Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho e na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

Luis Ricardo Romero Arauco[1], Marta Verardino De Stéfani[2*] e Laura Satiko Okada Nakaghi[3]

*[1]Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. [2]Departamento de Zootecnia, Centro de Aqüicultura, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14844-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. [3]Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Centro de Aqüicultura, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: martavs@fcav.unesp.br*

RESUMO. Foi avaliado o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho e na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro. Foram utilizados 1.400 girinos, distribuídos em vinte tanques experimentais com 70 litros de água, na densidade de um girino por litro. Diferentes concentrações de própolis (0,0; 0,2; 0,5; 1 e 1,5%) foram misturadas à ração comercial (45% Proteína Bruta). O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia. No final do experimento, foi colhido sangue do vaso caudal de cinco girinos de cada repetição. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas pelo método de Rosenfeld (1947), em microscopia de luz. A sobrevivência, o consumo de ração, a conversão alimentar e o comprimento dos girinos não foram influenciados pelo extrato hidroalcoólico de própolis. O ganho de peso foi influenciado ($p < 0,05$), observando-se menor ganho de peso nos girinos que não receberam extrato hidroalcoólico de própolis. A metamorfose foi mais acelerada quando os mesmos receberam própolis. O grupo leucocitário influenciado pela própolis ($p < 0,05$) foram os monócitos, que nas doses de 0,2 e 0,5% apresentaram as maiores porcentagens, diferindo do grupo controle e da dose de 1,5%. Os linfócitos, basófilos, neutrófilos e eosinófilos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

Palavras-chave: peso, sangue, leucócitos, desenvolvimento, ranicultura.

ABSTRACT. Propolis hidroalcoholic extract effect on performance and composition leucocytary of the blood bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). The effect of the propolis hidroalcoholic extract was evaluated on the performance of bullfrog tadpoles. 1,400 tadpoles were used, distributed in twenty experimental tanks with 70 liters of water, in the density of one tadpole per liter. The different levels of propolis (0.0; 0.2; 0.5; 1.0 and 1.5%) were mixed with commercial ration (45% CP). The feeding was four times a day. In the end of the experiment, the blood was collected from the vase flow, in five tadpoles of each repetition. The differential counting of leucocytes was accomplished in red-faced extensions by the method of Rosenfeld (1947), in light microscope. The different levels of propolis hidroalcoholic extract did not influence the survival, consumption, feed conversion and length. Yet the weight gain suffered influence ($p < 0.05$) - it was observed a smaller weight gain in the tadpoles that did not receive propolis hidroalcoholic extract. The metamorphosis was more accelerated when they received propolis hidroalcoholic extract in their diet. The leucocytary group influenced by the propolis ($p < 0.05$) were the monocytes, which in the doses of 0.2 and 0.5%, presented largest percentage, differing from the control group and from the dose of 1.5%. The lymphocytes, basophil, neutrophil, eosinophil did not present statistical difference among the treatments.

Key words: weight, blood, leucocytes, development, frog culture.

Introdução

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

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

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

Conhecer as modificações fisiológicas dos animais por meio do leucograma facilita a orientação do diagnóstico de doenças, desde que a taxa de leucócitos possa ser comparada com seu adequado valor de referência. A morfologia dos leucócitos de anfíbios é amplamente estudada usando microscopia de luz (Cannon *et al.,* 1986).

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

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

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

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

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da Unesp - Campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo, no período de fevereiro a março de 2003.

Foram utilizados 1.400 girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, com peso médio de 0,08 g e 16,61 mm de comprimento, no estágio 26 de Gosner (1960), os quais foram distribuídos em 20 tanques experimentais com 70 L de água, na densidade de 1 girino L^{-1} de água.

