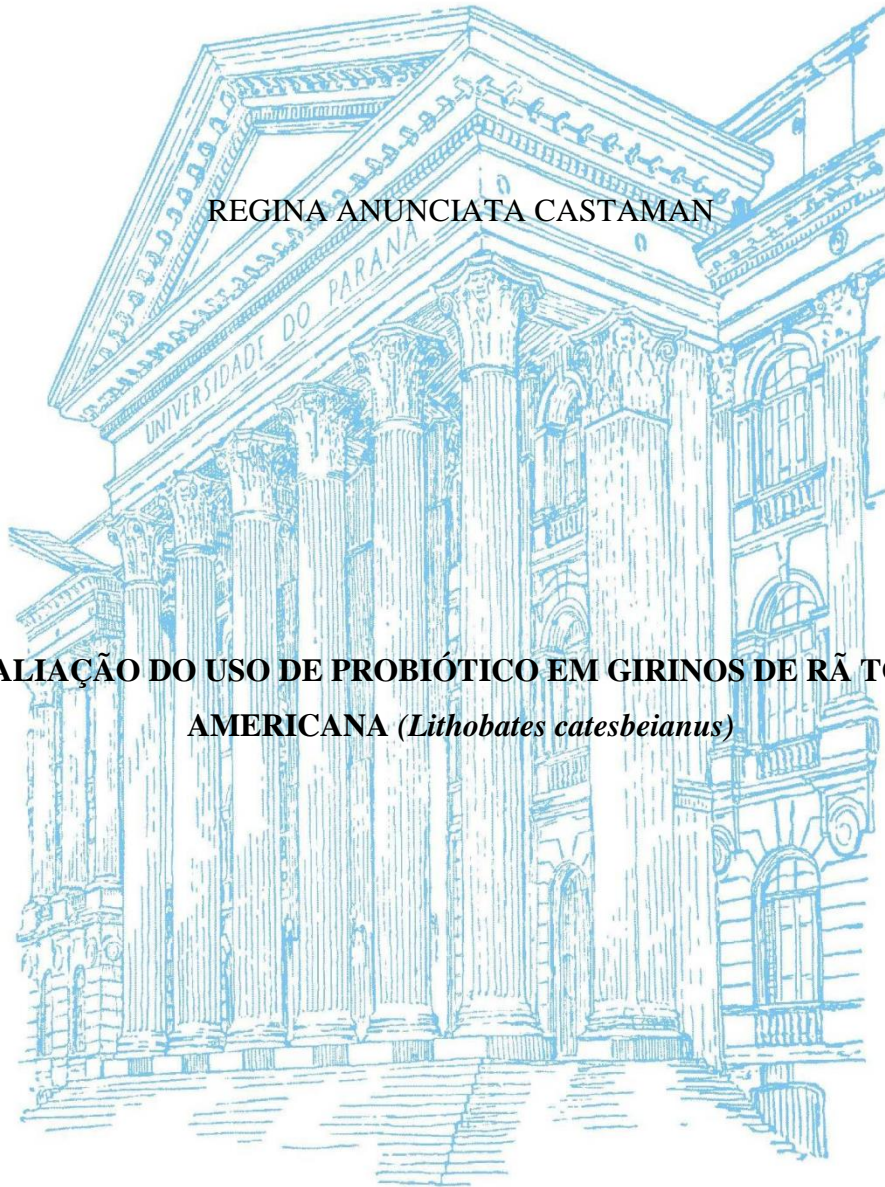


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGINA ANUNCIATA CASTAMAN

**AVALIAÇÃO DO USO DE PROBIÓTICO EM GIRINOS DE RÃ TOURO
AMERICANA (*Lithobates catesbeianus*)**



PALOTINA

2017

REGINA ANUNCIATA CASTAMAN

**AVALIAÇÃO DO USO DE PROBIÓTICO EM GIRINOS DE RÃ TOURO
AMERICANA (*Lithobates catesbeianus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, Área de concentração: Produção de organismos aquáticos, do Setor Palotina, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Portz

PALOTINA

2017

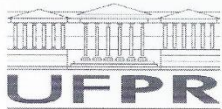
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C346 Castaman, Regina Anunciata
Avaliação do uso de probiótico em girinos de rã touro americana
(*Lithobates catesbeianus*) / Regina Anunciata Castaman .
– Palotina, 2017.
41f.

Orientador: Leandro Portz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e
Desenvolvimento Sustentável.

1. Desempenho zootécnico. 2. Ranicultura. 3. *Rana*
catesbeiana. I. Portz, Leandro. II. Universidade Federal do Paraná
III. Título.

CDU 636.957.8



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

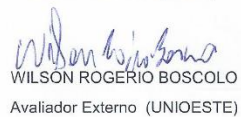
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **REGINA ANUNCIATA CASTAMAN** intitulada: **AVALIAÇÃO DO USO DE PROBIÓTICO EM GIRINOS DE RÃ TOURO AMERICANA (*Lithobates catesbeianus*)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Palotina, 24 de Fevereiro de 2017.


LEANDRO PORTZ
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LILIAN CAROLINA ROSA DA SILVA
Avaliador Interno (UFPR)


WILSON ROGERIO BOSCOLO
Avaliador Externo (UNIOESTE)

*Dedico este trabalho
aos meus pais.*

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por me presentear com várias oportunidades e sempre me fortalecer diante de obstáculos.

Aos meus pais, Diamantino P. Castaman e Fatima M. Castaman, por todo carinho concedido e por sempre me incentivarem nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro Portz, pela amizade, todos os conselhos concedidos e pela confiança em me orientar.

Ao Prof. Dr. Andre Muniz Afonso, pela oportunidade, orientação desde o meu primeiro estágio na área ranicultura, amizade construída nesses 6 anos de orientação, pela amizade, carinho e todos os conselhos concedidos, minha imensa admiração e pela confiança em me co-orientar.

Aos professores Dr. Wilson Rogério Boscolo e Dr^a Lilian Carolina Rosa da Silva pela participação como banca avaliadora e pelas contribuições ao trabalho.

Aos acadêmicos Daiane Saueressig e Leonardo Pastore pelo auxílio na condução do experimento e pela amizade duradoura.

Ao meu afilhado João Paulo Kuhn Heldt, pelos momentos de descontração e por me trazer alegrias todos os dias.

Aos mestrandos colegas, pelo companheirismo e ajuda no encerramento do experimento, pela amizade e todos os momentos de descontração. Com certeza fizeram a diferença.

Aos técnicos Ademir Heldt e Pedro Zadinelo Moreira pela ajuda durante a condução e leitura do material do experimento.

Às minhas amigas Maristela Furman, Leticia Gonsalves Teixeira, Deise Jaine Kuhn, Carolina Kasparly pela amizade duradoura, conselhos, desabafos, momentos de risadas, muito obrigada por fazerem parte da minha vida!

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, pelos conhecimentos adquiridos, pela infraestrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho.

Aos Laboratórios de Carcinicultura e Aquariologia por cederem o espaço físico para realização do experimento, ao Laboratório de Qualidade de Água e Limnologia (LaQal) pelas análises de

água, ao Laboratório de Nutrição Animal (LANA) pela análise bromatológica, e ao Laboratório Clínico Veterinário (Hospital Veterinário) por ceder os materiais necessários e permitir a realização das análises hematológicas.

Ao LabRan (Laboratório de Ranicultura da UFPR) pelo fornecimento do material necessário às biometrias.

A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Araucária pela bolsa.

À Ranac Agroindustrial Ltda. pelo fornecimento dos girinos de rã touro.

À Biomin do Brasil Nutrição Animal Ltda. pelo fornecimento de parte do material da pesquisa.

Aos colegas do Instituto de Pesca de São Paulo pelo apoio nas análises hematológicas.

*A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.*

Marcel Proust

RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência de um probiótico comercial em girinos de rã-touro americana, baseando-se no desempenho zootécnico e no perfil leucocitário. Os animais, provenientes de uma única desova natural adquirida de um ranário comercial, foram trazidos ao Laboratório de Carcinicultura, da Universidade Federal do Paraná, em Palotina, e acondicionados na proporção de 40 animais por aquário (12 aquários), perfazendo a densidade de um girino por litro, totalizando 480 animais (estágio 25 de Gosner), por um período de 120 dias. Em seguida, foram elaborados quatro tratamentos, a saber: Tratamento 1 (T1) – caracterizado pela administração de probiótico comercial, diretamente na água, na proporção de 0,08g de produto por aquário/dia e alimento comercial; Tratamento 2 (T2) – caracterizado pela administração da mistura do probiótico comercial com alimento comercial, na proporção de 2,5g para 500g (0,5%:1); Tratamento 3 (T3) – caracterizado pela combinação dos tratamentos 1 e 2 (T1 + T2), ou seja, fornecimento de probiótico na água e no alimento comercial; e Tratamento 4 (T4) – caracterizado pelo grupo controle, onde ofertou-se o mesmo alimento comercial dos tratamentos anteriores, nos mesmos horários e proporções, porém isento de probióticos. O probiótico comercial era composto por amido de mandioca, dextrose, *Lactobacillus reuteri*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis*. A alimentação dos animais, para todos os tratamentos, foi dividida em três tratos diários (9, 12, e 15h), na proporção de 5% do peso vivo da biomassa. De maneira a monitorar a qualidade da água dos aquários, efetuou-se o controle do pH, da temperatura, do oxigênio dissolvido, da amônia e do nitrito. Semanalmente, coletou-se 25% do total de cada aquário para avaliação dos parâmetros: peso total (g), comprimento total (cm), comprimento de cauda (cm), comprimento de corpo (cm), ganho de peso (g), taxa de conversão alimentar, taxa de crescimento específico (%) e taxa de sobrevivência (%). Ao final do experimento avaliou-se o perfil leucocitário de 12,5% do total de cada aquário. Todos os parâmetros de qualidade de água aferidos mostraram-se satisfatórios para a criação dos girinos. Em relação ao peso total, ao comprimento do corpo, ao ganho de peso e a taxa de crescimento específico, verificou-se que o T3 apresentou os melhores resultados (10,92g; 3,50 cm; 10,74g; e 8,95%; respectivamente), diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tukey $p < 0,05$). O perfil leucocitário demonstrou que, em todos os tratamentos onde utilizou-se probiótico, houve um aumento do número total de células do sistema imune, diferindo, significativamente, do tratamento controle. Concluiu-se que, o uso de probiótico na ração e na água, representado pelo Tratamento 3, obteve resultados zootécnicos mais expressivos, quando comparado aos demais, sendo esta forma de administração a mais recomendada para girinos de rã-touro. Além disso, também é possível afirmar que a utilização do probiótico comercial testado promoveu o aumento de células do sistema imune, o que pode significar uma melhoria geral nas condições imunoproliféricas nos ranários comerciais.

