07 N: 01	RPE 08 N: 01	RPE 09 N: 01	RPE 10 N: 01	RPE 11 N: 01	RPE 12 N: 01	RPE 13 N: 01	RPE 14 N: 01	RPE 15 N: 01
RCE 01 N: 01	RCE 02 N: 01	RCE 03 N: 01	RCE 04 N: 01	RCE 05 N: 01	RCE 06 N: 01	RCE 07 N: 01	RCE 08 N: 01	RCE 09 N: 01	RCE 10 N: 01	RCE 11 N: 01	RCE 12 N: 01	RCE 13 N: 01	RCE 14 N: 01	RCE 15 N: 01
Aquários Cultivos Agrupados por Tratamento														
RPA N: 04				RPEA N: 04				RCA N: 04				RCEA N: 04		

Fonte: Elaborado do pelo autor, 2016.

Durante período de aclimação e de experimento, os aquários foram mantidos em temperatura de 27 °C, em ambiente climatizado. A temperatura foi aferida diariamente. A qualidade de água dos ensaios foi mantida dentro de parâmetros aceitáveis relativo às variáveis Amônia (0,5 mg/L), Nitrito (0,5 mg/L), Nitrato (1,0 mg/L), OD (>4 mg/L), pH (6,5-7), dureza (40 mg/L), alcalinidade (40 mg/L). A renovação de água foi realizada diariamente com a troca de 100% do volume total, pelo período da manhã.

Os dados de identificação de estágio de desenvolvimento dos girinos e número de mortes foram registrados diariamente. Ao final do período do experimento foi realizada a biometria e coleta de fígado, músculo e intestino para as análises bioquímicas.

5.1.2 Análises De Crescimento

Para a análise de crescimento desta pesquisa, foram realizadas pesagens dos animais ao início e ao final do experimento. A taxa de ganho de peso foi calculada através da fórmula:

$$\text{Taxa de Ganho de Peso} = \left(\frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{\text{Peso Inicial}} \right) \times 100$$

5.1.3 Determinação Dos Parâmetros Metabólicos

5.1.3.1 Análise de Proteína

A quantificação de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976). Esta análise foi realizada para correção das atividades enzimáticas e LPO em relação ao conteúdo proteico da amostra.

5.1.3.2 Determinação do Conteúdo de Glicogênio

Para determinação do conteúdo de glicogênio muscular e hepático, foram utilizados o músculo e fígado removidos dos girinos de rã-touro, após o período de suplementação na dieta. Os tecidos foram pesados e homogeneizados com tampão PBS pH 7,2, sob fervura a 100 °C por 20 minutos.

Após a fervura, foi adicionado etanol 95% e novamente as amostras foram submetidas à fervura, seguida de banho de gelo para precipitação do glicogênio. As amostras foram então centrifugadas a 1300 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado

solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo tratamento com reagente de iodo e posterior leitura em espectrofotômetro a 460 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido comparados com curva padrão de glicogênio (KRISMAN, 1962).

5.1.3.3 Atividade de Aminotransferases ou Transaminases

O fígado e músculo de girinos de rã-touro foram utilizados para as dosagens bioquímicas de aspartatoamino-transferase (TGO-AST) e alanina-aminotransferase (TGP-ALT) utilizando kits comerciais (Gold Analisa®) e seguindo as instruções do fabricante.

5.1.3.4 Sistema Antioxidante

5.1.3.4.1 Enzima Catalase (CAT)

A atividade da Catalase (CAT) foi acompanhada pelo decréscimo da absorvância a 240 nm (AEBI, 1984), a partir do princípio de dismutação do peróxido de hidrogênio, cujo coeficiente de extinção molar é de $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. As duplicatas, em 2 mL de solução em uma cubeta de quartzo a 25 °C, apresentaram concentração final de 0,01 mg de proteína.mL⁻¹, sendo que o meio de reação apresentou concentrações finais de 13,5 mM de H₂O₂, 50 mM de TRIS-HCl pH 8,0 e 0,25 mM de EDTA. Os resultados da atividade da enzima catalase foram expressos em mmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

5.1.3.4.2 Marcador de Dano – Lipoperoxidação (LPO)

A determinação da reação de LPO foi realizada com objetivo de quantificar indiretamente os peróxidos, refletindo assim a intensidade da peroxidação lipídica (Lushchak et al., 2009). Foi realizado o método de TBARS (BUEGE; AUST, 1978), realizando comparações de absorvância com curva de padrões de Malondialdeído (MDA), principal subproduto de peroxidação lipídica celular.

Para preparação da amostra o meio contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína da amostra em ácido tricloroacético (TCA) 6,7% em volume final de 180 µL, foi agitado em vórtex, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000 xg a 4 °C. Para a dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 40 µL do sobrenadante, assim como de diferentes concentrações de MDA foram adicionados em microplaca, em triplicata, a meio de reação contendo 21,42 mM de TBA, 17,86 mM de NaOH

(utilizado para solubilização do TBA), 0,73 M de TCA, 0,032 mM de BHT, etanol 3% (utilizado para solubilização do BHT) em PBS. A leitura da reação foi realizada à 22 °C, após 60 minutos de incubação a 60 °C, em uma absorvância de 535 nm. Os resultados da peroxidação lipídica foram expressos em nmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

5.1.3.5 Enzimas Digestivas

Para a determinação da atividade das enzimas digestivas do intestino, os animais foram alimentados e após 40 minutos foram anestesiados em gelo e sacrificados. Foram coletados os intestinos inteiros, pesados e homogeneizados em solução salina, com um volume (mL), cerca de 10 vezes o peso do órgão (g).

Após, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg a temperatura de 4 °C por 10 minutos, retirado o sobrenadante, e congelados a -85 °C para posterior análise.

5.1.3.5.1 Amilase

A dosagem da enzima amilase foi realizada segundo instruções do fabricante do KIT para alfa amilase (VIDA Biotecnologia®), adaptada para microplaca de 96 poços. Para tanto, 250 µL de reagente foi adicionado a 5 µL de homogenato diretamente nos poços e acompanhada a reação diretamente na leitora de microplaca, em temperatura de 25 °C, durante 4 minutos, em intervalos de um minuto, em comprimento de onda de 405 nm. O cálculo da velocidade da reação foi realizado através da média das variações de absorvância nos intervalos de leitura, multiplicado pelo fator 9864 (específico para a temperatura de incubação) e corrigido pelo conteúdo de proteína na amostra. A expressão dos resultados foi apresentada em U.L⁻¹.mg de proteína⁻¹.

5.1.3.5.2 Dissacaridases (*Maltase, Lactase e Sacarase*)

A dosagem das dissacaridades foi realizada em microplaca de 96 poços. As amostras foram pré-incubadas contendo 50 µL de homogenato e 20 µL de tampão maleato (1,16 g de ácido maleico e 15,3 mL de NaOH 1M em 100 mL de água destilada), por 05 minutos a 25 °C. Posteriormente, a reação foi iniciada com a adição de 30 µL de substrato específico para cada dissacaridase (maltose, lactose e sacarose) em concentração de 0,112 µM, em tampão maleato e incubada por 05 minutos.

Para a identificação da atividade foi realizada a dosagem de glicose ao final do período de incubação, utilizando kit comercial (Gold Analisa[®]), seguindo as instruções do fabricante. O cálculo da velocidade da reação foi realizado através da variação da concentração da glicose corrigido pelo tempo de incubação e conteúdo de proteína na amostra. A expressão dos resultados foi apresentada em Unidade/ mg de proteína. A unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de um μmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

5.1.4 Testes Estatísticos

Os dados resultantes das diferentes análises dos animais submetidos a diferentes rações foram descritos como médias e desvio padrão. Foram realizados testes estatísticos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Bartlett) das amostras. Em casos em que os valores apresentaram distribuição normal, os grupos de diferentes tratamentos com ração foram avaliados por meio do teste ANOVA-fator único seguido de comparação de médias por teste de Tukey. Na ausência de distribuição normal ou homogeneidade de variâncias das amostras, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis. Para a amilase foi realizado o teste Mann – Whitney. O nível de significância utilizado foi equivalente a 0,05, utilizando programa estatístico (Assistat, 7.7 beta).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo inicial do presente estudo foi verificar se existe alguma diferença em relação a diferentes tratamentos dietéticos, tendo como base proteínas de origem animal e proteínas de origem vegetal, sabendo que os girinos de rãs-touro possuem o hábito onívoro com tendência a herbívoro, entendendo-se que há uma possibilidade de melhores resultados de produção utilizando-se ração com proteína de origem vegetal. Ainda, em caso de comprovação dessa hipótese, o produtor poderia reduzir seus custos com alimentação, utilizando como alternativa na dieta a adição de espinafre produzido na propriedade.

Nos ensaios a temperatura da água foi mantida controlada em $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,33$. A qualidade da água manteve-se dentro dos parâmetros esperados sendo oxigênio 5 mg/L, pH 7,5, Amônia 0,10 mg/L, alcalinidade 45 mg/L e dureza 50mg/L.

Considerando que o principal aspecto estudado na qualidade e eficiência da ração na promoção de crescimento dos girinos, as rações foram, principalmente identificadas quanto ao teor total de proteína bruta identificada pelo fornecedor ou estimada, em cada tratamento.

Sendo assim, os animais tratados com ração de coelho receberam dieta com 13% de PB; os animais tratados com ração de peixe receberam dieta com 24% de PB; os animais tratados com ração de coelho e espinafre receberam dieta com 18% PB e os animais tratados com ração de peixe e espinafre receberam dieta com 23,85% de PB. Apesar da distinção em relação aos componentes da ração, buscou-se traçar uma comparação de eficiência da alimentação no crescimento e em parâmetros metabólicos nas condições do ensaio.