O extrato hidroalcoólico de própolis utilizado foi adquirido da empresa Apis Flora Industrial e Comercial LTDA, localizada em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, apresentando as seguintes características: aspecto - líquido límpido, sem partículas em suspensão; cor - âmbar; pH -5,35; teor alcoólico - 56%; propriedade antioxidante - 8 segundos; sólidos solúveis - 11 P/V%; flavonóides totais - 5,45 mg L^{-1}.

Os girinos foram alimentados durante 60 dias com uma ração comercial, farelada, com 0,2 mm de diâmetro (Tabela 1), na qual foram adicionadas de forma homogênea e misturadas manualmente diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de própolis (0,0; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5%). Após esse procedimento, as rações foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C, por 24 horas, para evitar a formação de grumos e, logo após, trituradas em liquidificador e estocadas em freezer.

Tabela 1. Composição porcentual da ração comercial (Poli peixe 450 F, em pó).
Table 1. *Percent composition of commercial ration (Poli peixe 450 F, powdered).*

Nutrientes *Nutrients*	%
Proteína Bruta (PB) *Crude Protein (CP)*	45,0
Extrato etéreo (EE) *Ether Extract (EE)*	9,0
Fibra bruta (FB) *Crude Fiber (CF)*	6,0
Cinza *Ash*	3,0
Cálcio (Ca) *Calcium (Ca)*	8,0
Fósforo (P) *Phosphorus (P)*	1,0
Umidade *Humidity*	12,5

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

O arraçoamento foi a lanço, à vontade, de modo uniforme, quatro vezes ao dia, com o cuidado de observar-se o consumo para não haver muita sobra de ração nos tanques. Antes da alimentação diária, os tanques foram sifonados para a retirada dos dejetos e restos da alimentação anterior.

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

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

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

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

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

No final do período experimental, foi realizada a coleta de sangue de cinco girinos de cada repetição que estavam no estágio 42 (Gosner, 1960). Para isso, utilizou-se seringa de insulina heparinizada, onde uma alíquota de sangue de aproximadamente 10 µL foi colhida por punção do vaso caudal, a qual foi depositada diretamente sobre lâmina e realizada a extensão. As lâminas foram feitas em duplicata.

Para a contagem diferencial de leucócitos foram feitas extensões sanguíneas com o sangue coletado, as quais, após secagem, foram coradas pelo método de Rosenfeld (1947), examinadas sob microscopia de luz, com objetiva de 40x.

Foram analisadas 15 lâminas em cada tratamento, sendo cinco lâminas por repetição, onde cada lâmina representou um animal. Foram contados 100 leucócitos por lâmina, a fim de verificar a freqüência de cada componente celular de interesse. As células foram classificadas em cinco categorias (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, e monócitos), conforme sua morfologia e visualização ao microscópio, tomando-se por base os critérios adotados por Duellman e Trueb (1986) e Coppo (2003).

Para os parâmetros de desempenho, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições representado por: T1 - 0,0; T2- 0,2; T3 - 0,5; T4 – 1,0; e T5 - 1,5% de própolis. Para a contagem diferencial de leucócitos, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (diferentes concentrações) e três repetições. A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey.

Resultados e discussão

Características hidrológicas

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

A temperatura média da água dos tanques durante o período experimental variou de 28,27 ± 0,45 a 28,77 ± 0,34ºC. Esses valores estão dentro da faixa considerada ótima para cultivo de girinos (24,5 a 29,1ºC), segundo Lima *et al*. (2003). Os teores médios de oxigênio dissolvido variaram de 5,75 ± 0,33 a 6,06, ± 0,67 mg L^{-1}, estando dentro do limite aceitável para o cultivo de organismos aquáticos (6,5 a 6,9), segundo Culley Jr. (1981). Os valores médios de pH, variando de 7,3 ± 0,17 a 7,6 ± 0,06, também estão próximos ao valor recomendado para o cultivo de girinos de 7,4 segundo Hayashi *et al*. (2004). A condutividade elétrica da água dos tanques experimentais variou de 190,2 ± 5,52 a 195,1 ± 4,94 µS cm^{-1}.