Palavras-chave: Desempenho zootécnico¹, Ranicultura², *Rana catesbeiana*³.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of a commercial probiotic on American bullfrog tadpoles, based on zootechnical performance and leukocyte profile. The animals, from a single natural spawning stock of a commercial frog farm, were brought to the Carciculture Laboratory of the Federal University of Paraná, in Palotina, State of Paraná, Brazil, and packed at the rate of 40 animals per aquarium (12 aquariums), making up the density of one tadpole per liter, totaling 480 animals (stage 25 of Gosner), for a period of 120 days. Then, four treatments were elaborated, as shown: Treatment 1 (T1) - characterized by the administration of a commercial probiotic, directly in the water, in the proportion of 0.08g of product per aquarium/day and commercial supply; Treatment 2 (T2) - characterized by the administration of a commercial probiotic mixture with a commercial supply, in the ratio of 2.5 g to 500 g (0.5%:1); Treatment 3 (T3) - characterized by the combination of treatments 1 and 2 (T1 + T2), probiotic directly in water and mixed with a commercial supply; and Treatment 4 (T4) - known as the control group, where the same commercial supply of the previous treatments was offered, at the same times and proportions, but without probiotics. The commercial probiotic was composed of cassava starch, dextrose, *Lactobacillus reuteri*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* and *Bacillus subtilis*. The feeding management, for all treatments, was divided into three daily portions (9, 12 and 15h), in the proportion of 5% of the biomass live weight. In order to monitor the water quality of the aquariums, pH, temperature, dissolved oxygen, ammonia and nitrite were controlled. On a weekly basis, 25% of the total of each aquarium was collected to evaluate the performance parameters of: total weight (g), total length (cm), tail length (cm), body length (cm), weight gain (g), feed conversion rate, specific growth rate (%) and survival rate (%). At the end of the experiment, the leukocyte profile (n = 5; 12.5% of the total) of the animals of each aquarium was evaluated. All measured water quality parameters were satisfactory for the tadpoles. Regarding total weight, body length, weight gain and specific growth rate, T3 showed the best results (10.92 g; 3.50 cm; 10.74 g; and 8.95 %, respectively), differing significantly from the other treatments (Tukey p <0.05). The leukocyte profile showed that in all treatments where probiotic was used, there was an increase in the total number of cells of the immune system, differing significantly from the control treatment. Also, that the concomitant use of the probiotic in the feed supply and in the water, represented by treatment 3, resulted in more expressive zootechnical values comparing to the others, so this form of administration is the most recommended for bullfrog tadpoles. In addition, it is also possible to state that the use of the commercial probiotic tested promoted the increase of the immune system cells, which could mean an overall improvement in immunoprophylactic conditions in commercial frog farms.

Keywords: Zootechnical performance¹, Frog farming², *Rana catesbeiana*³.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO ALIMENTO FORNECIDO AOS GIRINOS DE RÃ TOURO.....	14
TABELA 2 - VALORES MÉDIOS DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA DOS AQUÁRIOS UTILIZADOS NA CRIAÇÃO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO ALIMENTADOS COM E SEM PROBIÓTICO COMERCIAL.....	16
TABELA 3 - VALORES MÉDIOS DOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS DE GIRINOS DE RÃ-TOURO ALIMENTADOS COM E SEM PROBIÓTICO COMERCIAL.....	19
TABELA 4 - MÉDIAS DOS NÚMEROS ABSOLUTOS DE LEUCÓCITOS E DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS DE GIRINOS DE RÃ-TOURO ALIMENTADOS COM E SEM PROBIÓTICO COMERCIAL.....	19
TABELA 5 - MÉDIAS E DESVIO MÉDIO DOS NÚMEROS ABSOLUTOS E DOS VALORES PERCENTUAIS DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS PARA BASÓFILO (BS) UTILIZANDO O MODELO GENERALIZADO ASSUMINDO DISTRIBUIÇÃO BINOMINAL, DE GIRINOS DE RÃ-TOURO ALIMENTADOS COM E SEM PROBIÓTICO COMERCIAL.....	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
APÊNDICE 1 ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DOS ANIMAIS PARA O LABORATÓRIO	29
APÊNDICE 2 CONTAGEM DOS ANIMAIS PARA INÍCIO DO EXPERIMENTO	29
APÊNDICE 3 ANIMAIS SEPARADOS PARA A REALIZAÇÃO DA BIOMETRIA	30
APÊNDICE 4 PESAGEM DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO	30
APÊNDICE 5 BIOMETRIA (MEDIDAS DE CORPO DOS ANIMAIS)	31
APÊNDICE 6 BIOMETRIA (MEDIDAS DA CAUDA DOS ANIMAIS)	31
APÊNDICE 7 FOTOMICROGRAFIA DOS LEUCÓCITOS DE GIRINOS DE RÃ-TOURO	32
APÊNDICE 8 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO SETOR PALOTINA (UFPR)	33
APÊNDICE 9 NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA (VERSÃO FEVEREIRO 2017)	34

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca na produção da rã-touro americana (*Lithobates catesbeianus*), espécie exótica introduzida no país por um técnico canadense em 1935, única representante da ranicultura nacional, atividade que cresceu muito nos últimos anos devido aos avanços tecnológicos desenvolvidos para sua produção em sistema intensivo (AFONSO, 2012; CRIBB et al., 2013).

Uma das fases mais complicadas da produção de rãs é a larvicultura ou girinagem, pois segundo RIBEIRO FILHO (1998), em produções comerciais pode apresentar ocorrência de alta mortalidade, principalmente, devido a problemas com qualidade da água, manejo e instalações inadequadas. Durante todas as fases de produção as mudanças ambientais podem impactar negativamente a saúde das rãs visto que podem induzir ao estresse e, conseqüentemente, à imunossupressão, tornando-as mais susceptíveis a bactérias e fungos causadores de doenças. (FENERICK JR. et al., 2006). Desta forma, são necessárias maiores pesquisas na fase larval das rãs, diminuindo assim a taxa de mortalidade e melhorando a imunologia dos animais. O uso de aditivos na água ou na ração, como os probióticos, podem ser alternativas viáveis para que se obtenham melhores índices de sobrevivência, bem como zootécnicos (FRANÇA et al., 2008).

A ação dos probióticos ainda não é totalmente conhecida, porém a eles são atribuídas melhoras na eficiência de índices zootécnicos, por meio do auxílio à digestão e digestibilidade de alimentos e na absorção de nutrientes, uma vez que a suplementação com alguns probióticos pode contribuir para melhorar a nutrição de animais aquáticos; redução da colonização intestinal por alguns patógenos (por competição direta nos sítios de ligação no sistema digestório); produção de ácido láctico que reduz o pH do meio, exercendo efeito antimicrobiano; estímulo do sistema imune; e restauração da microbiota intestinal (DALL e MORIARTY 1983; FULLER 1989; FULLER, 1977, ZIEMER e GIBSON, 1998; LEE et al., 1999, GUZMÁN 1992; CASTRO, 2003).

A maior parte dos estudos realizados com probióticos em rãs foi desenvolvida com o uso de produtos alóctones, ou seja, produtos comerciais (FRANÇA et al., 2008; DIAS et al., 2008). Foram encontrados resultados positivos com uso de probiótico constituído por *Bacillus subtilis* em diferentes dosagens para rã-touro recém metamorfoseada, uma vez que análises imunológicas mostraram que o probiótico apresentou efeito imunoestimulador, mas não influenciou os parâmetros hematológicos dos animais (FRANÇA et al., 2008). Dias et al. (2008) utilizaram dois probióticos comerciais em rãs-touro pós-metamorfoseadas, sendo o primeiro

composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* e o segundo apenas por *Bacillus subtilis* e observaram aumento no ganho de peso, redução do ciclo produtivo em 28 dias e efeito imunomodulador decorrente do aumento da capacidade fagocítica das células de defesa.

PEREIRA et al. (2016) utilizou um probiótico autóctone, ou seja, isolado do próprio meio, empregando o *Lactobacillus* sp. na ração de girinos de rã-touro. Sua adição induziu à estabilidade enzimática bacteriana na alimentação e à colonização do trato intestinal, os animais que receberam dieta suplementada apresentaram maior ganho de peso, maior concentração de bactéria ácido-lática no intestino e menor conversão alimentar.

Os destaques apresentados sobre os possíveis benefícios dos probióticos em rãs-touro americana justificam o aprofundamento dos estudos sobre seu modo de ação nas diferentes fases da ranicultura. Dessa forma, objetivou-se, por meio do presente estudo, avaliar a influência de um probiótico comercial em girinos de rã-touro americana, baseando-se no desempenho zootécnico e no perfil leucocitário.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Carcinicultura da Universidade Federal do Paraná, no município de Palotina, estado do Paraná, por um período de 120 dias (setembro/2015 a janeiro/2016). Foram utilizados 12 aquários (32cm x 36cm x 38cm) totalizando uma área útil de aproximadamente 40L, distribuídos aleatoriamente em duas estantes com entradas e saídas de água individuais.

Utilizou-se como modelo experimental a rã-touro na fase larval, também conhecida como girino. Os animais, provenientes de uma única desova natural adquirida de um ranário comercial da empresa Ranac Agroindustrial Ltda., localizado na cidade de Antônio Carlos (SC), foram transportados ao laboratório, embalados em dois sacos plásticos, na proporção de 500 animais/saco, contendo 2/3 de oxigênio e 1/3 de água isenta de cloro. Ao chegar ao laboratório foram distribuídos em quatro caixas plásticas de 40 L, contendo água de pH neutro, isenta de cloro.

No dia seguinte foram acondicionados na proporção de 40 animais/aquário, perfazendo a densidade de um girino por litro, totalizando 480 animais no estágio 25 (GOSNER, 1960). Eles permaneceram nestes aquários com renovação diária de água de 5% do

volume total, até que o vitelo fosse totalmente consumido, o que ocorreu em sete dias (período de aclimatação).

Em seguida, foram elaborados quatro tratamentos, a saber: Tratamento 1 (T1) - caracterizado pela administração de probiótico comercial, diretamente na água, na proporção de 0,08g de produto por aquário/dia e alimento comercial (Tabela 1); Tratamento 2 (T2) - caracterizado pela administração da mistura do probiótico comercial com o alimento comercial (T1), na proporção de 2,5g para 500g (0,5%:1); Tratamento 3 (T3) - caracterizado pela combinação dos tratamentos 1 e 2 (T1 + T2); e Tratamento 4 (T4) - caracterizado pelo grupo controle, onde ofertou-se o mesmo alimento comercial dos tratamentos anteriores, nos mesmos horários e proporções, porém isento de probióticos.

O probiótico comercial era composto por amido de mandioca, dextrose, *Lactobacillus reuteri*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis*. A alimentação dos animais, para todos os tratamentos, foi dividida em três tratos diários (9, 12, e 15h), na proporção de 5% do peso vivo da biomassa.