Foi observado durante o experimento, que o alimento ofertado estava sendo consumido completamente pelos animais uma vez que não havia sobras no ambiente de cultivo e foi possível identificar partes de espinafre e características das colorações das rações nas fezes dos animais alimentados assumindo-se então uma boa aceitação das dietas propostas.

6.1 RESULTADOS DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

Os valores de crescimento dos animais submetidos aos diferentes tratamentos estão descritos na forma de média e desvio padrão da taxa de ganho de peso nos diferentes grupos de tratamento (tabela 5 e figura 1), assim como a distribuição dos pesos finais após 40 dias de cultivo (figura 2). Devido à ausência de normalidade nos tratamentos, as taxas de ganho de peso foram avaliadas utilizando o teste de Kruskal Wallis, o qual demonstra que não houve variação significativa entre os tratamentos, seja considerando diferentes dietas dentro do ensaio de cultivo individual (RC, RCE, RP, RPE) ou dentro do ensaio de cultivo agrupados nos aquários (RCA, RCEA, RPA, RPEA). Analisando o mesmo tratamento em relação à dieta e comparando-se os ambientes de cultivos, individual e agrupados (RC x RCA, RCE x RCEA, RP x RPA, RPE x RPEA), também não foi observado variação significativa entre os tratamentos.

Ao identificar a origem dos maiores indivíduos, observa-se que os animais tratados com ração de peixe apresentaram as maiores taxas de ganho de peso, seja em ensaio de cultivo individual (RC - 700 mg, RCE - 1.100 mg, RP - 1.260 mg e RPE - 1.550 mg) ou em ensaio agrupados (RCA - 2.480 mg, RCEA - 1.290 mg, RPA - 4.310 mg e RPEA - 2.420 mg) (tabela 5). Neste caso fica evidente que os animais alimentados com ração de peixe apresentaram maior potencial de crescimento, mas isso não foi prontamente demonstrado devido a presença de animais com baixo ganho de peso em todos os grupos (RP - 150 mg, RPE - 75,6 mg, RPEA - 210 mg e RPA - 1.210 mg).

Quanto ao tipo de ambiente de cultivo, individual e em aquário agrupado, o formato do ensaio foi delineado com o intuito de identificar possível efeito da ausência de competição na taxa e na homogeneidade do crescimento. Nos resultados, observou-se taxas de ganhos de pesos mais homogêneas nos aquários individuais, constatados pelos menores desvios padrões em torno das médias (tabela 5 e figura 1), assim como na distribuição de pesos finais (figura 2). Porém observou-se que os maiores pesos e as maiores taxas de ganho de peso estão presentes em animais cultivados em aquários agrupados para todas as dietas, apesar de se encontrarem na mesma densidade (01 animal/L) e receberem a mesma quantidade de alimento diário (inicialmente 10% e posteriormente 15% da biomassa total do aquário) que os cultivos individuais. As grandes variações de crescimento encontradas, principalmente nos cultivos agrupados, impediram a identificação de variação significativa entre as taxas de crescimentos nos dois ambientes testados. Porém existe uma tendência que os animais cultivados em ambientes agrupados, apresentaram maior potencial de crescimento em relação ao ambiente individual. Sugere-se que este fato está relacionado a dois eventos: 1) Maior espaço de movimentação nestes ambientes; 2) Estimulo pela vantagem na competição pelo alimento oferecido (figura 2).

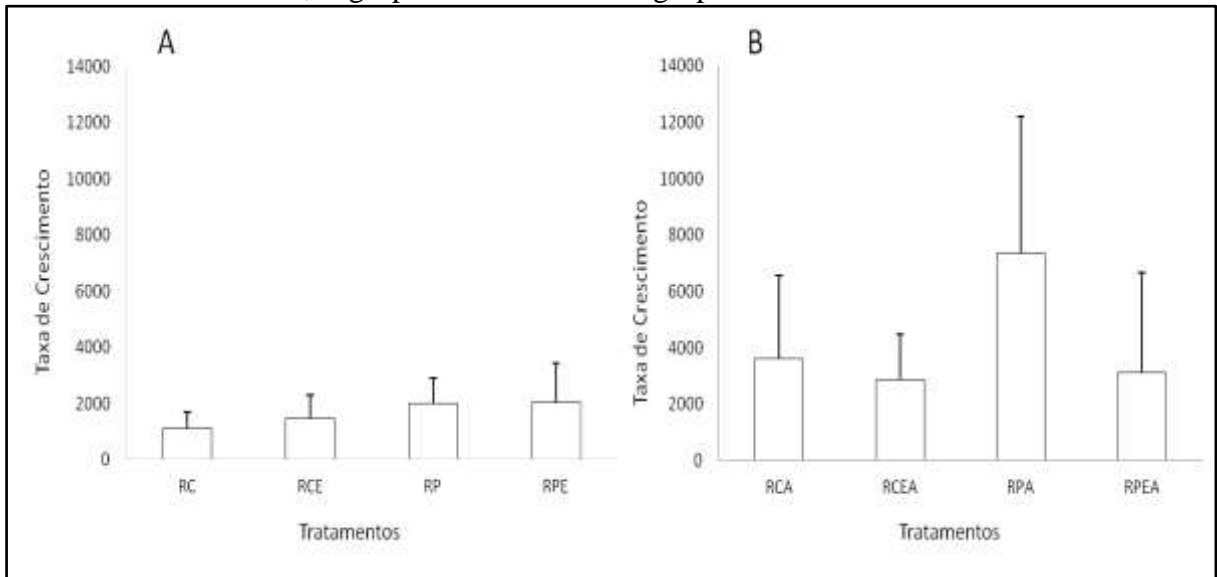
Apesar da evidência de maior potencial de crescimento em animais alimentados com ração de peixe, também foi observado menores taxas de sobrevivência nos grupos tratados com ração de peixe, com ou sem a adição de espinafre e nos dois ambientes de cultivo analisados (tabela 5).

Tabela 5: Taxa de ganho de peso (%), variação de pesos finais nos grupos de tratamento (g) e taxa de sobrevivência conforme cada grupo de Alimentação (%).

Tipos De Tratamento	Taxa de Ganho de Peso (%)	Variação de pesos finais por grupo entre menor e maior (g)	Taxa de sobrevivência (%)
RC	1.126 ± 582	48,3 - 700	100%
RCE	1.481 ± 825	65 - 1.100	100%
RP	2.002 ± 911	150 - 1.260	80 %
RPE	2.049 ± 1377	75,6 - 1.550	85%
RCA	3.607 ± 2932	150 - 2.480	100%
RCEA	2.873 ± 1596	200 - 1.290	100 %
RPA	7.359 ± 4850	1.210 - 4.310	75%
RPEA	3.125 ± 3534	210 - 2.420	75 %

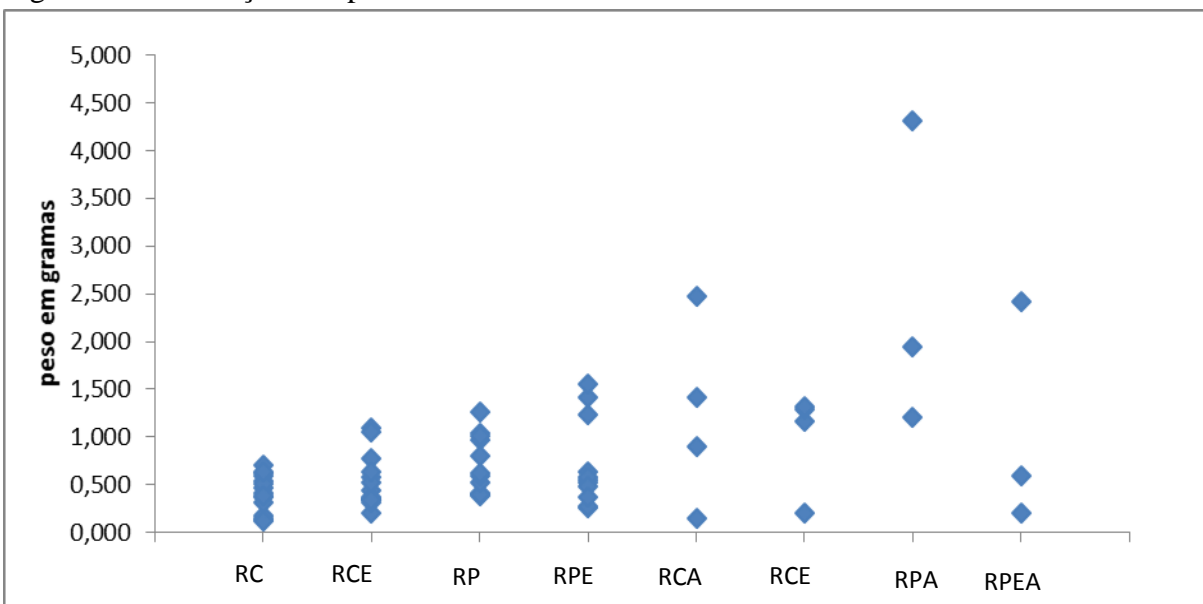
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 1: Média das taxas de crescimento entre os diferentes tratamentos. A: grupos de tratamentos individuais; B grupos de tratamentos agrupados.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 2: Distribuição dos pesos finais dos animais nos diferentes tratamentos.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

A mudança de fase dos girinos, G1 para G2 foi observada para todos os animais, porém a fase G3 foi observada somente em animais dos cultivos agrupados, sendo encontrados girinos G3 nos tratamentos RPA 66%, RPEA 66%, e RCEA 75%. Não houve mudança de fase no grupo RCA.

Na fase analisada, G2, os girinos possuem o hábito alimentar onívoro com tendência a herbívoro alimentando-se de todos os alimentos que conseguem raspar (PINTO, 2014).