Parâmetros de desenvolvimento

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

Resultados próximos de ganho de peso (7,01 g) foram obtidos por Stéfani *et al*. (2001) em girinos alimentados com 500 mg kg^{-1} de vitamina C na ração.

Bambozzi *et al*. (2004), testando o efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento, obtiveram girinos de rã-touro com peso inferior (2 g), aos encontrados no presente trabalho. Entretanto, Hayashi *et al*. (2004) obtiveram girinos com 10 g de peso, quando cultivados em tanque rede, valores

superiores aos encontrados no presente trabalho.

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

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

Table 2. *Values of F, coefficient of variation (CV) and average to weight gain (g), ration consumption (g), feed conversion, survival (%) and length (mm) of bullfrog tadpoles.*

	Parâmetro *Parameter*				
	Ganho de peso (g) *Weight gain*	Consumo de ração (g) *Ration consumption*	Conversão alimentar *Feed conversion*	Sobrevivência(%) *Survival*	Comprimento(mm) *Length*
F para tratamentos *F to treatments*	3,36*	1,49^{NS}	0,99 ^{NS}	1,30 ^{NS}	3,04 ^{NS}
CV (%)	7,77	24,09	33,07	29,88	3,39
Média T1(0,0) Average	5,19 b	7,22	0,95	62,50[1]	85,65
T2(0,2)	5,88 ab	6,41	1,10	68,25[1]	87,27
T3 (0,5)	6,09 ab	6,65	1,07	65,75[1]	90,25
T4 (1,0)	6,23 a	8,34	1,29	52,75[1]	91,26
T5 (1,5)	6,14 ab	8,99	1,43	44,25[1]	91,67

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; NS- não significativo *(not significant)*; *p < 0.05; [1]dados originais *(original dates)*.

Averages followed by same letters in the column do not differ significantly according to Tukey test, at 5% of probability; T1= 0,0% de própolis (0.0% of própolis); T2 = 0,2% de própolis (0.2% of própolis); T3 = 0,5% de própolis (0.5% of própolis) ; T4 = 1,0% de própolis (1.0% of própolis); T5 = 1,5% de própolis (1.5% of própolis).

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

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

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

A conversão alimentar aparente dos girinos de rã-touro também não foi influenciada significativamente ($p > 0,05$) pelos diferentes tratamentos (Tabela 2), variando de 0,95 a 1,43. Lima *et al*. (2003) observaram em vários ranários comerciais valores médios de conversão alimentar de 1,5:1 em girinos de rã-touro alimentados com ração contendo 40% de proteína bruta, sendo portanto, semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

A sobrevivência dos girinos não foi afetada significativamente ($p > 0,05$) pelos tratamentos (Tabela 2), variando de 44,25 a 68,25%. Apesar de não ocorrerem diferenças significativas, observou-se uma tendência de maior índice de sobrevivência (68,25%) quando os girinos receberam ração suplementada com 0,2% de extrato de própolis. A menor porcentagem de sobrevivência (44,25%) encontrada no T5 foi devida à ocorrência de edema nos membros posteriores de alguns girinos, aumentando a mortalidade dos mesmos. Provavelmente a própolis nas doses utilizadas não apresentou efeito bactericida.

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

Os valores médios do comprimento dos girinos estão apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que apesar de não ocorrerem diferenças significativas ($p > 0,05$), observou-se uma tendência de maior comprimento total dos girinos com o aumento da dose de própolis na ração, variando de 85,65 a 91,67 mm. O comprimento dos girinos é um dado importante, principalmente na fase final da metamorfose, quando girinos maiores darão origem a imagos maiores, diminuindo a mortalidade e facilitando o manejo da fase inicial de engorda.

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

Os girinos que receberam própolis apresentaram as maiores porcentagens de animais no estágio 42, sendo 8,1; 10,3; 6,2 e 12,4% para T2, T3, T4 e T5, respectivamente. A menor porcentagem (4,8%) foi observada nos girinos que não receberam própolis (T1), indicando que o extrato hidroalcoólico de própolis pode ter favorecido a metamorfose nas condições experimentais (Tabela 3).