O alimento presente nos quatro tratamentos foi baseado numa mistura composta por ração comercial de peixes em pó adicionada de farelo de trigo também em pó, cuja análise da composição centesimal, segundo AOAC (2012), encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal do alimento fornecido aos girinos de rã-touro

Componente	Quantidade
Umidade	16,56%
Proteína bruta	25,21%
Extrato etéreo (mín.)	3,74%
Resíduo Mineral	6,53%
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	35,68%
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	5,56%
Hemicelulose	30,12%

FONTE: O autor (2017).

Todos os dias, às 8 e 17 horas, os aquários eram sifonados para remoção de restos alimentares e excretas presentes no fundo, totalizando 10% do volume total/dia. A água utilizada na reposição dos aquários era desclorada por meio de aeração permanente em três caixas de 100 L, com antecedência de 15 horas previamente ao uso.

Era realizado, diariamente, o controle dos parâmetros de qualidade de água, tais como: temperatura (termômetro Digital - CE®); oxigênio dissolvido (oxímetro AT-170 - Alfakit®); e pH (AT-315 - Alfakit®). Semanalmente, no Laboratório de qualidade de Água e Limnologia (LaQal/UFPR), efetuava-se o controle da amônia e do nitrito, determinados, respectivamente,

pelo método do indofenol (Koroleff, 1976) e pelo método da reação de Griess (Baumgarten, 1996).

A cada semana, eram efetuadas as medidas individuais de desempenho zootécnico por meio de coleta amostral de 25% do total de animais presentes nos aquários, a saber: peso total (g), comprimento total (cm), comprimento da cauda (cm), comprimento do corpo (cm); ganho de peso (GP) (g) ($P_f - P_i$, onde P_f = peso final; e P_i = peso inicial); conversão alimentar (Ração fornecida / GP); taxa de crescimento específico (TCE) (%) ($(P_f - P_i) * 100 /$ intervalo de tempo); e taxa de sobrevivência (TS) (%) (total de rãs final / total de rãs inicial * 100). As medidas de corpo e cauda foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (0,001 cm - Digimess®) e as pesagens com auxílio de balança digital de precisão (0,001g- Bel®). Com base na biometria calculava-se, semanalmente, a quantidade de ração que os animais deveriam consumir.

Ao final do experimento foi realizado um hemograma, com foco no perfil leucocitário, de cinco animais de cada tanque (12,5%). Para tal, realizou-se prévia anestesia local com uso de lidocaína em gel a 2% e em seguida foi realizada uma punção intravenosa (artéria isquiática) com o auxílio de uma agulha hipodérmica, de 1,60 x 40 mm. O sangue foi coletado com o auxílio de um pipetador (Micropipet®) de 1-5 mL e, em seguida, armazenado em frasco tipo “eppendorf”. Todo o material utilizado para a coleta e armazenamento do sangue foi devidamente heparinizado (Hemafol - heparina sódica 5.000 UI/mL).

Para a contagem dos eritrócitos utilizou-se uma câmara hematimétrica de Neubauer, de acordo com RANZANI-PAIVA (1995). Após a contagem em cada retículo, foi calculada a média do número de células. Para cada animal foi feita uma lâmina de extensão sanguínea de acordo com RANZANI-PAIVA (1995) e FRANÇA (2007). Para fixar as laminais foi usado o método de ROSENFELD (1947), deixando-a 2 minutos no metanol e 10 minutos no corante de Giemsa.

A Contagem Diferencial de Leucócitos foi realizada nas extensões sanguíneas em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100x) onde foram contados 100 leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos). O valor absoluto foi calculado por uma regra de três, partindo-se da contagem total de leucócitos e do valor relativo de cada elemento (FRANÇA et al., 2008).

O banco de dados foi submetido a análises de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Pelo procedimento Univariate do pacote estatístico SAS (SAEG, 2007). Os modelos utilizados consideraram as diferenças entre os tratamentos e dias ou semanas de cultivo.

Para as variáveis correspondentes à qualidade de água e desempenho zootécnico realizou-se contrastes de médias (Tukey $P < 0,05$) entre os tratamentos, por meio do procedimento GLM (Modelos Lineares Generalizados) do SAS. As análises para contrastes das médias foram realizadas desdobrando-se por semanas de cultivo. Para os dados correspondentes às análises hematológicas foram realizados contrastes de médias (Tukey $P < 0,05$) entre os tratamentos utilizando o procedimento GLM. Quando necessário assumiu-se distribuição apropriada para a variável, sendo realizada o contraste de médias por meio do limite de confiança estabelecido no procedimento GENMOD (Modelos Generalizados) do SAS. Para a variável BS (Basófilos), foi realizada análise de contraste de média por meio dos modelos generalizados assumindo distribuição Binomial Negativa com função de ligação Logística.

3 RESULTADOS

Os parâmetros de qualidade de água aferidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios* dos parâmetros de qualidade de água dos aquários utilizados na criação de girinos de rã-touro alimentados com e sem probiótico comercial

Tratamento	OD (mg/L)	NH ₃ (mg/L)	NO ₂ (mg/L)	pH	Temp (°C)
T1	3,05 ^c	0,02 ^d	0,03 ^b	7,70	23,69
T2	3,20 ^b	0,14 ^a	0,05 ^a	7,91	23,70
T3	2,78 ^d	0,11 ^c	0,06 ^a	7,67	23,52
T4	3,46 ^a	0,12 ^b	0,06 ^a	8,02	23,70

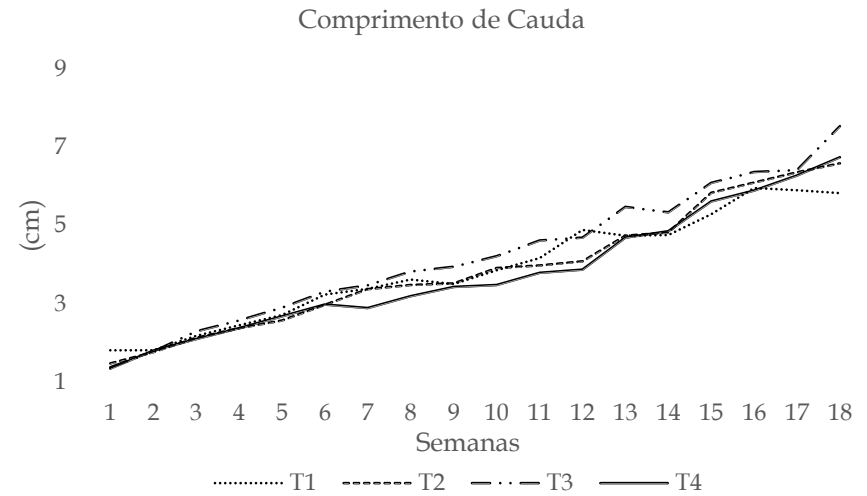
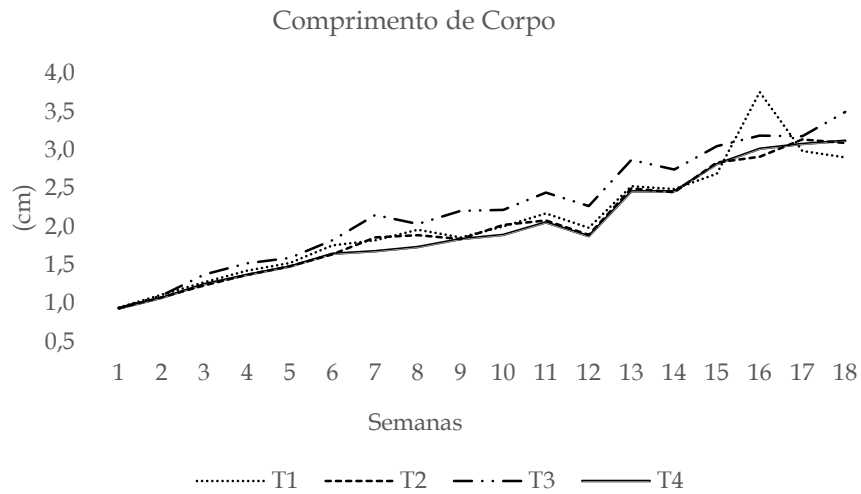
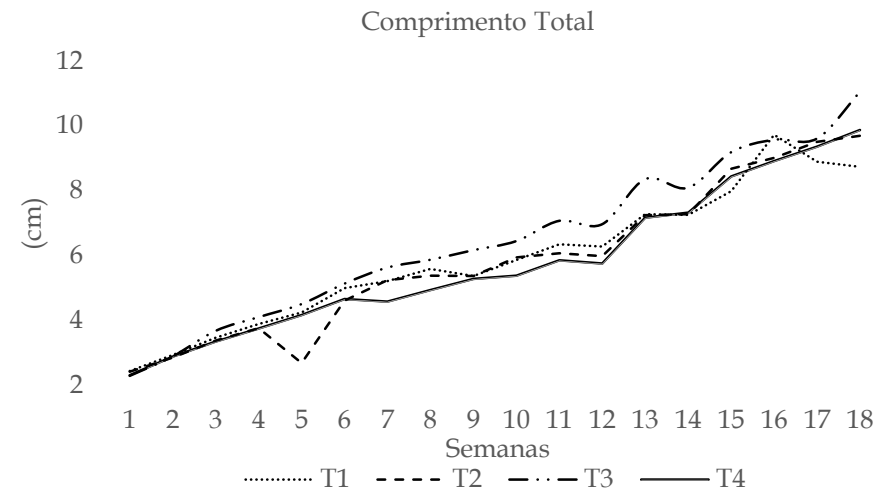
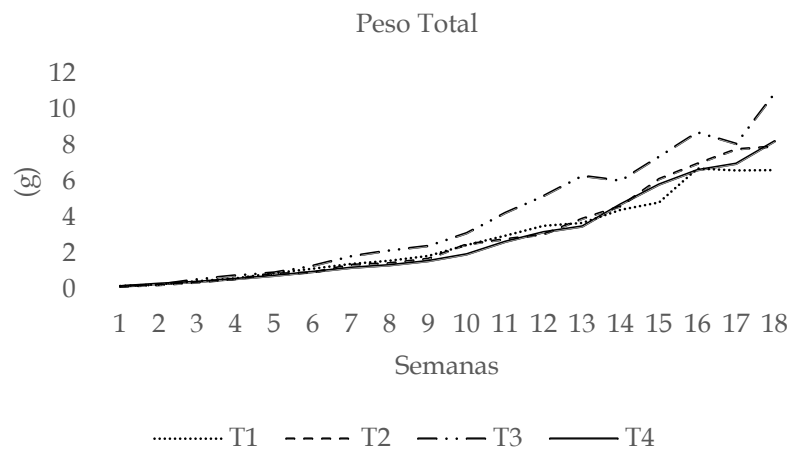
FONTE: O autor (2017).

* Letras diferentes apresentam diferença significativas entre si ($p < 0,05$);

OD- Oxigênio dissolvido, NH₃ - Amônia, NO₂ - Nitrito, pH - potencial hidrogeniônico; Temp - temperatura;

T1 - Tratamento com utilização de probiótico na água; T2 - Tratamento com utilização de probiótico na ração; T3 - Tratamento com utilização de probiótico na água e na ração; T4 - Tratamento sem utilização de probiótico (controle).