Alguns trabalhos com a alimentação demonstram níveis de proteínas ideais para a obtenção de melhores resultados. Seixas Filho (2011) desenvolveu um trabalho no qual testou diferentes rações comerciais com teores de 22%, 24%, e 28% de PB, no qual a ração contendo 28% de proteína bruta apresentou o melhor resultado ao final de 60 dias de cultivo, com maior ganho de peso e menor mortalidade. As composições das rações comerciais utilizadas tiveram como fonte principal proteína de origem animal.

Segundo Barbosa (2005) que testou dietas confeccionadas com níveis de 33,6, 26,6, e 22,5 % de PB comparando com nível de 46,5 % de PB sendo a ração comercial, concluiu que o melhor desenvolvimento foi obtido com o nível de proteína comercial 46,5%, porém 32% dos girinos apresentaram algumas deformações nos membros como encurtamento, e conseqüentemente mortalidade dos animais. Os teores intermediários de 33,6 e 26,6% de PB apresentaram resultados semelhantes em relação a crescimento, porém não há resultados de mortalidade expressiva pois o número de mortos foi muito baixo. O tratamento com 22,5 % de proteína teve mais de 50% de mortalidade.

Outros experimentos com diferentes níveis de proteína sendo iniciado com um teor de PB e finalizado com um teor mais elevado demonstraram melhores resultados, em relação a custo com a ração e desempenho de crescimento, porém conversão alimentar foram os tratamentos contendo 28, 32, 36, e 40% de PB, e também o tratamento com 32, 36, 40, 45% de PB (SEIXAS FILHO, 2013).

O resultado do presente trabalho indica que animais tratados com ração de peixe (teores de proteína de 24 para RP e 23,8% RPE), tiveram maior potencial de crescimento, mas também apresentaram maior taxa de mortalidade. Por outro lado, as médias das taxas de ganho de peso dos grupos tratados com ração de coelho (teores de proteínas de 13% para RC e 18% para RCE) não apresentaram diferenças significativas de ganho de peso em relação aos demais grupos e apresentaram 100% de sobrevivência no período do ensaio. Apesar de estudos indicarem que o teor de proteína é o principal motivador do crescimento de girinos de rã-touro (SEIXAS FILHO 2011; BARBOSA, 2005; SEIXAS FILHO; 2013), os resultados indicam que a ração de coelho e a ração de coelho com espinafre, por não apresentarem diferença no desempenho dos girinos a ração de coelho fica em vantagem pois é mais barata tendo menor custo e utilizarem insumos da propriedade, podem ser consideradas boas alternativas para redução de custos na produção de girinos.

6.2 RESULTADOS DE PARÂMETROS METABÓLICOS

As análises bioquímicas foram desenvolvidas em três frentes de estudos, sendo: 1) Análise de possíveis alterações no metabolismo de aminoácidos em girinos, nos diferentes grupos de alimentação, utilizando como marcadores as análises de aminotransferases TGO e TGP; 2) Análise de possíveis alterações no sistema antioxidante utilizando a determinação da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico como marcador de Lipoperoxidação e a atividade da enzima Catalase como indicação de possíveis alterações na defesa antioxidante; 3) Análise de possíveis alterações no metabolismo de carboidratos, identificando a atividade de enzimas digestivas de carboidratos (amilase, dissacaridases) e armazenamento de carboidratos com determinação da concentração de glicogênio.

6.2.1 Atividade de Aminotransferases

Para os animais, a principal forma de entrada do nitrogênio nas diferentes rotas metabólicas é através da alimentação, sendo que a proteína é a principal fonte (CAMPBELL, 2000). O primeiro passo no catabolismo de aminoácidos é a transferência ou a liberação de seu grupo alfa-amino através das reações de transaminação ou de desaminação oxidativa, respectivamente. O resultado destas reações, catalisadas por transaminases ou aminotrasferases, é a coleta de grupo amino principalmente na forma de glutamato. Este por vez funciona como doador de grupamento amino para síntese de aminoácidos não essenciais ou para eliminação (NELSON; COX, 2011).

A transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) também chamada Alanina aminotrasferase (ALT) catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o alfa cetoglutarato, com formação de piruvato e glutamato. A Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), também chamada Aspartato aminotransferase (AST) transfere grupamento amino do glutamato para o oxaloacetato, formando aspartato. Estas enzimas são importantes para diagnósticos de lesões cardíacas ou hepáticas causadas por alterações do metabolismo, e podem fornecer informações sobre a gravidade da lesão quando detectadas aumentadas na corrente sanguínea (NELSON; COX, 2011; ALVEZ, 2003).

Os valores das atividades das enzimas TGO e TGP no músculo e no fígado, encontrado nos diferentes grupos de alimentação, estão descritos na Tabela 6 (U.L⁻¹.mg de proteína⁻¹). Não foi observado variação das atividades das enzimas entre os diferentes grupos de alimentação, seja no ensaio de cultivo individual ou no ensaio de cultivo agrupado.

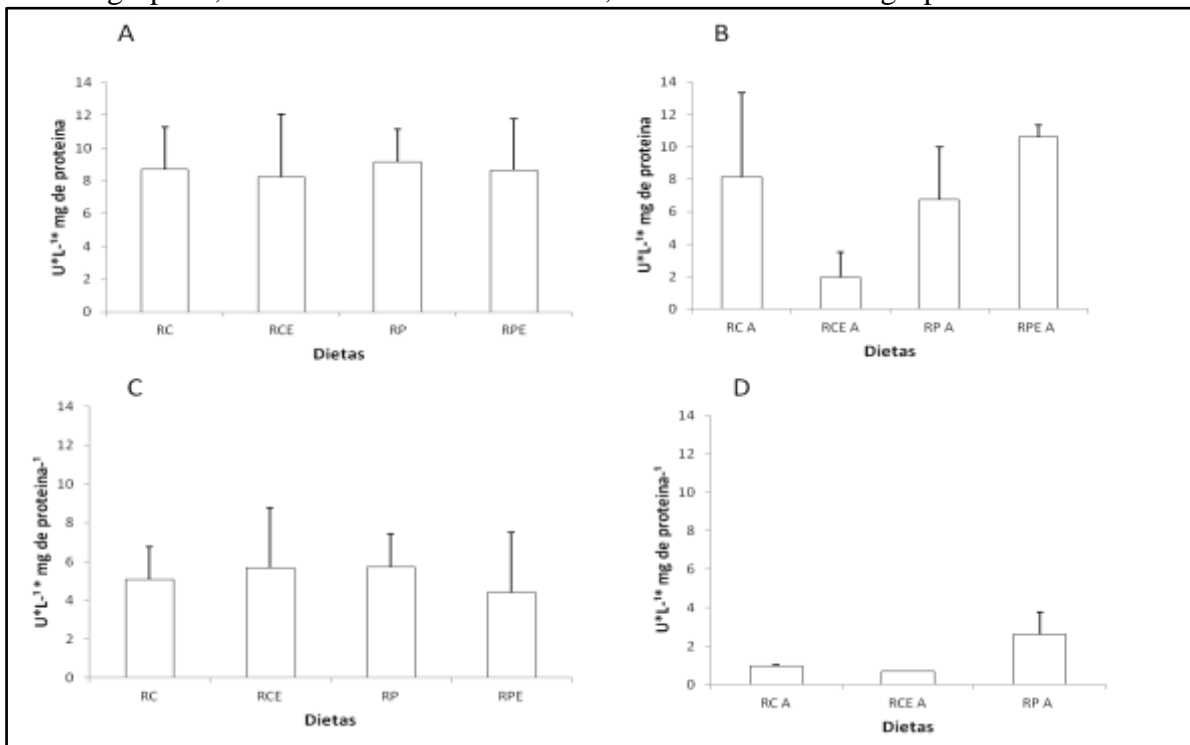
Observou-se, também, que o nível de atividade da TGP é diferente para os dois tecidos analisados, independente da alimentação utilizada, sendo superior para o tecido hepático ($8,94 \pm 2,8 \text{ U.L}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$) em relação ao músculo ($5,27 \pm 2,34 \text{ U.L}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$) conforme figura 3. Já para TGO os níveis de atividade foram semelhantes para os dois tecidos analisados (tabela 6 e figura 4).

Tabela 6: Atividade de TGP e TGO ($\text{U.L}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$) em fígado e músculo de girinos

Tipos de Tratamento		Valores de Média e Desvio Padrão	
		FÍGADO	MÚSCULO
TGP	RC	$8,71 \pm 2,55$	$5,09 \pm 1,67$
	RCE	$8,24 \pm 3,83$	$5,68 \pm 3,20$
	RP	$9,16 \pm 2,02$	$5,73 \pm 1,71$
	RPE	$8,68 \pm 3,10$	$4,41 \pm 3,09$
	RCA	$8,16 \pm 5,15$	$0,95 \pm 0,08$
	RCEA	$1,96 \pm 1,57$	0,68
	RPA	$6,74 \pm 3,23$	$2,60 \pm 1,18$
	RPEA	$10,60 \pm 0,75$	-
TGO	RC	$3,08 \pm 2,46$	$4,38 \pm 0,76$
	RCE	$4,48 \pm 1,17$	$4,19 \pm 0,85$
	RP	$3,54 \pm 1,07$	$3,65 \pm 0,97$
	RPE	$3,97 \pm 0,81$	$3,97 \pm 0,42$
	RCA	$4,22 \pm 1,82$	$3,11 \pm 2,28$
	RCEA	$3,34 \pm 1,08$	$1,48 \pm 0,45$
	RPA	$3,29 \pm 2,18$	$2,46 \pm 1,29$
	RPEA	$4,49 \pm 0,12$	1,92