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

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

Tabela 3. Porcentagem de girinos de rã-touro nos diferentes estágios de desenvolvimento, de acordo com Gosner (1960), no final do período experimental (60 dias).
Table 3. *Percentage of bullfrog tadpoles in different stage of development, according Gosner (1960), in the end of experimental period (60 days).*

	Tratamentos *(Treatments)*				
Estágio de desenvolvimento *Stage of development*	T_1 (%)	T_2 (%)	T_3 (%)	T_4 (%)	T_5 (%)
< 37	0,8	0,7	-	0,9	0,6
37	0,8	1,1	-	1,4	-
38	4,0	3,3	1,1	2,4	-
39	13,6	4,8	2,7	5,2	6,2
40	31,6	20,1	19,0	23,2	19,2
41	42,8	60,1	64,3	58,8	58,8
42	4,8	8,1	10,3	6,2	12,4
43	1,6	1,8	2,7	1,9	2,8

T1 = 0,0% de própolis *(0.0% of propolis)*; T2 = 0,2% de própolis *(0.2% of propolis)*; T3= 0,5% de própolis *(0.5% of propolis)*; T4 = 1,0% de própolis *(1.0% of propolis)*;T5 = 1,5% de própolis *(1.5% of propolis)*.

Contagem diferencial de leucócitos

Os tipos celulares encontrados no sangue periférico dos girinos de rã-touro encontram-se na Figura 1. Os diferentes tipos leucocitários foram: linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos, os mesmos descritos por Duellman e Trueb (1986), Ferreira (2002), Coppo (2003) e Fenerick Jr. (2004).

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

O resultado da análise de variância dos diferentes tipos de leucócitos encontrados no sangue periférico de girinos de rã-touro encontra-se na Tabela 4.

Os valores médios das porcentagens de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos do sangue periférico de girinos de rã-touro não foram influenciados ($p > 0,05$) pelos diferentes níveis de própolis na ração. Nos diferentes tratamentos, a quantidade média de linfócitos no sangue dos girinos variou de 65,93 a 79,93% (Tabela 4), sendo o grupo predominante o mesmo observado por Fenerick Jr. (2004), que obteve valores próximos de linfócitos no sangue de rãs-touro adultas (69,62 a 72,02%).

Como na literatura não foram encontrados trabalhos com girinos, os resultados foram comparados com rãs adultas. Os resultados obtidos diferem daqueles de Wang e Chang (1994), que obtiveram para rãs-touro adultas em cativeiro 52,77% de linfócitos; dos de Coppo (2003) que obtiveram 16,3 a 39,8% de linfócitos em rã-touro adulta; e dos de Ferreira (2002), que obteve para girinos de rã-touro 94,22% de linfócitos em 48 horas e 89,84% em 312 horas no período de amostragem.

A porcentagem de neutrófilos no sangue dos girinos, nos diferentes tratamentos, variou de 3,27 a 6,07% (Tabela 4), valores próximos aos obtidos por Ferreira (2002), 2,08 a 5,47%, e por Fenerick Jr. (2004), que obteve valores de 2,82 a 3,09% de neutrófilos no sangue de rãs-touro adultas; e inferiores àqueles obtidos por Wang e Chang (1994), que encontraram valores de 29,87% de neutrófilos, e de Coppo (2003), 40 a 86,1% em rãs-touro adultas.

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

As porcentagens de basófilos e eosinófilos do sangue dos girinos variaram de 6,93 a 10,67% e de 8,06 a 11,53% respectivamente, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os diferentes tratamentos (Tabela 4). Esses resultados foram superiores àqueles encontrados por Wang e Chang (1994), 2,66% de basófilos e 4,03% de eosinófilos para rãs-touro adultas. Fenerick Jr. (2004) observou, no sangue de rã-touro adulta, valores de 14,29 a 16% de basófilos e de 1,53 a 1,85% de eosinófilos. Ferreira (2002) obteve, para girinos de rã-touro, valores de 2,82 a 3,09% de basófilos e 0,74 a 1,22% de eosinófilos em 48 e 312 horas no período de amostragem.