A curva de crescimento dos valores de peso total e dos comprimentos total, do corpo e da cauda dos girinos, ao longo de 18 semanas, encontram-se na figura 1. Seus respectivos valores médios estão demonstrados na tabela 3.



FONTE: O autor (2017).

Figura 1. Gráficos demonstrando o desempenho zootécnico referente aos parâmetros de Peso total, Comprimento total, Comprimento de corpo e Comprimento de cauda, de girinos alimentados com e sem probiótico comercial.

Os resultados de ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), taxa de sobrevivência (TS) e taxa de crescimento específico (TCE) de girinos de rã-touro, alimentados com e sem probiótico, encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Valores médios* dos parâmetros zootécnicos de girinos de rã-touro alimentados com e sem probiótico comercial

Tratamento	PT (g)	CTotal (cm)	CCorpo (cm)	CCauda (cm)	GP (g)	(TCE) (%)	(CA)	Sobrevivência (%)
T1	6,63 ^b	8,74 ^b	2,90 ^b	5,83 ^b	6,43 ^b	5,36 ^b	2,92 ^c	92,5
T2	7,96 ^b	9,69 ^b	3,09 ^b	6,59 ^b	7,78 ^b	6,48 ^b	2,72 ^b	94,16
T3	10,92 ^a	11,04 ^a	3,50 ^a	7,54 ^a	10,74 ^a	8,95 ^a	2,35 ^a	95
T4	8,25 ^b	9,87 ^{ab}	3,12 ^b	6,75 ^{ab}	8,06 ^b	6,72 ^b	2,32 ^a	90

FONTE: O autor (2017).

* Letras diferentes apresentam diferença significativas entre si (p <0,05);

PT - Peso Total, CTotal - Comprimento total, CCorpo - Comprimento do corpo, CCauda - Comprimento da cauda, GP- ganho de peso, TCE- Taxa de crescimento específico, CA- conversão alimentar;

T1 - Tratamento com utilização de probiótico na água; T2 - Tratamento com utilização de probiótico na ração; T3 - Tratamento com utilização de probiótico na água e na ração; T4 - Tratamento sem utilização de probiótico (controle).

Os resultados referentes ao perfil leucocitário e a contagem diferencial de leucócitos de girinos de rã-touro, alimentados com e sem probiótico, encontram-se na tabela 4.

Tabela 4. Médias dos números absolutos* de leucócitos e da contagem diferencial de leucócitos de girinos de rã-touro alimentados com e sem probiótico comercial

Tratamento	Leucócitos (mm ³)	Eosinófilos (mm ³)	Neutrófilos (mm ³)	Linfócitos (mm ³)	Monócitos (mm ³)
T1	2.766,67 ^a	431,9± 207,4	50,75 ^b ±62,72	1867,8±231,9	280,55±126,7
T2	2.773,34 ^a	390,4±329,5	105,73 ^{ab} ±56,21	1.769,1±334,9	346,20±128,7
T3	2.966,67 ^a	461,0±369,5	113 ^{ab} ±38,26	1.916,7±497,1	221,00±129,3
T4	2.246,67 ^b	410,0±221,6	132,38 ^a ±88,14	1.435,7±434,0	210,13±108,8

FONTE: O autor (2017).

* Letras diferentes apresentam diferença significativas entre si (p <0,05);

T1 - Tratamento com utilização de probiótico na água; T2 - Tratamento com utilização de probiótico na ração; T3 - Tratamento com utilização de probiótico na água e na ração; T4 - Tratamento sem utilização de probiótico (controle).

Os números absolutos e os valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos, para basófilo (BS), encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Médias e desvio médio dos números absolutos e dos valores percentuais da contagem diferencial de leucócitos para basófilo (BS) utilizando o modelo generalizado assumindo distribuição binominal, de girinos de rã-touro alimentados com e sem probiótico comercial

Tratamento	X (média)	Basófilo	X (média)	BS%
T1	4,68	107 ±95,21	1,3063	3,69 ^a ± 3,05
T2	4,36	77 ± 67,80	1,0532	2,86 ^{ab} ± 2,48
T3	3,69	40,13 ±42,04	0,2877	1,33 ^b ± 1,37
T4	3,17	23,73 ±29,34	0,1252	1,13 ^b ± 1,39

FONTE: O autor (2017).

* Letras diferentes apresentam diferença significativas entre si ($p < 0,05$);

T1 - Tratamento com utilização de probiótico na água; T2 - Tratamento com utilização de probiótico na ração; T3 - Tratamento com utilização de probiótico na água e na ração; T4 - Tratamento sem utilização de probiótico (controle).

4 DISCUSSÃO

Segundo FERREIRA (2003), existem poucos dados sobre os parâmetros de qualidade de água ideais para a produção de rãs, principalmente na fase larval, sendo muitas vezes utilizados dados oriundos da piscicultura ou da carcinicultura. No presente estudo, a temperatura do ar do ambiente experimental foi controlada e mantida na faixa de 23°C, de modo que a temperatura da água se mantivesse próxima a esse valor, corroborando com a temperatura ideal para crescimento e desenvolvimento de girinos segundo CRIBB et al. (2013), que é de 23 ±2°C.

A temperatura da água influencia diretamente no metabolismo, portanto no crescimento e no desenvolvimento dos girinos, que são pecilotérmicos e totalmente dependentes da água, tornando-se um dos fatores mais importantes a serem controlados (HOFFMAN, 1988; CRIBB et al., 2013). A temperatura encontrada para todos os tratamentos ficou dentro do esperado, não influenciando diretamente os outros parâmetros de qualidade de água.

O pH apresentou pouca variação entre os tratamentos, sendo o maior valor de média (8,03) encontrado para o tratamento controle (T4), que era isento de probiótico, e o menor valor de média (7,6) para o tratamento que recebia probiótico na água e na ração (T3). A faixa de pH compreendida entre 6,5 e 7,5 é considerada ideal para a criação de girinos de rã-touro (CRIBB et al., 2013), no entanto, de acordo com FERREIRA (2003), níveis de pH entre 6 e 8 já foram

observados em ranários sem maiores danos aos animais. SEIXAS FILHO et al (2013) demonstraram que os níveis de proteína na ração podem causar maior mortalidade em girinos de rã-touro do que variações pequenas de pH, uma vez que conseguiram bons resultados de desempenho zootécnico trabalhando na faixa de 7 a 8,9.

O oxigênio dissolvido (OD) na água possui maior importância para girinos na fase inicial da sua vida, pois sua respiração é fundamentalmente branquial (LIMA e AGOSTINHO, 1992; CRIBB et al., 2013), pois, conforme se desenvolve, suas brânquias vão perdendo a importância e os pulmões passam a ser responsáveis pelo aproveitamento do oxigênio atmosférico. Segundo LIMA E AGOSTINHO (1992), a proporção ideal de OD para girinos de rã-touro é ≥ 4 mg/L, uma vez que a baixa concentração deste gás na água é mais prejudicial pela fermentação dos restos de ração e fezes, com a produção de substâncias tóxicas, do que pela própria necessidade respiratória dos animais. No presente estudo, os valores do OD, em todos os tratamentos, ficaram pouco abaixo do desejável (Tabela 2), porém acima da faixa de tolerância estipulada por CRIBB et al. (2013), que é de 1,5 mg/L.

O T4 apresentou os maiores valores para oxigênio dissolvido, diferindo dos demais tratamentos em que o probiótico comercial foi utilizado. Acredita-se que a presença dos micro-organismos tenha aumentando a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) nos tanques, resultando nos valores mais baixos. Tal fato pode ser verificado, uma vez que o T3, que foi caracterizado pela presença de probiótico tanto na água como na ração, apresentou os menores valores. Por outro lado, em relação a melhora dos parâmetros de qualidade de água na criação de peixes e camarões, IBRAHEM (2015) afirma que a utilização de probióticos possui múltiplas vantagens, tais como: a redução nas concentrações de compostos nitrogenados e do fósforo, melhora na decomposição da matéria orgânica, aumento do crescimento de algas, aumento dos níveis de oxigênio dissolvido e controle de compostos tóxicos.

Os valores encontrados para amônia e nitrito (Tabela 2) não ultrapassaram os valores limítrofes, estipulados por FERREIRA (2003), para a criação de girinos de rã-touro, o que pode ser observado pela ausência de mortalidade expressiva ou de problemas relacionados à toxidez desses compostos. Ainda que todos os valores encontrados tenham sido ótimos para a criação dos girinos, nos tratamentos em que o probiótico foi administrado diretamente na água (T1/T3), os valores de amônia apresentaram-se mais baixos, muito provavelmente pela atuação dos micro-organismos como biorremediadores.

Segundo MOURIÑO et al. (2012), os biorremediadores proporcionam a melhoria do ambiente de criação, visando acelerar a remoção e a biodegradação de contaminantes indesejáveis, como: amônia, nitrito, nitrato e gás sulfídrico presentes na água ou no lodo

existente no fundo dos viveiros. Estes mesmos autores ainda afirmam que, os produtos biorremediadores que utilizam micro-organismos vivos também são chamados de bioaumentadores, ainda que na aquicultura muitos produtores utilizem a palavra “probiótico” para esta finalidade. Além disso, alguns gêneros de bactérias, como o *Bacillus*, são mais usados por apresentarem uma boa capacidade de esporulação e possuírem grande eficiência na degradação de material orgânico.

De maneira geral, os parâmetros de qualidade de água obtidos e a densidade estipulada (1 girino/L), foram adequados para o crescimento e o desenvolvimento dos girinos de rã-touro, assim como determinam FERREIRA et al. (2002) nas orientações básicas para a criação de rãs.

De acordo com CASTRO e PINTO (2000), é a partir da resposta das análises dos dados de qualidade de água que se planeja a quantidade a ser renovada por dia. O volume de 10% de renovação diária de água, estipulado no presente estudo, é menor que os 25%/dia recomendado por CRIBB et al. (2013) para tanques artificiais de girinos, mas ainda assim mostrou-se satisfatório ao longo de todo o experimento. Isto provavelmente se deve à forma de coleta das excretas e sujidades do fundo dos aquários, uma vez que a drenagem foi feita por sifonagem.

Como pode ser observado na figura 1, a partir da terceira semana, o T3 apresentou os melhores resultados para o peso total (PT), diferindo, estatisticamente ($p < 0,05$), dos tratamentos 1, 2 e 4, demonstrados na tabela 3. Acredita-se que a utilização do probiótico comercial tanto na água como na ração tenha sido responsável pelo peso final obtido.

DIAS (2006) trabalhou com rãs-touro pós-metamorfoseadas, por um período de 112 dias, com dois probióticos diferentes - P1, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium*; e P2 - *Bacillus subtilis* - e observou aumento do ganho de peso nas rãs alimentadas com probiótico até atingirem 200g, independente da dose utilizada (5 ou 10g/kg ação), quando comparados ao grupo controle (não recebeu probiótico na alimentação).