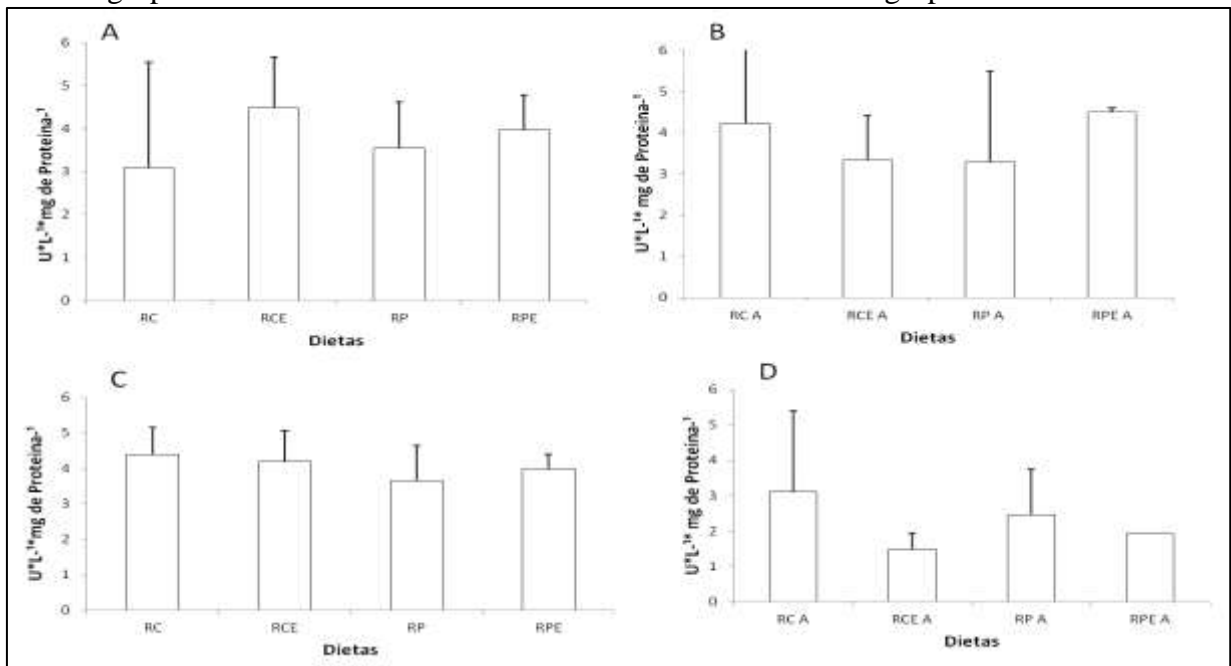
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 3: Atividade de TGP ($U.L^{-1}.mg \text{ de proteína}^{-1}$). A: Fígado ensaio individual; B: Fígado ensaio agrupado; C: músculo ensaio individual; D: músculo ensaio agrupado.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 4: Atividade de TGO ($U.L^{-1}.mg \text{ de proteína}^{-1}$). A: Fígado ensaio individual; B: Fígado ensaio agrupado; C: músculo ensaio individual e D: músculo ensaio agrupado.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Como estas enzimas tem papel importante no metabolismo de aminoácidos (NELSON; COX, 2011; ALVEZ, 2003), a ausência de variação nas atividades das enzimas

nos diferentes grupos de tratamento indica que as variações nos componentes da dieta não alteraram o metabolismo geral de aminoácidos dos animais.

6.2.2 Sistema Antioxidante

Em animais o estresse oxidativo está associada a fisiologia à vida aeróbica (RIBEIRO et al., 2005). O mecanismo de redução do oxigênio em mitocôndrias podem produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem danificar as células (NELSON; COX, 2011). São EROs o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, radical peroxil, oxigênio molecular. Essas espécies reativas quando em concentrações baixas tem como função atuarem como sinalizadores celulares (RIBEIRO et al., 2005), porém quando em altas concentrações provocam sérios danos às células, alterando os lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (RIBEIRO et al., 2005; NELSON; COX, 2011). Os animais apresentam mecanismos de defesa que neutralizam as EROs ou reparam os danos celulares por elas causados, mantendo o equilíbrio celular. Caso esses mecanismos de defesa não consigam reduzir a concentração de EROs nas células, ocorrem injúrias celulares, resultando no estresse oxidativo. Para o funcionamento do equilíbrio da defesa antioxidante a célula atua em duas linhas: sistema enzimático constituído do superóxido dismutase, catalase, e não enzimático glutaciona reduzida (RIBEIRO et al., 2005; FERREIRA, ALA et al., 1997).

6.2.2.1 Atividade da Enzima CATALASE

A Catalase é uma enzima que atua na remoção/decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A catalase previne a oxidação da glutaciona reduzida, além de inibir as lesões oxidativas diminuindo a formação de radical hidroxil (RIBEIRO et al., 2005).

A análise da atividade da enzima catalase foi realizada com o intuito de identificar possíveis efeitos do espinafre no sistema antioxidante dos girinos, pois esta enzima tem grande importância como marcador da alteração no sistema de defesa antioxidante e da capacidade de defesa antioxidante nos animais (ALVES, 2003).

Os valores da atividade da enzima Catalase no fígado e no músculo, encontrados nos diferentes grupos de alimentação, estão descritos na Tabela 7. No fígado não foi observado variação da atividade da enzima entre os diferentes grupos de alimentação, seja entre os grupos cultivados individualmente ou cultivados agrupados (figura 5). Para o músculo não foi realizada análise estatística devido ao grande número de animais cuja atividade enzimática não foi possível ser detectada (figura 5).

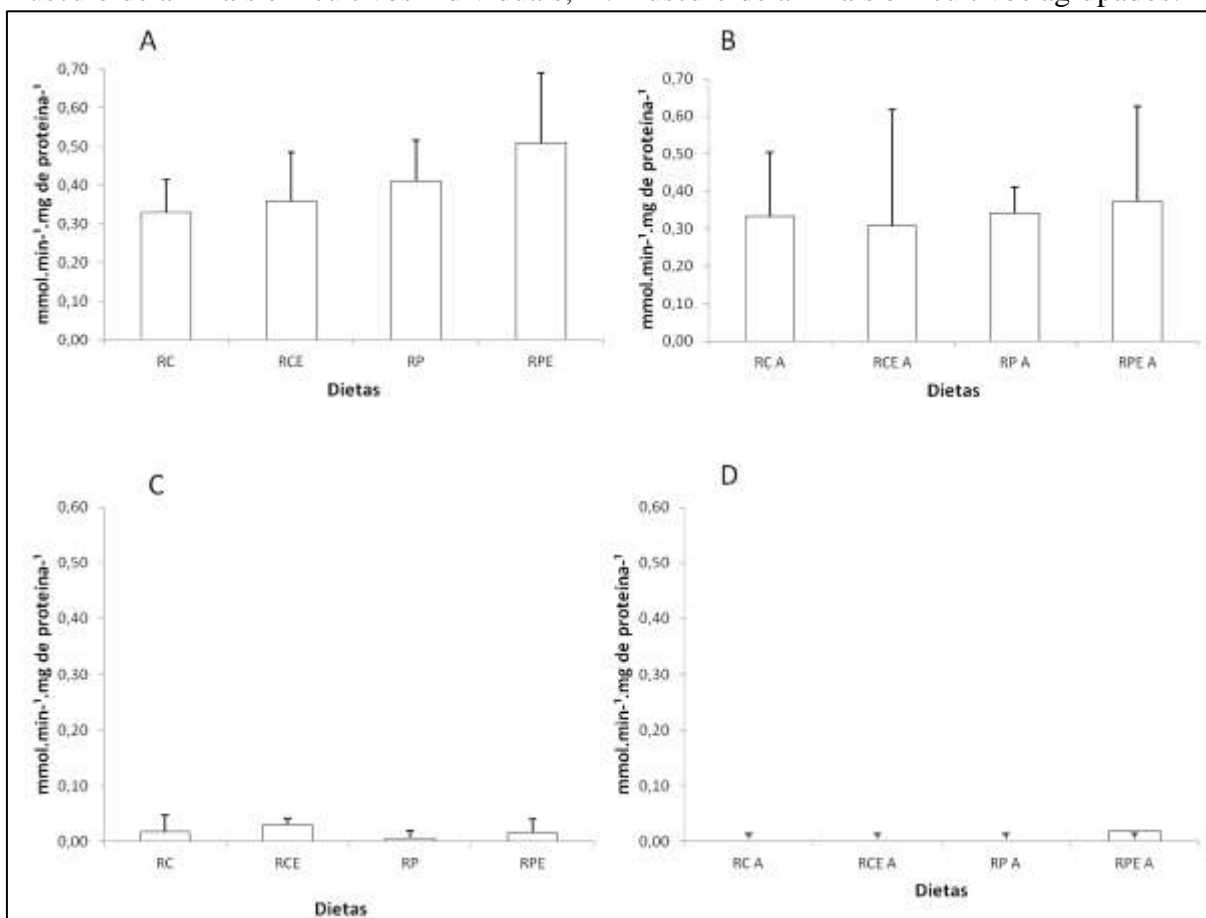
A atividade da enzima apresentou diferença entre os tecidos, sendo estas demonstradas nos gráficos onde o maior nível de atividade no tecido hepático ($0,362 \pm 0,159$ mmol de H_2O_2 degradado.mg de proteína⁻¹.minuto⁻¹), em relação ao músculo ($0,013 \pm 0,020$ mmol de H_2O_2 degradado.mg de proteína⁻¹.minuto⁻¹).

Tabela 7: Atividade da Catalase (mmol de H_2O_2 degradado.mg de proteína⁻¹.minuto⁻¹) em fígado e músculo de girinos.