Somente houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na porcentagem de monócitos no sangue dos girinos de rã-touro (Tabela 4), na qual se observou que girinos que receberam a dose mais alta de extrato hidroalcoólico de própolis (T5) e aqueles que não receberam (T1) apresentaram a menor porcentagem desse grupo leucocitário no sangue.

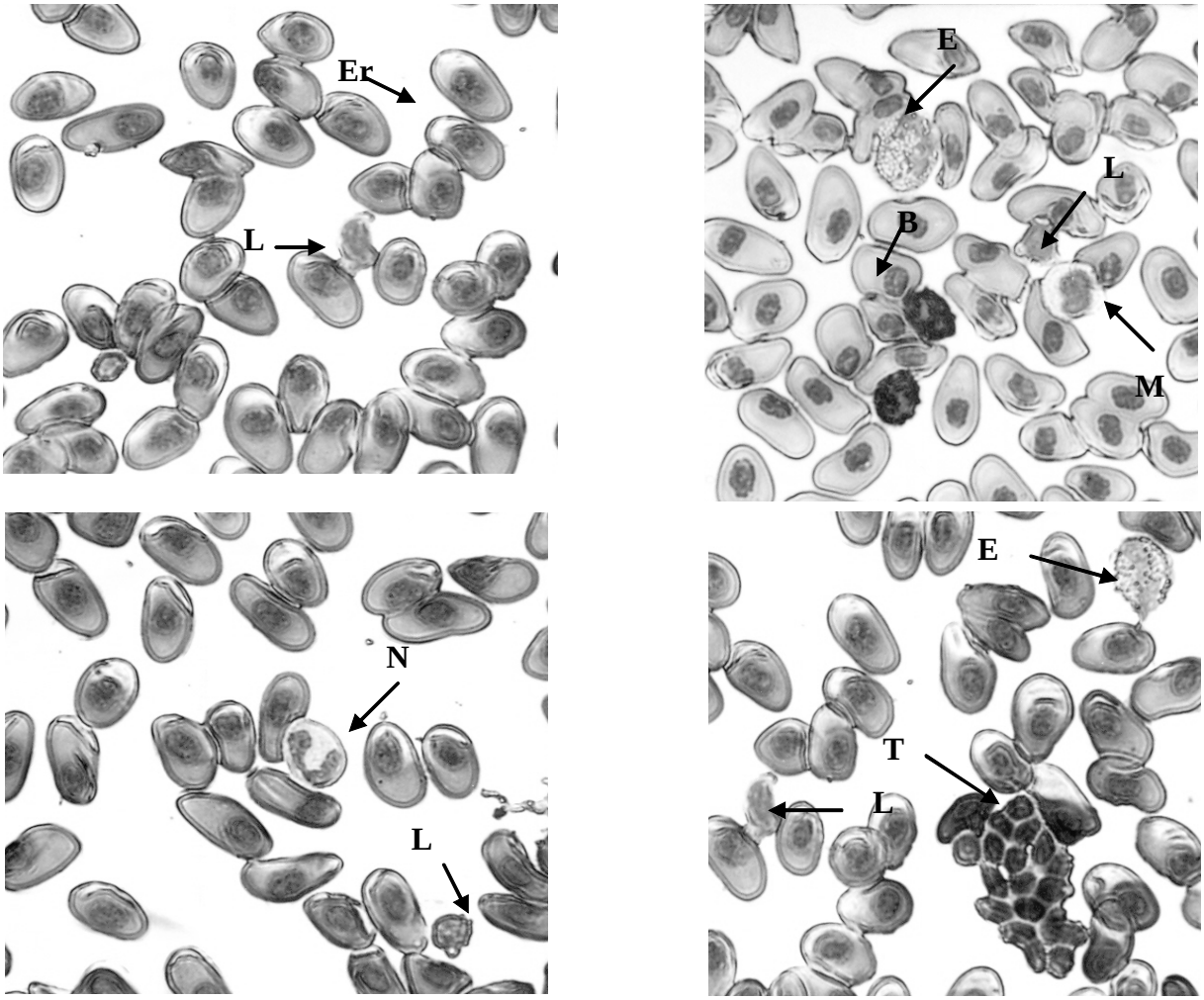

Figura 1. Fotomicrografia da extensão do sangue periférico de girinos de *R. catesbeiana*. L = Linfócito, N = Neutrófilo, B = Basófilo, Er = Eritrócito, E = Eosinófilo, M = Monócito, T = Trombócito, coloração Rosenfeld. Aumento 400x.
Figure 1. *Photomicrography of periferic blood extension in bullfrog tadpoles. L=Lymphocyte), N=Neutrophil, B= Basophil, Er=Erytrocyte, E=Eosinophil, M=Monocyte, T=Trombocyte, Rosenfeld stain. x400 magnification.*

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

Wang e Chang (1994) obtiveram 10,67% de monócitos no sangue de rã-touro adulta. Ferreira (2002) obteve valores de 0,14 e 0,38% de monócitos no sangue de girinos de rã-touro em 48 e 312 horas do período de amostragem, respectivamente. Coppo (2003) observou valores de 1 a 5% de monócitos em rã-touro adulta.

Tabela 4. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias dos diferentes tipos leucocitários encontrados no sangue periférico de girinos de rã-touro.
Table 4. *Values of F, coefficient of variation (CV) and average of different kinds leucocytary in the blood of bullfrog tadpoles.*

		Parâmetro *Parameter*				
		Linfócitos *Lymphocytes* (%)	Neutrófilos *Neutrophil* (%)	Eosinófilos *Eosinophil* (%)	Basófilos *Basophis* (%)	Monócitos *Monocytes* (%)