Já FRANÇA (2007), ao administrar probióticos para imagos de rã-touro, verificou que aqueles que receberam o produto apresentaram peso médio final maior do que aqueles em que o produto não foi administrado (grupo controle), ainda que não tenham diferido estatisticamente.

PEREIRA et al. (2016) trabalharam com probióticos autóctones para girinos de rã-touro e encontraram maior ganho em peso em girinos alimentados com suplementação dietética de *Lactobacillus plantarum*, o que, segundo os autores, pode ser explicado pelo melhor

aproveitamento dos nutrientes em decorrência das enzimas digestivas produzidas por este micro-organismo.

CRIBB et al. (2013) determinaram que o peso final ideal de girinos em clímax metamórfico deve ser $\geq 8g$, o que foi obtido em praticamente todos os tratamentos realizados no presente estudo, com destaque para o T3. Já AFONSO (2016a) obteve média de peso final para girinos de rã-touro igual $15,98 \pm 2,65g$, no entanto, este autor trabalhou com densidades de 5 litros de água por girino e seu modelo experimental foi baseado em tanques de terra, que, segundo ele, propiciam melhores condições para o crescimento e desenvolvimento dos animais. Apesar de baixas densidades apresentarem melhor crescimento e, conseqüentemente, maior peso final para girinos, como afirmam HAYASHI et al. (2004), desde que a qualidade da água seja mantida dentro dos parâmetros desejáveis e o alimento esteja disponível, os resultados de peso e comprimento finais para os girinos serão satisfatórios (FLORES-NAVA e MUÑOZ, 1999).

Em relação ao comprimento total e da cauda verificou-se que os tratamentos 3 e 4, não diferiram significativamente entre si, como demonstrado na tabela 3. No entanto, o T3 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos onde o probiótico foi utilizado (T1/T2).

Da mesma forma que ocorreu com o PT, ao analisar o comprimento do corpo (CCorpo), nos diferentes tratamentos, verificou-se que o T3 apresentou valor médio final superior e estatisticamente significativo quando comparado aos demais tratamentos, que não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Todas as medidas de comprimento e o peso total evidenciaram a maior eficácia do T3, ou seja, a administração do probiótico tanto pela via ambiental (água) como pelo alimento (ração), mostrou ser a melhor opção de manejo alimentar voltado ao crescimento dos animais.

O alimento utilizado no presente estudo foi elaborado a partir da mistura de uma ração comercial de peixes com elevado teor proteico (40% de PB) e farelo de trigo peneirado. Seu teor proteico final ficou em 25,21%, o que se aproxima dos dados obtidos por SEIXAS FILHO et al. (2011), que, ao avaliarem o nível de proteína que resultaria em melhor desempenho de girinos de rã-touro, concluíam que níveis de proteína na ração da ordem de 28% de proteína bruta (PB), apresentaram melhores resultados que rações contendo 22% e 24% de PB.

Segundo ISHIZUYA-OKA et al (2010), a deposição e o acúmulo de proteínas, principalmente na cauda do girino, são necessários durante o clímax da metamorfose, quando ocorre apoptose da cauda e relocação de proteína para transformação da estrutura do animal de vida aquática para vida terrestre. AFONSO et al. (2017) demonstraram que o teor proteico

encontrado na cauda do girino da rã-touro equivale aquele presente na rã adulta. Estes autores ainda encontraram, na análise da matéria seca do filé de cauda, teor proteico médio igual a 93,84%, o maior entre os produtos de origem animal normalmente utilizados na alimentação humana.

SEIXAS FILHO et al. (2012) avaliaram o desempenho zootécnico de girinos de rã-touro com diferentes níveis de proteína e energia digestíveis nas rações e concluíram que existe ineficiência de dietas com altos níveis proteicos para girinos, sendo a melhor taxa de eficiência proteica obtida na ração com 27% de PB. No presente estudo, a preocupação com o uso correto de níveis ideais de proteína se deu uma vez que, um dos maiores problemas existentes na ranicultura está diretamente ligado ao fígado, principalmente na fase larval das rãs, pois quaisquer alterações nas funções hepáticas causadas por alimentos impróprios podem gerar lesões irreversíveis, comprometendo, assim, a funcionalidade do órgão e a sobrevivência dos animais (SEIXAS FILHO et al., 2008).

O ganho de peso apresentado pelos animais, ao longo do período experimental (120 dias), pertencentes ao T3 (10,74 g) foi superior e significativamente diferente quando comparado aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos por SEIXAS FILHO et al. (2011), que obtiveram GP quinzenal médio igual a 1,24 g quando trabalharam com girinos de rã-touro submetidos a dieta contendo ração com 28% de PB. No entanto, estes autores encontraram valores de CA médios de 3,33, contrastando com os melhores valores obtidos no presente estudo, de 2,32 e 2,35, para T4 e T3, respectivamente.

Valores de GP melhores (3,98 g) foram encontrados, para a última quinzena do estudo (45° ao 60° dia), por SEIXAS-FILHO et al. (2008), que avaliaram o desempenho e atividades enzimáticas em girinos de rã-touro. Entretanto, a CA obtida (3,67) foi superior ao presente estudo. Índices de CA mais baixos para girinos de rã-touro foram encontrados por PINTO et al. (2015) (1,3) e AFONSO (2016) (1,24), que utilizaram rações na faixa dos 28% de PB na alimentação dos animais, porém, os valores encontrados no presente estudo são compatíveis com a viabilidade econômica para a fase de larvicultura estabelecida por MOREIRA et al. (2013).

Os melhores valores obtidos por FRANÇA (2007), utilizando probióticos na ração de girinos de rã-touro, foram encontrados para a suplementação com o *Bacillus subtilis*, resultando em GP final de 2,1 g, CA de 4,19 e taxa de sobrevivência de 83,33%. No presente estudo, todos os ganhos de peso, inclusive o do grupo controle, foram muito superiores, além disso, as piores taxas (CA de 2,92 e sobrevivência de 92,5%), encontradas no T1 (probiótico na água), também se mostraram superiores.

Os índices de sobrevivência apresentados no presente estudo encontram-se dentro da normalidade encontrada nos ranários comerciais, que pode apresentar mortalidade de até 30% para a fase de girinagem (CRIBB et al., 2013).

No que se refere à TCE, o T3 apresentou o melhor percentual (8,95%), que inclusive diferiu significativamente dos demais tratamentos e do grupo controle. Ao trabalhar com girinos de rã-touro, PINTO et al. (2015) encontraram valores de 6,83% ao dia, no entanto, esses autores utilizaram o dobro da densidade do presente estudo, ou seja, 2 girinos por litro.

As análises hematológicas estão representadas nas tabelas de 4 e 5. A avaliação dos leucócitos indicou não existir diferença significativa entre os tratamentos em que o probiótico foi utilizado, com destaque para os valores absolutos de T3, no entanto, todos diferiram ($p < 0,05$) do grupo controle, corroborando com CASTRO (2003), que afirma que a utilização de probióticos tem como consequência a proliferação de células do sistema imune nos animais, melhorando sua resposta imunológica.

FRANÇA (2007), ao avaliar o perfil hematológico de girinos de rã-touro, não encontrou diferenças significativas entre os tratamentos com probiótico e o grupo controle. Comparando-se os valores encontrados por este autor com o presente estudo (Tabela 4), podem ser observadas muitas diferenças. O número médio de leucócitos totais variou de 9.893,67 a 17.109,51 células por mm^3 , sendo, portanto, superiores aos valores obtidos no presente estudo (Tabela 4). Levando-se em consideração que o grupo controle testado pelo autor já possuía quatro vezes mais células imunológicas que os animais do presente estudo, acredita-se que os animais poderiam estar enfrentando algum tipo de desafio imunológico. Por outro lado, os valores de monócitos foram superiores no presente estudo, chegando a valores médios de 346 células por mm^3 no T2, quando comparados a 93,32 células por mm^3 , obtidos por FRANÇA (2007).

Desta forma, como mostra o presente estudo, são necessárias maiores pesquisas na fase larval das rãs, diminuindo assim a taxa de mortalidade e melhorando as condições imunológicas dos animais. O uso de probióticos na água ou na ração podem ser alternativas viáveis para que se obtenham melhores índices de sobrevivência, bem como zootécnicos.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados foi possível concluir que o uso de probiótico na ração e na água, representado pelo Tratamento 3, obteve os melhores resultados em relação ao peso total, comprimento de corpo, ganho de peso e taxa de crescimento específico, quando comparados aos demais tratamentos e ao grupo controle. Além disso, todos os tratamentos que envolveram a utilização de probiótico promoveram um aumento do número de células totais de defesa nos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, A. M. Ranicultura se consolida com cadeia produtiva operando em rede interativa. **Revista Visão Agrícola**, v. 11, p. 33-35, 2012.
- AFONSO, A.M. **Desenvolvimento de produtos alimentícios a partir da musculatura da cauda de girinos de rã-touro americana (*Lithobates Catesbeianus* Shaw, 1802)**. 2016. 110p. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal), Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense.
- AFONSO, A.M. et al. Frog tail: A Source of protein to feed the future. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, p. 112-123, 2017.
- AFONSO, A.M. et al. Metodologia de abate de girinos de rã-touro para obtenção de filés de cauda e subprodutos não comestíveis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** (Impresso), v. 23, p. 104-108, 2016.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). 2012 **Official methods of analysis of AOAC International**, 19 ed. AOAC International: Gaithersburg.
- BAUMGARTEN, M.G.Z. (1996) Manual de análises em oceanografia química. Reo Grande: Ed. Furg, (1996) 132p. ISBN: 858504246X
- CASTRO, J. C. Uso de aditivos e probióticos em rações animais. **Ferreira, C.M., MJT Ranzani-Paiva, P.C. Teixeira, F.M. França e D.C. Dias. I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v. 34, p. 12-18, 2003.
- CASTRO, J.C.; PINTO, A.T. Qualidade da água em tanques de girinos de rã- touro, (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), cultivados em diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p.1903-1911, 2000.
- CRIBB, A. Y. et al. **Manual técnico de ranicultura**. Brasília; Embrapa, 2013. 73p.
- DALL, W.; MORIARTY, D. J. W. Functional aspects of nutrition and digestion. **The biology of Crustacea**, v. 5, p. 215-261, 1983.