Tipos de Tratamento	Valores de Média e Desvio Padrão	
	FÍGADO	MÚSCULO
RC	0,12 ± 0,03	0,02 ± 0,02
RCE	0,17±0,11	0,031±0,01
RP	0,22±0,14	0,006±0,01
RPE	0,17±0,09	0,017±0,02
RCA	0,13±0,07	Sem Atividade
RCEA	0,12±0,13	Sem atividade
RPA	0,13±0,03	Sem atividade
RPEA	0,15±0,10	0,019±0,02

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 5: Atividade da Catalase ($\text{mmol de H}_2\text{O}_2$ degradado. $\text{mg de proteína}^{-1}.\text{minuto}^{-1}$). A: Fígado de animais em cultivos individuais; B: fígado de animais em cultivos agrupados; C: músculo de animais em cultivos individuais; D: músculo de animais em cultivos agrupados.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Em relação a atividade da catalase, não foram encontrados dados de literatura em relação a alimentação de girinos, demonstrando a relevância destes resultados.,

6.2.2.2 Avaliação de Peroxidação Lipídica

O ácidos graxos na estrutura da membrana podem sofrer ataque de EROs, causando desestruturação de membranas e possível morte das células (NELSON; COX, 2011). A determinação dos níveis de LPO é utilizada como marcador de danos aos lipídeos de membrana e indica possíveis alterações na produção ou neutralização de EROs nas células.

Os valores de LPO no fígado e músculo, encontrados nos diferentes grupos de alimentação, estão descritos na tabela 8 ($\text{mM de MDA}.\text{mg de proteína}^{-1}$). Não foi observada variação dos níveis de LPO entre os diferentes grupos de alimentação, seja no ensaio de cultivo individual ou no ensaio de cultivo agrupado. No tecido hepático não foi observada diferença nos níveis de LPO dos animais dentro do mesmo grupo de alimentação cultivados

individualmente em comparação com os cultivados agrupados. Os resultados apresentados estão dispostos na figura 6 abaixo.

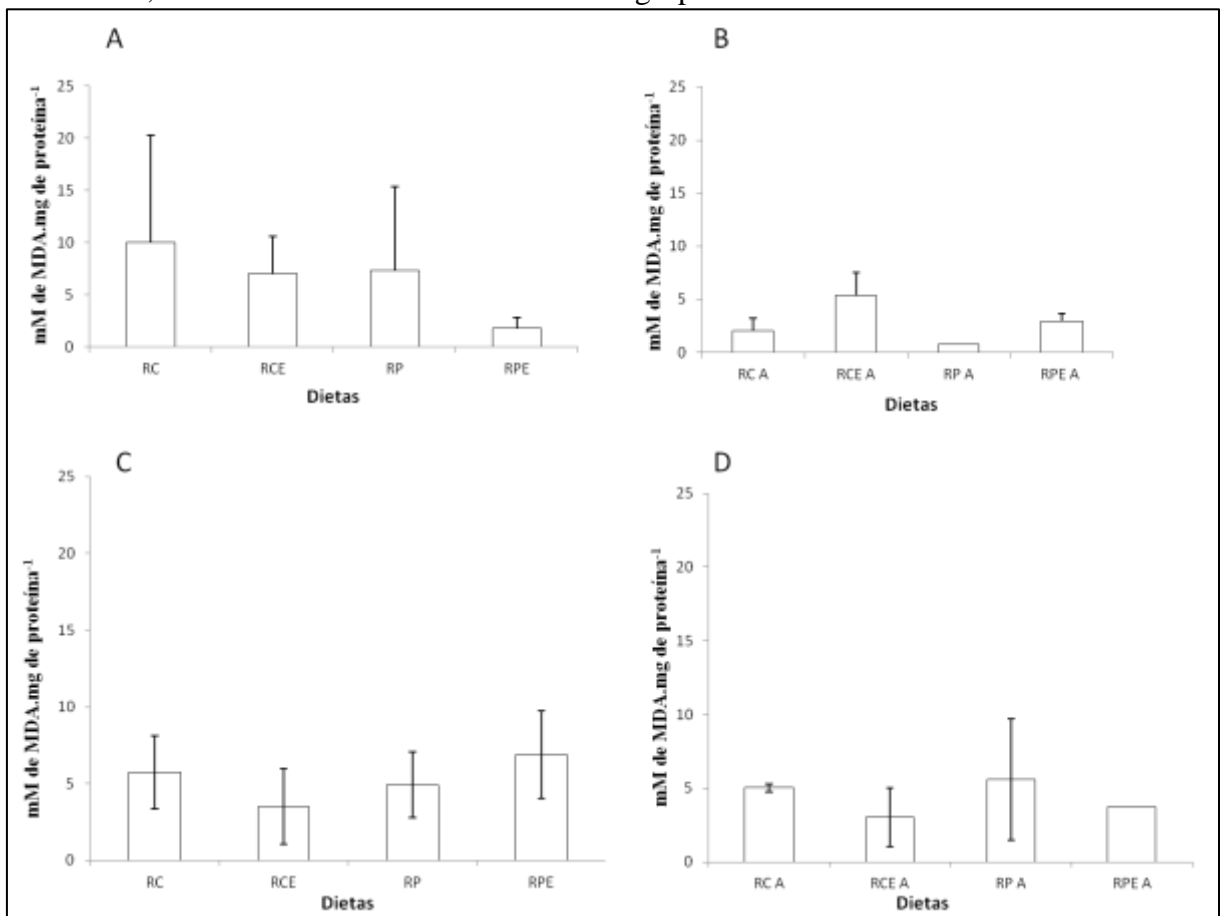
Os dados da literatura a respeito dos níveis de LPO em relação a alimentação em rãs ainda são ausentes

Tabela 8: Níveis de LPO (mM de MDA.mg de proteína⁻¹) em fígado e músculo de girinos.

Tipos de Tratamento	Valores de Média e Desvio Padrão	
	FÍGADO	MÚSCULO
RC	10,02±10,28	5,74±2,36
RCE	7,04±3,52	3,51±2,47
RP	7,32±8,02	4,93±2,12
RPE	1,79±1,05	6,88±2,85
RCA	2,01±1,21	5,02±0,27
RCEA	5,37±2,13	3,03±1,98
RPA	0,72	5,59±4,11
RPEA	2,96±0,68	3,76

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 6: Níveis de LPO (mM de MDA.mg de proteína⁻¹) A: Fígado de animais em cultivos individuais; B: fígado de animais em cultivos agrupados; C: músculo de animais em cultivos individuais; D: músculo de animais em cultivos agrupados.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

6.2.3 Atividades das Enzimas Digestivas

A compreensão do perfil enzimático das enzimas digestivas é de grande importância para avaliar a eficiência do alimento fornecido para os girinos sujeito a diferentes tipos de alimentos. De forma geral as enzimas digestivas possuem especificidade para o substrato e são sensíveis à temperatura, pH e determinados íons. Os girinos possuem uma característica de hábito alimentar considerado detritívoro ou herbívoro (SCHOONBEE; PRINSLOO; NXIWENI, 1992). A capacidade de digestão de carboidratos é devido ao hábito alimentar, em ambientes naturais se alimentam de algas e outros vegetais os quais possui uma considerável quantidade de carboidrato.

6.2.3.1 Amilase

A amilase é uma enzima que atua no sistema digestivo dos animais secretado por células do pâncreas e pela saliva e atua na hidrólise dos carboidratos transformando carboidratos de cadeia longas (polissacarídeos) em dissacarídeos, trissacarídeos e oligossacarídeos (NELSON; COX, 2011).

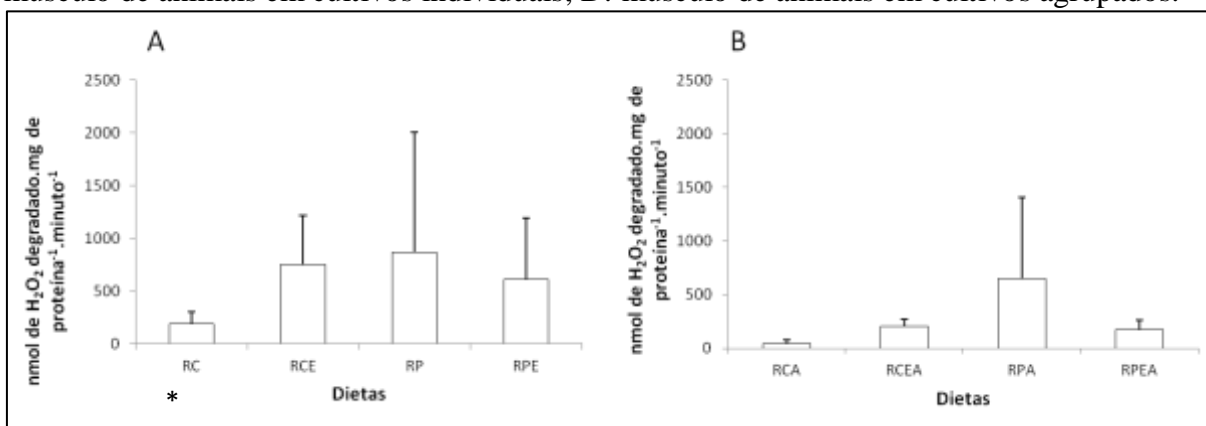
Os valores de atividade da enzima Amilase estão descritos na tabela 9 abaixo. Foram observadas variações significativas entre os grupos. Animais alimentados com ração de coelho, cultivados em ambiente individual, assim como em ambiente agrupado apresentaram menor atividade da amilase que os demais grupos (figura 7).