- DIAS, D.C. et al. Uso de probiótico em ração de rã-touro, *Rana catesbeiana*: desempenho produtivo. **Arquivo de Zootecnia**, v.57: p.449-455, 2008.
- DIAS, D.C. **Influência de probióticos no desempenho produtivo e fisiológico de rã-touro *Rana catesbeiana* Shaw, 1802**, 2006. 80p. Dissertação (Mestrado em aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho.
- FENERICK J. Jr, et al. Parâmetros hematológicos de rã touro, *Rana catesbeiana* alimentada com diferentes rações comerciais. **Boletim Instituto de Pesca** v.32, p.173 – 181, 2006.
- FERREIRA, C. M et al. **Introdução à ranicultura**. São Paulo: Boletim Técnico do Instituto de Pesca, 2002.15p. (Boletim técnico 33)
- FERREIRA, C. M. A importância da água e sua utilização em ranários comerciais, **Panorama da Aquicultura**, v. 13, p. 15 -17, 2003.
- FLORES-NAVA e MUÑOZ. Growth, metamorphosis and feeding behavior of *Rana catesbeiana* Shaw 1802 tadpoles at different rearing densities, **Aquaculture Research**, v. 30, p. 341-347, 1999.
- FRANÇA F.M. et al. Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) Instituto de Pesca, v.34, p. 403 - 412, 2008.
- FRANÇA, F.M. **Efeito da utilização de probiótico no desempenho, resposta imune e hematológica de girinos e imagos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)**, 2007, 100p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Pós-graduação em Aquicultura e Pesca, Instituto de Pesca.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of applied bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- FULLER, R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. **British Poultry Science**, v. 18, p.85-94, 1977.
- GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, v. 16, p. 183-190, 1960.
- GUZMAN, G. A. Aplicación de probióticos en la acuicultura. Memorias del primer simposium internacional de nutrición acuícola. San Nicolás de los Garza: Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, p. 332-337, 1992.
- HAYASHI, C. et al. Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana ca/tesbeiana* Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.14-20, 2004.
- HOFFMANN, D. F. Efeito da temperatura e da possibilidade de coprofagia no desempenho e desenvolvimento de girinos de rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). 1988. Tese de Doutorado. Tese de Mestre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- IBRAHEM, Mai D. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 6, p. 765-791, 2015.
- ISHIZUYA-OKA, A. et al. Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. **Apoptosis**, v.15, p.350-364, 2010.
- KOROLEFF, F. (1976) Determination of nutrients. pg. 117-181. In: Grasshoff, K. (ed.) *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie Weinheim. DOI: 10.1002/9783527613984.ch10

- LEE, Y. K. et al. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, 1992. 168p.
- MOREIRA, C.R. et al. Frog farms as proposed in agribusiness aquaculture: economic viability based in feed conversion. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39, p. 389-399, 2013.
- MOURIÑO, J.L.P et al. A importância da biorremediação na aquicultura, Panorama da Aquicultura v. 131, p. 1-6, 2012.
- PEREIRA, S. A. et al. Autochthonous probiotic *Lactobacillus* sp. in the diet of bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* improves weight gain, feed conversion and gut microbiota. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, p. 1-7. 2016.
- PINTO D. F. H. et al. Optimal digestible protein level for bullfrog tadpoles. **Aquaculture**, v. 440, p.12-16, 2015.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus Gunther, 1880* (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunas de Cananéia-SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, p. 23-40, 1995.
- RIBEIRO-FILHO, O.P. Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) com uso de extrato bruto hipofisário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, p.658-663. 1998.
- ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Membro do Instituto Butantã**, v. 20, p. 329-334, 1947.
- SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: **Fundação Arthur Bernardes -UFV-Viçosa**, 2007
- SEIXAS FILHO J. T., Regime alimentar de girinos de rã touro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, p. 17-22, 2013.
- SEIXAS FILHO, J. T et al. Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanques-rede Revista Brasileira Saúde Produção Animal, v.13, p.1112-1120, 2012.
- SEIXAS FILHO, J. T. et al. Desempenho e atividades enzimáticas de girinos de rã touro Pesquisa agropecuária brasileira, v.43, p.1617-1624, 2008.
- SEIXAS FILHO, J.T. et al. Alimentação de girinos de rã-touro com diferentes níveis de proteína bruta. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.250-256, 2011.
- ZIEMER, C. J. e GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, , v.8, p. 473-479, 1998.

APÊNDICE 1 ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DOS ANIMAIS PARA O LABORATÓRIO



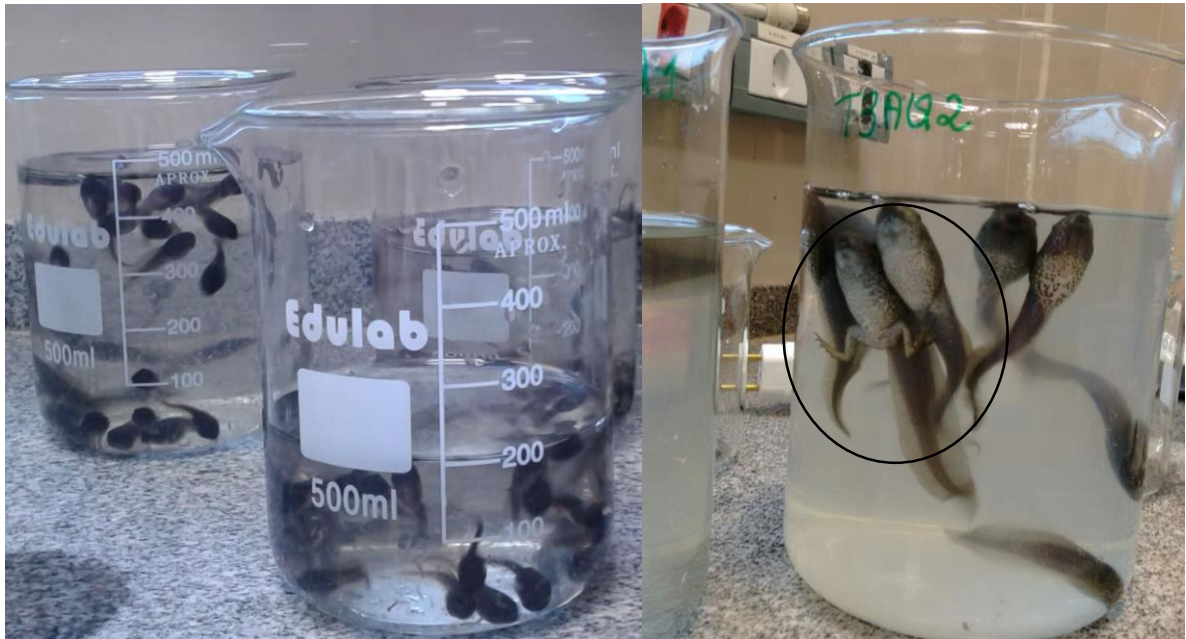
Imagem ilustrativa do acondicionamento dos animais para transporte ao laboratório de carcinicultura.

APÊNDICE 2 CONTAGEM DOS ANIMAIS PARA INÍCIO DO EXPERIMENTO



Imagem ilustrativa da contagem dos animais para início do experimento.

APÊNDICE 3 ANIMAIS SEPARADOS PARA A REALIZAÇÃO DA BIOMETRIA



Imagens ilustrativas dos animais em épocas e fases diferentes de desenvolvimento, nota-se a presença de G3 (círculo à direita).

APÊNDICE 4 PESAGEM DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO



Imagem ilustrativa das pesagens dos animais durante o experimento.

APÊNDICE 5 BIOMETRIA (MEDIDAS DE CORPO DOS ANIMAIS)



Imagens demonstrando a tomada de medidas do corpo dos animais com auxílio de paquímetro digital.

APÊNDICE 6 BIOMETRIA (MEDIDAS DA CAUDA DOS ANIMAIS)



Imagem ilustrativa da medição da cauda do girino de rã-touro

APÊNDICE 7 FOTOMICROGRAFIA DOS LEUCÓCITOS DE GIRINOS DE RÃ-TOURO

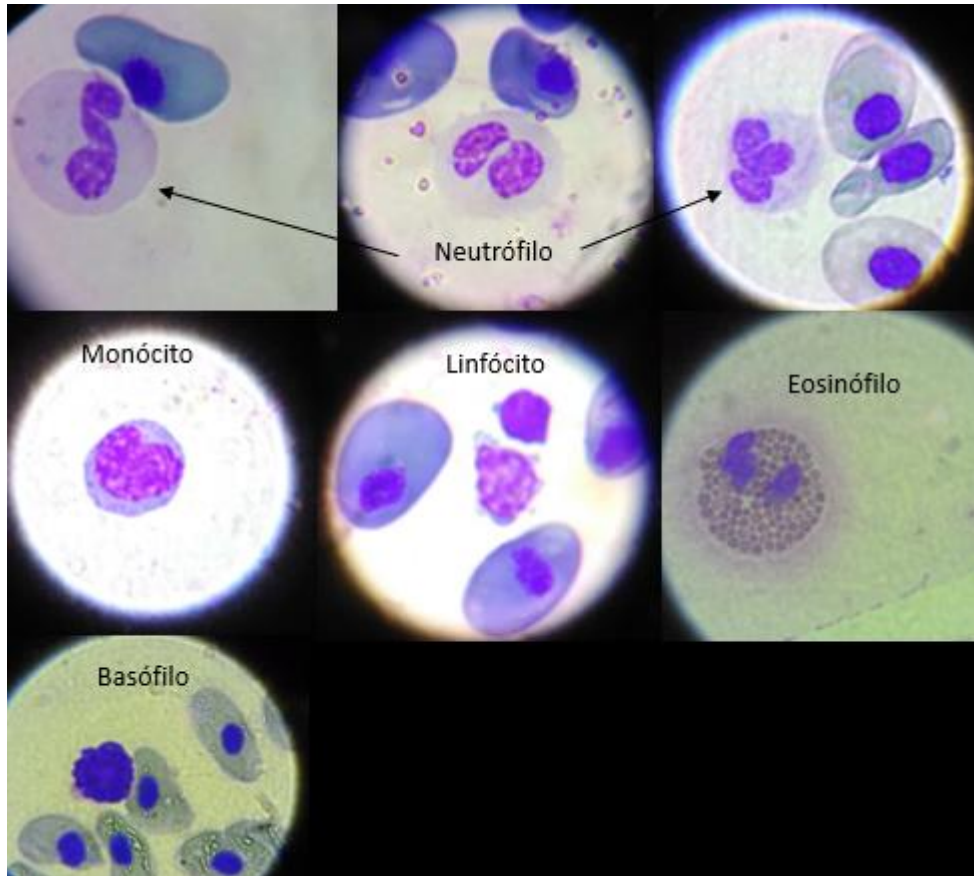


Imagem ilustrativa dos leucócitos de girinos de rã-touro americana (*Lithobates catesbeianus*) (aumento de 1000x).

APÊNDICE 8 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO SETOR PALOTINA (UFPR)

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - UFPR - Setor Palotina



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certifico que o formulário sob o protocolo nº 46/2015 referente ao projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do uso de probiótico em girinos de rã touro americana (*Lithobates catesbeianus*)" sob responsabilidade de Prof. Dr. Leandro Portz foi apreciado pela CEUA/Palotina e considerado **APROVADO**.