Tabela 9: Atividade da Amilase

Tipos De Tratamento	Médias e Desvio Padrão para Amilase
RC	186,23 ± 110,88
RCE	751,20 ± 467,52
RP	870,63 ± 1135,42
RPE	612,40 ± 579,70
RCA	42,93 ± 32,04
RCEA	205,17 ± 67,49
RPA	648,48 ± 754,64
RPEA	170,37 ± 93,98

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 7: Atividade da AMILASE ($\text{nmol de H}_2\text{O}_2$ degradado. $\text{mg de proteína}^{-1}.\text{minuto}^{-1}$). A: Fígado de animais em cultivos individuais; B: fígado de animais em cultivos agrupados; C: músculo de animais em cultivos individuais; D: músculo de animais em cultivos agrupados.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

A amilase pode variar de acordo com o ambiente, por exemplo diferença de alimentação, clima, temperatura, qualidade de água, etc. Esses fatores podem influenciar indiretamente na atividade enzimática. Santos (2011), em trabalho com o desenvolvimento dos girinos demonstrou que conforme ocorre a evolução de fases, no período que antecede a metamorfose, há um aumento significativo na atividade da enzima, e redução na metamorfose. Os maiores valores encontrados para as fases foram: pré metamorfose 7,99 U/mg de proteína (U/mg = $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína); Pró metamorfose 28,19 U/mg de proteína; Metamorfose 2,79 U/mg de proteína. Seixas Filho (2010) também indica um aumento da atividade da amilase ao longo de períodos de cultivo de girinos, com valores de 0,51 a 104,54 U/mg quando submetidos a ração com 28% de proteína. Ensaio realizado com girinos alimentados com diferentes níveis de proteína (28, 32, 36, e 40% de PB) por período de 55 dias demonstraram que houve uma diminuição da atividade da enzima, com o aumento do nível proteico na ração, sendo os valores variando de 93,36 (28 % PB) a 15,56 (40 % PB) U/mg de proteína (Seixas FILHO 2011). Porém, os resultados deste trabalho indicam uma tendência contrária, pois a ração de coelho apresenta o menor teor de proteína (13 %) e induziu os menores níveis de atividade desta enzima.

6.3 DISSACARIDASES

6.3.1 Maltase, Lactase e Sacarase

As enzimas dissacaridases são responsáveis pela quebra de dissacarídeos. As glicosidases tais como sacarase, maltase, lactase, estão localizadas no glicocálice das células do epitélio intestinal e agem na superfície das células que realizam absorção, nas ligações α 1-6 e α 1-4 de dissacarídeos liberando monossacarídeos disponíveis para absorção (NELSON; COX, 2011). A maltase hidrolisa maltose formando duas moléculas de D-glicose. A lactase hidrolisa lactose formando D-galactose + D-glicose. A sacarase hidrolisa sacarose formando D-frutose + D-glicose (NELSON; COX, 2011).

Os valores das enzimas maltase, sacarase e lactase analisada em intestino dos girinos, encontrados nos diferentes grupos de alimentação estão descritas na tabela 10 (U.mg de proteína⁻¹). A distribuição da maltase entre os tratamentos é normal quando excluindo o grupo RP aquário devido à falta de dados por baixo número de amostras. Não foi observado variação significativa entre os diferentes grupos de alimentação, tanto no tratamento individual quanto no tratamento agrupado demonstrado pelo teste de Tukey, ou adicionando o grupo RP e realizando o teste de Kruskal Wallis, conforme Figura 8 (Gráficos A e B).

Também não houve variação significativa entre os animais cultivados individuais e agrupados dentro do mesmo grupo de alimentação.

Os valores da atividade da Lactase, do intestino, encontrados nos diferentes grupos de alimentação, apresentou distribuição normal quando excluindo o grupo RPA devido à falta de dados por baixo número de amostras. Não foi observado variação significativa entre os diferentes grupos de alimentação, tanto no tratamento individual quanto no tratamento agrupado, demonstrado pelo teste de Tukey, ou adicionando o grupo e realizando o teste de Kruskal Wallis, conforme Figura 8 (Gráficos C e D) Também não houve variação significativa dentro dos grupos de alimentação quando comparado variação entre os ambientes de cultivo.

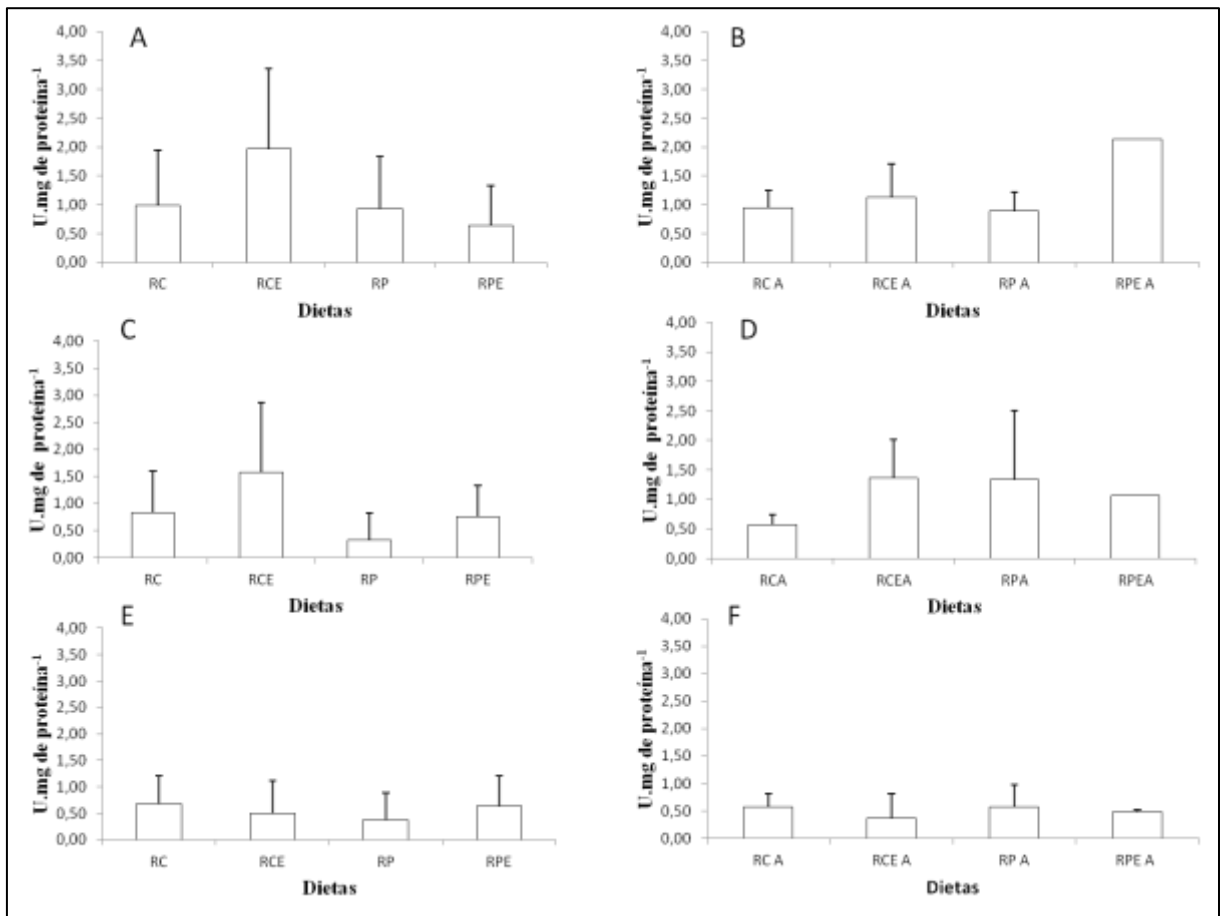
Os valores da atividade da Sacarase intestinal, não apresentaram variação significativa entre os diferentes grupos de alimentação, tanto no tratamento individual quanto no tratamento agrupado. Na Figura 8 (Gráficos E e F), observou-se que o nível de atividade das enzimas é semelhante para os tratamentos.

Tabela 10: Atividade da Maltase, Lactase e Sacarase (*U/mg de proteína; U=nmol de glicose/min/mg de proteína*).

Tipos de Tratamento	Valores de Média e Desvio Padrão		
	MALTASE	LACTASE	SACARASE
RC	0,99 ± 0,97	0,83 ± 0,77	0,69±0,53
RCE	1,97±1,39	1,57±1,29	0,49±0,62
RP	0,93±0,91	0,33±0,49	0,38±0,50
RPE	0,64±0,69	0,77±0,57	0,64±0,56
RCA	0,95±0,30	0,58±0,16	0,57±0,24
RCEA	1,13±0,58	1,37±0,64	0,37±0,44
RPA	0,90±0,32	1,33±1,18	0,57±0,40
RPEA	2,14	1,07	0,48±0,05

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 8: Atividade da Maltase, Lactase e Sacarase. (A e B) maltase - tratamentos individuais e agrupados respectivamente, (C e D) Lactase - tratamentos individual e agrupado, (E e F) Sacarase - tratamentos individual e agrupado.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Segundo Parsons e Prichard (1968), o qual testou as atividades enzimáticas em três espécies de anfíbios, sendo elas: *Rana Temporaria*, *Bulfo Dulgaris*, e *Rana Pipiens*, a maltase foi encontrada em adultos das três espécies em níveis de 136 a 994 μM de glicose/ hora/g de peso seco livre de lipídios. A sacarase foi encontrada apenas na *R. Pipiens* com atividade de 1.9 μM de glicose/hora/g de peso seco livre de lipídios. Já a lactase não foi encontrada em nenhuma das três espécies. Segundo Santos (2011) utilizando uma outra metodologia de descrição na qual utiliza um período após 24 horas de jejum para a coleta do intestino, e posteriormente determinação da atividade, houve um aumento significativo na atividade da maltase, sendo os maiores valores: pré-metamorfose 51,58 U/mg (nmol/min/mg de proteína) ; pró-metamorfose 81,62 U/ mg; metamorfose 45,96 U/mg.

Na espécie foram encontrados atividade das três enzimas demonstrando a capacidade aquisição de glicose a partir da digestão final dos três DISSACARÍDEOS. Além disso, a alteração das dietas não causou variação nessa capacidade digestiva.

6.4 GLICOGÊNIO

A molécula de glicogênio é uma reserva de energia formada a partir de monômeros de glicose, que é a principal fonte de energia para as células. O excesso de glicose é polimerizado e armazenado no tecido hepático principalmente na forma de glicogênio (SILVEIRA et al., 2009).

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (mg de glicogênio/g de tecido) para os tecidos muscular e hepático dos girinos (tabela 11 e figura 9). O tecido hepático apresentou maiores concentrações de glicogênio em relação ao tecido muscular, condição característica dos vertebrados em geral (NELSON; COX, 2011). A distribuição dos valores de glicogênio encontrados no fígado foi normal quando excluído o grupo RPA, principalmente devido ao baixo número de amostras neste grupo ($n = 2$). Não foi observada variação significativa entre os grupos, comparando os diferentes tipos de dietas no mesmo ambiente de ensaio (individual ou agrupados) ou comparando-se a mesma dieta nos dois ambientes de ensaio. As análises foram realizadas via comparação de médias pelo teste de Tukey ou adicionando o grupo RPA e realizando a análise via teste de Kruskal Wallis, conforme apresentados na tabela 11 e figura 9 abaixo.

No tecido muscular não houve normalidade dos dados. A comparação entre os grupos foi realizada com o teste de Kruskal Wallis, não sendo observada variação significativa entre os grupos testados (tabela 11 e Figura 9).

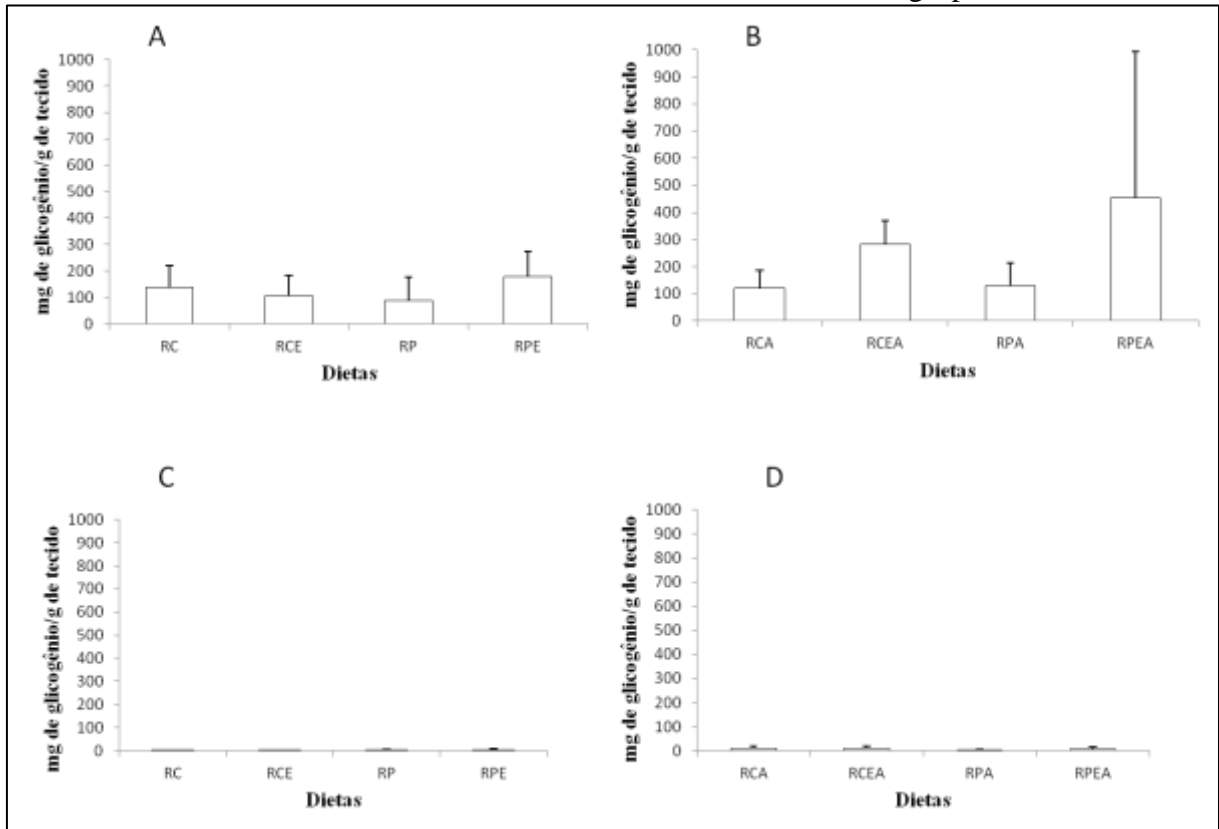
Não há registro de estudos de capacidade de armazenamento de glicogênio em girinos de rã-touro em diferentes condições de dieta, porém, em estudos em peixes foi observado aumento do armazenamento de glicogênio em fígado de animais submetidos a ração suplementada com proteína (ROJAS; INOUE; MORAES, 2011).

Tabela 11: Conteúdo de Glicogênio muscular e hepático (mg glicogênio/g tec) de girinos.

Tipos de Tratamento	Valores de Média e Desvio Padrão	
	FÍGADO	MÚSCULO
RC	138,29 \pm 84,08	1,09 \pm 0,84
RCE	107,73 \pm 76,08	1,36 \pm 1,71
RP	87,37 \pm 89,76	2,07 \pm 3,12
RPE	178,15 \pm 96,79	4,21 \pm 3,20
RCA	121,37 \pm 66,08	8,74 \pm 10,65
RCEA	282,91 \pm 85,53	8,87 \pm 8,97
RPA	130,05 \pm 82,87	3,36 \pm 1,33
RPEA	452,10 \pm 539,92	7,81 \pm 6,70

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 9: Conteúdo de Glicogênio muscular e hepático (mg glicogênio/g tec) em animais tratados com as diferentes dietas. A: Fígado de animais cultivados em ambiente individual, B: Fígado de animais cultivados em ambiente agrupados C músculo de animais cultivados em ambiente individual e D músculo de animais cultivados em ambiente agrupado.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

As ausências de variação significativa em relação a concentração do glicogênio nos diferentes tratamentos indicam que a variação no conteúdo da dieta do girinos não causou alteração no armazenamento e, portanto, no metabolismo de carboidratos dos animais.

De forma geral o experimento foi de grande importância para o setor ranícola pois ainda há uma grande deficiência de dados em relação a nutrição de girinos, e também com custos de produção, pois utilizando fontes de alimentos alternativos como rações mais baratas e outras fontes podem tornar a produção mais viável economicamente baixando o custo de produção e aumentando a oferta do produto. Portanto utilizando ração de coelho que é mais barata, juntamente com espinafre que é uma planta de fácil cultivo pode-se obter bons resultados na engorda de girinos.

Para estudos futuros é importante observar e repetir os testes em tanques de engordas comerciais, e também observar todos os estágios de desenvolvimento dos girinos, desde o período embrionário, até a metamorfose dos mesmos.

7 CONCLUSÃO

As rações de peixe e de coelho, assim como o espinafre apresentaram excelente aceitação por girinos de rã-touro. A ração de peixe pode proporcionar maior potencial de crescimento aos girinos, quando comparada com ração de coelho. Porém o cultivo está sujeito a uma menor taxa de sobrevivência.

As mudanças de fases de G1 para G2 e G3 foram observadas com o desenvolvimento dos animais. A fase G3 foi encontrada em animais nos tratamentos agrupados, sendo que o tratamento com RP apresentou maior porcentagem de indivíduos G3.

A variação na dieta não causou alteração nas atividades das enzimas TGO e TGP, atuantes no metabolismo de aminoácidos.

As dietas fornecidas aos girinos não causaram alteração no estresse oxidativo e metabolismo antioxidante do animal.

A Enzima Lactase apresenta atividade em intestino de girinos de rã-touro.

A variação na dieta não causou variação nas atividades das enzimas maltase, sacarase e lactase.

A enzima amilase apresenta atividade reduzida em animais alimentados com ração de coelho, em relação a ração de peixe e ração de coelho ou peixe mais espinafre.

Portanto conclui-se que as rações de coelho e de peixe, quando parcialmente substituídas por espinafre, são alternativas para a alimentação de girinos, reduzindo o custo com a alimentação, sem prejuízo no crescimento dos animais proporcionando uma melhor viabilidade da cadeia produtiva.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. **Catalase in Vitro**. *Methods Enzymol.* 105. 1984, p. 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- ALVES, S. R. C. et al. Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC. 2003
- AFONSO. A. M. **Efeito do acetato de buserelina na indução á reprodução da rã-touro americana (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Patologia e Reprodução Animal. Universidade Federal de Fluminense. Rio de Janeiro. 2004.
- BARBOSA, J.M; SILVEIRA, A. M; GOMIDE, C. A. Crescimento heterogêneo de girinos de rã-touro alimentados com diferentes rações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 1015-1019, 2005.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. *Anal. Biochem.* 72. 1976. 248–254.
- BROWNE, R. K.; POMERING, M.; HAMER, A.J. High density effects on the growth, development and survival of *Litoria aurea* tadpoles. **Aquaculture**, v.215, 2003. p.109-121.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. **Microsomal Lipid Peroxidation**. *Methods Enzymol.* 52, 1978. P. 302–310.
- CAMPBELL. M. K. Bioquímica. 3 ed. Editora Artmed. Porto Alegre RS. 2000.
- CARDOZO JUNIOR, F. Principais cultivos: O pulo da rã. In: BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **1º Anuário estatístico brasileiro da pesca e aquicultura: 2014**. Brasília: ACEB/MPA, 2014. p. 50-51. Disponível em <http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf> Acesso em 20 Jun. de 2016.
- CARMONA-OSALDE, C. et al. La nutricion de la rana y su importancia en la ranicultura. In: **TECNOFROG**, 2.; ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 9., 1997, Santos. Anais... Santos: Abetra/ABCR, 1997. p. 75-84

CRIBB, A.Y.; AFONSO A. M.; FERREIRA, C. M. **Manual Técnico de Ranicultura**. Curso de Agentes Multiplicadores em Ranicultura. Embrapa, 2013.