O Docente responsável pelo envio do formulário deve estar ciente de que deve:


- informar qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo;
- morte ou doenças inesperadas que tenham ocorrido durante o transcurso do estudo e quais medidas foram tomadas;
- informar sobre a necessidade de modificações ou emendas ao protocolo que foi descrito e aprovado, identificando a parte do protocolo a ser modificada e apresentando justificativas claras

Palotina, 17 de dezembro de 2015.

CERTIFICATE OF APPROVAL

The form under protocol N.46/2015 referent to research entitled **Evaluation of the use of probiotics in american bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*)** under responsibility of Prof. Dr. Leandro Portz was discussed by CEUA/Palotina and considered **APPROVED**.

Palotina, December 17, 2015.


 Prof.ª Dr.ª Erica Cristina Bueno do Prado
 Coordenação CEUA/Palotina
 Ciências Veterinárias - DCV
 UFPR / Palotina - SIAD 190462
 Médica Veterinária - CRMV/PR 7403

APÊNDICE 9 NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA (VERSÃO FEVEREIRO 2017)

INSTRUÇÃO AOS AUTORES

BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA (BIP), ISSN 0046-9939 (impresso) e ISSN 1678-2305 (online), está classificado atualmente no WEBQUALIS como B1 nas áreas de Zootecnia e Recursos Pesqueiros, Ciências Ambientais e Ciências de Alimentos; e como B2 em: Medicina Veterinária e Ciências Agrárias I. Seu índice de impacto no JCR é 0,525.

Os arquivos eletrônicos contendo o original e demais documentos necessários devem ser encaminhados ao Comitê Editorial do Instituto de Pesca, pelo e-mail: ceipboletim@gmail.com

O BIP é destinado à publicação de documentos originais (artigos científicos e notas científicas), que contribuam para a ampliação do conhecimento nas áreas de pesca (tecnologia de pesca, biologia pesqueira, sociologia e economia pesqueiras), aquicultura, limnologia, ecologia aquática, tecnologia e sanidade do pescado e patologia de organismos aquáticos.

É publicado um volume por ano, com o pertinente número de fascículos. O processo de avaliação utilizado pelo Comitê Editorial do Instituto de Pesca é o sistema por pares “blind review”, ou seja, sigilo sobre a identidade, tanto dos autores quanto dos revisores, que será mantido durante todo o processo.

O periódico também aceita e incentiva submissões de artigos redigidos em inglês ou espanhol. Em caso de autores não nativos de países que falem estas línguas, o artigo deverá ser revisado por um especialista que o próprio Comitê Editorial do Instituto de Pesca poderá indicar.

Todo trabalho submetido ao Boletim será avaliado preliminarmente pelo Comitê Editorial e, se superar essa primeira triagem, será enviado, inicialmente, para dois revisores especialistas na área abordada. A publicação se dará somente com a aprovação do documento pelos revisores, cabendo ao Comitê Editorial do Instituto de Pesca a decisão final do aceite.

A seleção dos artigos será baseada na originalidade, qualidade e mérito científico. O Comitê Editorial tomará o cuidado para que os revisores de cada artigo sejam, obrigatoriamente, de instituições distintas daquelas de origem dos autores. O Boletim do Instituto de Pesca tem uma política de rastreamento por plágio, assim sendo, artigos que forem detectados serão automaticamente negados e devolvidos. Caso seja detectado a posteriori o artigo será despublicado. O Boletim do Instituto de Pesca utiliza o software para detectar casos de plágio. O software verifica os conteúdos nos bancos de dados de periódicos e na internet. O software gera um relatório de similaridade, destacando a porcentagem de sobreposição entre o artigo enviado e o material publicado. Qualquer ocorrência de sobreposição de conteúdo é examinada por suspeita de plágio de acordo com as Políticas Editoriais. O Boletim do Instituto de Pesca permite uma semelhança global de 20% para um manuscrito ser considerado para publicação.

As opiniões emitidas nos trabalhos são de exclusiva responsabilidade de seus autores. O Boletim do Instituto de Pesca reserva-se o direito de realizar pequenas adaptações nos originais visando manter a uniformidade da publicação.

Tipos de documentos publicáveis no BIP:

Artigo Científico - Trabalho resultante de pesquisa científica, apresentando dados originais obtidos de forma planejada, com base em métodos cientificamente aceitos, rigorosamente controlados e com planejamento estatístico adequado, que possam ser replicados e generalizados. A discussão deve ser criteriosa, com base científica sólida; não deve se limitar a comparações dos resultados com a literatura, mas apresentar inferências, hipóteses e argumentação sobre o que foi estudado.

Nota Científica - Comunicação curta de fato inédito resultante de pesquisa científica, cuja divulgação imediata se justifica, mas com informações insuficientes para constituir um artigo científico. Incluem-se nesta categoria a descrição de uma técnica, o registro da descoberta de uma nova espécie, observações e levantamentos de resultados de experimentos que não podem ser repetidos, e outras situações únicas. Deve ter o mesmo rigor de um Artigo Científico e conter os elementos necessários para avaliação dos argumentos apresentados.

PROCEDIMENTOS EDITORIAIS

Custo de publicação

O custo é de R\$ 40,00 (quarenta reais) por página final editorada para publicação. No ato da submissão é requerido um depósito de R\$ 100,00 (cem reais) não reembolsáveis, mas deduzido do custo final dos artigos aprovados.

Os depósitos ou transferências deverão ser efetuados em nome da FUNDAG, no Banco do Brasil: agência 3360-X – conta corrente 4200-5, código de identificação do depósito: 1161. O comprovante de depósito ou transferência deve ser enviado para o e-mail do Comitê Editorial (ceipboletim@gmail.com). Para que não seja paralisado o processo de avaliação do trabalho e emissão de recibo de pagamento da FUNDAG, enviar os seguintes dados: Nome, CPF, telefone e endereço completo (incluir o bairro e o CEP). Sem a identificação do autor do depósito, o processo de avaliação do trabalho não será iniciado.

Submissão de trabalho

O trabalho deverá ser enviado via e-mail, devidamente identificado, em arquivo do WORD. Em trabalhos que envolvam a manipulação de vertebrados deve ser encaminhado um atestado de que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição de origem da pesquisa. Após a aprovação do trabalho, deverá ser encaminhado ao Comitê Editorial o documento Cessão de Direitos Autorais e Autorização para Publicação em Meio Eletrônico, contendo apenas a assinatura do autor responsável pela submissão do trabalho, e cujo modelo está em: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>.

Avaliação do trabalho

1. O trabalho submetido será em primeira instância avaliado pelo Comitê Editorial.
2. Após aprovação preliminar pelo Comitê Editorial, e segundo a ordem cronológica de recebimento, o trabalho será enviado a no mínimo dois revisores de reconhecida competência no assunto abordado. Em seguida, se necessário, retornará ao(s) autor(es) para

modificações/correções. O retorno do texto poderá ocorrer mais de uma vez, se assim o(s) revisor(es) solicitar(em).

3. O trabalho será aceito para publicação se tiver dois pareceres favoráveis, ou rejeitado quando pelo menos dois pareceres forem desfavoráveis. No caso de pareceres contraditórios entre os revisores, o trabalho será enviado a um terceiro revisor.

4. O trabalho aceito retornará ao(s) autor(es) para ultimar eventuais alterações propostas e realizar rigorosa revisão, antes que o documento seja submetido ao processo de editoração e formatação ao estilo do Boletim. O prazo para devolução dessa versão final revisada será de sete dias.

ATENÇÃO: se o trabalho for rejeitado na avaliação prévia do Comitê Editorial (por inadequação às normas do BIP, por não se enquadrar no escopo temático da revista, por problemas redacionais [impropriedades linguísticas, morfológicas ou sintáticas] ou por falta de qualidade técnica) ou na avaliação final dos revisores “ad hoc”, o depósito não será devolvido, nem poderá ser reutilizado para outras submissões dos autores.

Disposições finais

Casos omissos serão avaliados pelo Comitê Editorial do Instituto de Pesca.

FORMATAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

Instruções gerais

O trabalho deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, de acordo com a seguinte formatação: fonte Book Antiqua, tamanho 11; espaçamento entre linhas: 1,5; tamanho da página: A4; margens esquerda e direita: 2,5 cm; margens superior e inferior: 3,0 cm; número máximo de páginas, incluindo Figura(s) e/ou Tabela(s) e Referências: Artigo Científico: até 25 páginas; Nota Científica: até 15 páginas. As linhas devem ser numeradas sequencialmente, da primeira à última página. As páginas também devem ser numeradas. As notas de rodapé devem estar no texto.

Estrutura de Artigo Científico

A estrutura para o Artigo Científico é a seguinte: Título, Autor(es), Endereços institucionais (completos) e eletrônicos, Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos (opcional), Referências. O Título, o Resumo e as Palavras-chave devem ser traduzidos para o inglês, no caso de artigos redigidos em português ou espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês ou espanhol. Os termos: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Referências devem ser alinhados à esquerda e grafados em letras maiúsculas e em negrito.

TÍTULO

Deve ser claro e conciso (não deve se estender por mais do que duas linhas ou dez palavras), redigido em português e inglês ou, se for o caso, em espanhol, inglês e português. Deve ser

grafado em letras maiúsculas e centralizado na página. No caso de trabalho desenvolvido com auxílio financeiro, informar na primeira página qual o agente financiador, indicado com asterisco, também apostado ao final do título. Recomenda-se que não seja inserido o nome científico da espécie e a referência ao seu descritor, a não ser que seja imprescindível (no caso de espécies pouco conhecidas).

NOME DO(S) AUTOR(ES)

Deve(m) ser apresentado(s) completo(s) e na ordem direta (prenome e sobrenome), com apenas o sobrenome pelo qual o(s) autor(es) deve(m) ser identificado(s) em caixa alta. A filiação do(s) autor(es), bem como um endereço completo para correspondência e um e-mail deverão ser colocados na primeira página, logo após o nome dos autores, sendo identificado(s) por números arábicos, separados por vírgula quando necessário.

Obs: Não serão aceitos trabalhos com mais de seis autores.

RESUMO e Palavras-chave

O Resumo deve conter concisamente os objetivos, a metodologia, os resultados obtidos e as conclusões, utilizando no máximo 200 (duzentas) palavras. Deve ser redigido de forma que o leitor se interesse pela leitura do trabalho na íntegra. Palavras-chave: no mínimo três (3) e no máximo seis (6), redigidas em letras minúsculas e separadas por ponto e vírgula. Não devem repetir palavras que constem do Título e devem identificar o assunto tratado, permitindo que o artigo seja encontrado no sistema eletrônico de busca.

ABSTRACT e Key words

Devem ser estritamente fiéis ao Resumo e Palavras-chave.

INTRODUÇÃO

Deve ocupar, preferencialmente, no máximo duas páginas, apresentando o problema científico a ser solucionado e sua importância (justificativa para a realização do trabalho), bem como a evolução/situação atual do assunto pesquisado. O último parágrafo deve expressar o objetivo, sendo coerente com o que consta no Resumo.

MATERIAL E MÉTODOS

Deve descrever sucintamente toda a metodologia utilizada, organizada de preferência na ordem de aplicação e de modo que o experimento possa ser reproduzido. Este item pode variar de acordo com a natureza temática do documento, mas em geral deve conter a descrição do procedimento amostral local, frequência, período, instrumento e métodos, outras variáveis relevantes ou o delineamento do experimento, a descrição dos tratamentos e das variáveis, o número de repetições e as características da unidade experimental. Deve informar sobre

procedimentos estatísticos e transformações de dados. Deve-se evitar detalhes supérfluos, extensas descrições de técnicas de uso corrente e a utilização de abreviaturas não usuais.

RESULTADOS

Os Resultados devem ser apresentados em separado da Discussão. E isto pode ser feito textualmente ou sob a forma de Tabelas e/ou Figuras. Dados apresentados em Tabelas ou Figuras não devem ser repetidos sistematicamente no texto.

Tabelas:

Devem ser numeradas com algarismos arábicos e encabeçadas pelo Título (autoexplicativo). Recomenda-se que os dados apresentados em tabelas não sejam repetidos em gráficos, a não ser quando absolutamente necessário. As tabelas devem ter, no máximo, 16 cm de largura. As tabelas devem ser em formato “retrato” e não ultrapassar uma página. Abreviaturas também devem ser evitadas, a não ser para unidades de medida. Se necessárias, porém, devem ter seu significado indicado em legenda sob a tabela.

Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotos):

Devem ter, no máximo, 16 cm de largura e 21 cm de altura, ser numeradas com algarismos arábicos, com título autoexplicativo logo abaixo. Palavras em gráficos e mapas devem estar em fonte legível. Não inserir gráficos, mapas ou fotos em tabelas ou quadros. Os gráficos não devem ter linhas de grade nem margens.

Tabelas e figuras devem ser inseridas no item mais apropriado no transcorrer do texto. Os originais de desenhos, mapas e fotos devem ser enviados em arquivos distintos, preferencialmente em formato digital “tif” ou “jpeg, e permitir redução para 16 cm ou 7,5 cm de largura sem perda de definição.

DISCUSSÃO

A Discussão deve ser elaborada e não apenas uma comparação dos dados obtidos com os disponíveis em literatura. Deve focar e demonstrar as principais ideias e contribuições trazidas pelo trabalho, bem como comentar se há necessidade de novas pesquisas ou sobre eventuais limitações encontradas. Evitar repetir números já constantes dos resultados. A Discussão deve conter hipóteses e/ou comentários objetivos sobre os resultados, discutidos à luz de observações constantes da literatura especializada.

CONCLUSÃO

A Conclusão deve ser clara, concisa e responder ao objetivo do estudo. Deve, idealmente, ser capaz de propor uma solução (ou caminho de solução) para a demanda/problema, com base nos resultados obtidos.

AGRADECIMENTOS (opcional)

Devem ser sucintos, dirigidos a Instituição ou pessoa que tenha efetivamente colaborado para a realização do trabalho. De preferência, não deve ultrapassar cinco linhas.

Estrutura de Nota Científica

A Nota Científica deve seguir ordenação similar à de um Artigo Científico, contendo Título, Autor, Endereços institucional e eletrônico, Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultado (s) e, eventualmente, Discussão, Agradecimento(s) (opcional) e Referências. Resultados e Discussão, neste caso, podem ser apresentados como item único. A formatação segue o mesmo padrão, mas com no máximo 15 páginas (incluindo tabelas e figuras).

Obs: Não serão aceitos trabalhos com mais de seis autores.

REFERÊNCIAS (normas para TODOS os tipos de publicação)

Devem ser apresentadas em ordem alfabética do sobrenome dos autores, sem numeração. Devem conter os nomes de todos os autores, ano de publicação, o título do artigo (por extenso) e do periódico (também por extenso), número do volume e/ou edição e número e/ou intervalo de páginas. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido citados no texto são de responsabilidade do autor. Dissertações e teses devem ser evitadas como referências. Porém, aceita-se quando absolutamente necessárias, mas devem estar disponíveis on-line. Trabalhos de conclusão de graduação e resumos apresentados em congressos não são referências válidas.

Observação: inadequações nas referências também acarretarão a recusa do trabalho e a não devolução da taxa de submissão.

Como fazer citações no texto Usar o sistema autor/data, ou seja, o sobrenome do autor em letras maiúsculas e o ano em que a obra foi publicada. Exemplos:

* para um autor: “MIGHELL (1975) observou...”; “Segundo AZEVEDO (1965), a piracema...”; “Estas afirmações foram confirmadas em trabalhos posteriores (WAKAMATSU, 1973)”.

* para dois autores: “RICHTER e EFANOV (1976) pesquisando...” Se o artigo que está sendo submetido estiver redigido em português, utilizar “e” ligando os sobrenomes dos autores. Se estiver redigido em inglês utilizar “and” (RICHTER and EFANOV, 1976), se em espanhol, utilizar “y” (RICHTER y EFANOV, 1976).

* para três ou mais autores: o sobrenome do primeiro autor deve ser seguido da expressão “et al.” (grafada em itálico). Exemplo: “SOARES et al. (1978) constataram...” ou “Tal fato foi constatado na África (SOARES et al., 1978).”

* para o mesmo autor, em documentos de anos diferentes, respeitar a ordem cronológica, separando os anos por vírgula. Exemplo: “De acordo com SILVA (1980, 1985).”

* para citação de vários autores sequencialmente, respeitar a ordem cronológica do ano de publicação e separá-los por ponto e vírgula. Exemplo: “...nos viveiros comerciais (SILVA, 1980; FERREIRA, 1999; GIAMAS e BARBIERI, 2002)...”

* quando for ABSOLUTAMENTE necessário se referir a um autor, ainda que não em razão de uma consulta direta ao trabalho por ele publicado, o nome desse autor deve ser citado em letras minúsculas apenas no texto, indicando-se logo a seguir, entre vírgulas e precedido da palavra latina apud, o nome do autor e ano do trabalho efetivamente consultado no qual aparece a referência ao autor não diretamente lido. Ex.: “Segundo Gulland, apud SANTOS (1978), os coeficientes...”.

Como fazer citações na listagem de REFERÊNCIAS

1. DE DOCUMENTOS IMPRESSOS

Artigos científicos são listados como segue:

BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V.; DE MELO, C.B.; HENRIQUES, M.B. 2014 Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture Research*, 47(4): 1260-1268.

As referências devem ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do autor principal. Havendo mais de uma obra com o mesmo sobrenome, considera-se a ordem cronológica e, persistindo a coincidência, a ordem alfabética do terceiro elemento da referência. Recordando, após o nome dos autores, inserir o ano da publicação, o título do artigo, o título do periódico (em itálico; e que, repetindo, NÃO DEVE SER ABREVIADO), o volume (também em itálico), o fascículo (entre parênteses) e o número/intervalo de páginas.

A citação de dissertação e tese, tipos de documentos que se pode utilizar apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário e se estiver disponível on line, deve ser feita como segue:

BERNADOCHI, L.C. 2012 Captação de sementes em coletores artificiais e cultivo da ostra perlífera *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteriidae), São Paulo, Brasil. São Paulo. 75f. (Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesca, APTA). Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/dissertacoes.pg.php>> Acesso em: 22 ago. 2014.

Para livro, também utilizado apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário, a citação deve ser:

GOMES, F.P. 1978 Curso de estatística experimental. 8ª ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 430p.

ENGLE, R.F.; GRANGER, C.W.J. 1991 Long-run economic relationship: readings in cointegration. New York: Oxford University Press. 301p.

NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D’ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. Freshwater prawns: biology and farming. Wiley-Blackwell, Oxford. 544 p.

Capítulo de livro ou publicação em obra coletiva, cita-se:

MORAES-VALENTI, P.; VALENTI, W.C. 2010 Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D'ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. Freshwater prawns: biology and farming. Wiley-Blackwell, Oxford. p.485-501.

Leis, Decretos, Instruções Normativas e Portarias são incluídas na listagem como segue:

BRASIL, 1988 CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. Diário Oficial da União, Brasília, 05 de outubro de 1988, nº. 191-A, Seção 1, p.1. BRASIL, 2000 LEI nº. 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o Art. 225, § 1º., incisos I, II, III, e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 19 de julho de 2000, nº. 138, Seção 1: p. 45.

BRASIL, 1990 DECRETO nº. 98.897, de 30 de janeiro de 1990. Dispõe sobre as reservas extrativistas e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 31 de janeiro de 1990, nº. 22, Seção 1, p. 2.

BRASIL, 2007 INSTRUÇÃO NORMATIVA nº. 02, de 18 de setembro de 2007. Disciplina as diretrizes, normas e procedimentos para formação e funcionamento do Conselho Deliberativo de Reserva Extrativista e de Reserva de Desenvolvimento Sustentável. Diário Oficial da União, 20 de setembro de 2007, nº. 182, Seção 1, p. 102.

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2010b PORTARIA nº. 77, de 27 de agosto de 2010. Cria o Conselho Deliberativo da Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo/RJ. Diário Oficial da União, Brasília, 01 de setembro de 2010, nº. 168, Seção 1: p. 69.

2. DE MEIOS ELETRÔNICOS (periódicos publicados exclusivamente on line; documentos consultados online e em CD-ROM)

Exemplos:

LAM, M.E.; PAULY. D. 2010 Who is right to fish? Evolving a social contract for ethical fisheries. *Ecology and Society*, 15(3): 16. [online] URL: <http://www.ecologyandsociety.org/vol15/iss3/art16/>> CASTRO, P.M.G. (sem data, on line) A pesca de recursos demersais e suas transformações temporais. Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br/textos.php> Acesso em: 3 set. 2014.

TOLEDO PIZA, A.R.; LOBÃO, V.L.; FAHL, W.O. 2003 Crescimento de *Achatina fulica* (gigante africano) (Mollusca: Gastropoda) em função da densidade de estocagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 55, Recife, 14-18 jul./2003. Anais... Recife: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 1 CD-ROM.

INSTRUÇÕES COMPLEMENTARES

1. Fórmula, expressão e equação matemática.

As fórmulas, expressão e equação matemática devem ser inseridas no texto (não utilizar figura).
Exemplo: $TE = (N/Fm) \times 100$.

2. Unidade de medida.

Deve ser apresentada segundo o Sistema Internacional de Unidades (SI). Exemplo: 10 m²; 100 peixes m⁻¹; 20 t ha⁻¹.

3. Número de casas decimais

Deve ser padronizado para todo o texto. Por exemplo, grafado o comprimento dos exemplares amostrados com uma casa decimal, em todo o texto os valores referentes a esse parâmetro devem ser grafados com uma casa decimal.

4. Anexo e apêndice

Devem ser suprimidos anexos e apêndices.

*As normas do Boletim do Instituto de Pesca podem sofrer alterações. Portanto, não deixe de consultá-las antes de fazer a submissão de um novo artigo ou nota.