COGGER, H. G.; ZWEIFEL, R. G. **Enciclopédia de Répteis & Anfíbios**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1998. 240 p.

COLTRO, M. de Lima. A influência do herbicida FACET®(Quinclorac) nos níveis de corticosterona, metabólitos plasmáticos e nas defesas antioxidantes do fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802). 2015.

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. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1903-1911, 2000

DE SEIXAS FILHO, J. T. et al. Desempenho e atividades enzimáticas em girinos de rã-touro. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 43, n. 11, p. 1617-1624, 2008

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; PAIVA NETO, J. S. **Introdução à Ranicultura**. Boletim Técnico. Instituto da Pesca, São Paulo: Vol. 33. 2002. 15 p. Disponível em <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/boletim_tec_33.pdf> Acesso em 20 Jun. de 2016.

FERREIRA W. M. et al. **Avanços na nutrição e alimentação de coelhos no Brasil**. In: Zootec 2006, *Anais...* Recurso eletrônico CD.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997

FROST, D .R. et al. The amphibian tree of life. **Bulletin of American Museum of natural history**, n. 297, 2006. p. 1-370.

FONTANELLO, D.; SOARES, H. A.; REIS, J. M. dos. Manejo Alimentar de rãs. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 2., 1980, Jaboticabal. **Anais ...** Jaboticabal: ABCR, 1980, p. 153 - 177.

HUSSAIN, J. et al. Proximate and nutrient analysis of selected vegetable species: A case study of Karak region, Pakistan. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 12, 2009

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação**. Brasília: Ibama, 2008. 174 p. Disponível em <[http://www.ibama.gov.br/category/40?download=2459%3A_2006_09-.</p></div>

Sci. Agric, v. 59, n. 3, p. 441-446, 2002.

Analytical Biochemistry. v. 4, p.17-23, 1962.

Ranicultura: Análise da cadeia produtiva. Viçosa-MG: Folha de Viçosa, 1999.

A Tecnologia de Criação de Rãs. Viçosa-MG: UFV, 1992. 168p.

Revista Brasileira de Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science. Vicosa-MGG: Revista Brasileira Zootecnia Brazilian Journal Animal Sci, v. 27, n. 3, p. 416-420, 1998. Disponível em: <\[http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/37309/WOS000077670400002.pdf?sequence=1&isAllowed=y</p></div>

Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. Chemosphere 76. 2009. P. 932–937. oi:10.1016/j.chemosphere.2009.04.045.

Sistema inundado de cria de ranas. In: International Meeting On Frog Research And Techology, 2: **Encontro Nacional De Ranicultura**. Santos. Anais... Santos: ABETRA, 1997. p.151-160.

Capacidade Antioxidante de Hortaliças Usualmente Consumidas. Ciência Tecnologia de Alimentos. Campinas. jul.-set. 2006. Disponível em <\\[http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n3/31768.pdf</p></div>\\]\\(http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n3/31768.pdf\\)\]\(http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/37309/WOS000077670400002.pdf?sequence=1&isAllowed=y\)](http://www.ibama.gov.br/category/40?download=2459%3A_2006_09-.)

MELLO, S.C.R.P. Sistema inundado de criação de rãs. Ensaio experimental. **Boletim técnico do Instituto de Pesca**. São Paulo, V.31, p. 15-19, 2001. ISSN 0103-1767

MOREIRA, C. R. **Análise econômica da ranicultura: viabilidade individual e integrada de operações**. 2011. 56f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca). Instituto de Pesca: APTA –SAA, São Paulo, 2011.

NAVARRO, R. D. et al. **Níveis de energia digestível da dieta sobre o desempenho de piaçu (*Leporinus macrocephalus*) em fase pós-larval**. Acta Scientiarum Animal Science, v. 29, n.1 :1 09-11 4. 2007. Disponível em <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/266/166>> Acesso em 20 Jul. de 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVEU, A. Suitability of European Green frogs for intensive culture: Comparison between different phenotypes of the esculenta hybridogenetic complex. **Aquaculture**, v. 295, n. 1, 2009. p. 30-37.

OLIVEIRA, E. G **Ranicultura: Novos desafios e perspectivas do mercado**. Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca da UFC; Universidade Federal do Ceará. *Ciência Animal*, 25(1), 2015 Palestra apresentada no III Congresso Estudantil de Medicina Veterinária da UECE, Fortaleza - CE, Brasil, 08 a 12 de junho de 2015. Disponível em <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/palestra14_p173_186.pdf> Acesso em 01 Set. de 2016.

OLIVEIRA, G. A. Instalações de Ranário. In: **Encontro Nacional De Ranicultura - ENAR**, 3., 1983, Uberlândia, MG. Anais. Uberlândia: MA/MEC/UFU, 1983. p. 41-58.

OLIVEIRA, F.A et al Manejo alimentar com dispensador automático na criação de rã-touro. *Dep.Produção animal UNESP. Arch.Zootecnia*. Nº 58 pg 589-592 2009.

OU, B. et al. **Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study**. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

PARSONS, D. S.; PRICHARD, J. S. Disaccharide absorption by amphibian small intestine in vitro. **The Journal of physiology**, v. 199, n. 1, p. 137, 1968

PEREIRA, M. M. **Crescimento e deposição dos nutrientes da rã-touro na engorda: ajuste de modelos não lineares**. 2013. 76 f. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista,

Centro de Aquicultura. Jaboticabal, São Paulo, 2013. Disponível em <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100163/000750099.pdf?sequence=1>> Acesso em 20 Ago. de 2016.

PELUZIO et al. **Composição centesimal e avaliação nutricional da carne de rã.** In: International meeting on frog research and technology, 1., Encontro nacional de Ranicultura, 8., 1995, Viçosa. Anais... Viçosa: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, 1995. 2 v. V. 1, p. 127.

PINTO, D. F. H. **Avaliação de níveis de proteína digestível para girinos de rã-touro.** 2014. 51 p. Dissertação (Mestrado), Centro de Aquicultura UNESP- CAUNESP. São Paulo. Jaboticabal. 2014. Disponível em <<http://200.145.6.238/bitstream/handle/11449/108915/000777135.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em 15 Jul. de 2016.

PLANETA De AGOSTINI. **Enciclopédia multimídia dos seres vivos.** São Paulo: Videolar, 1998. CR-ROM 6 (Vertebrados 6).

REIS, J. S.; OGOSHI, R. C. S.; SAAD, F. M. O. B. **Nutrologia Aplicada à Medicina Veterinária.** Ciência Animal, 25(1). Palestra apresentada no III Congresso Estudantil de Medicina Veterinária da UECE, Fortaleza, CE, Brasil, 08 a 12 de junho de 2015. Disponível em <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/palestra10_p121_132.pdf> Acesso em 30 Nov. de 2016.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal**, v. 21, n. 3, 2006.

SANTOS, L. F. J. dos. Atividade de enzimas digestivas de *Lithobates catesbeianus* durante o desenvolvimento larval. 2011

SANTOS, E. **Anfíbios e Répteis.** 4 ed. Belo Horizonte: Editora Vila Rica, 1994. 264 p. (Coleção Zoologia Brasileira, vol. 3).

SEIXAS FILHO, J. T. et al. **Alimentação de girinos de rã-touro com diferentes níveis de proteína bruta.** Ciência Animal Brasileira, v.1 2, n.2, 2011. p. 250-256. Disponível em <<http://revistas.bvs-vet.org.br/cab/article/viewFile/8844/9383>> Acesso em 25 Jul. de 2016.

SEIXAS FILHO, J. T. et al. **Regime Alimentar De Girinos De Rã Touro.** Ciência Animal Brasileira, v.14, n.1. 2013. p. 17-22. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cab/v14n1/03.pdf>> Acesso em 25 Jul. de 2016.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; MORAIS, J. C. L.; STÉFANI, M.V. **Comportamento alimentar e qualidade da água em tanques de criação de girinos de rã-touro *Lithobates catesbeiana***. Acta Scientiarum Animal Sciences, v. 30, n. 1, 2008. p. 95-101. Disponível em <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/3619/2672>> Acesso em 30 Nov. de 2016.

SCHOONBEE, H. J; PRINSLOO, J. F.; NXIWENI, J. G. **Observations on the feeding habits of larvae, juvenile and adult stages of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. In impoundments in Transkei**. Water AS, Alexandria, v. 18, n. 4, 1992. p. 227-236.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. *Zoologia geral*. 3 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1977. 534 p.

TYNING, T. F. **A guide to amphibians and reptiles**. New York: Little, Brown and Company, 1990. 400 p. (Stokes Nature Guides).

TEIXEIRA, R. D. Mercado mundial da carne de rã. In: **Encontro Nacional de Ranicultura**, 11., Bragança Paulista. Anais... Bragança Paulista: Ranário Beija-flor, 2001. p. 8-20.

UNIFESP. Universidade Federal da São Paulo. **Relatório Básico: Espinafre cru**. Escola Paulista de Medicina. Departamento de Informática em Saúde. 2016. Disponível em: <<http://www.dis.epm.br/servicos/nutri/public/alimento/11457/espinafre-cru>> Acesso em 22 Jun. de 2016.

VIZOTTO, L. D. **Ranicultura**. Monografia. 43 p. 1975.