F para Tratamentos *F to treatments*		8,48 ^{NS}	0,62 ^{NS}	0,91 ^{NS}	2,99 ^{NS}	11,79 **
CV (%)		6,48	53,94	33,92	25,53	45,61
Médias *Averages*	T1 (0,0)	72,13	6,07	11,03	10,67	0,07 b
	T2 (0,2)	73,53	3,27	8,06	10,07	5,07 a
	T3 (0,5)	65,93	4,07	11,53	10,53	7,87 a
	T4 (1,0)	72,86	5,67	11,53	7,26	2,7 ab
	T5 (1,5)	79,93	4,47	8,13	6,93	0,53 b

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; NS- não significativo *(not significant)*; **p < 0,01.
Averages followed by same letters in the column do not differ significantly according to Tukey test, at 5% of probability; T1= 0,0% de própolis (0.0% of propolis); T2 = 0,2% de própolis (0.2% of propolis); T3 = 0,5% de própolis (0.5% of propolis) ; T4 = 1,0% de própolis (1.0% of propolis); T5 = 1,5% de própolis (1.5% of propolis).

Conclusão

Observa-se que a adição de extrato hidroalcoólico de própolis na ração melhorou o ganho de peso de girinos de rã-touro e influenciou a porcentagem de monócitos no sangue periférico, apresentando possivelmente efeito imunoestimulante nas doses mais baixas (0,2 e 0,5%).

Agradecimentos

À empresa Apis Flora Industrial e Comercial Ltda, pela doação do extrato hidroalcoólico de própolis.

Referências

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

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

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

CULLEY JUNIOR, D.D. Have we turned the corner on bullfrog culture. *Aquac. Mag.*, Asheville, v. 7, n. 3, p. 20-24, 1981.

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

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

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

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

GARCIA, C.E. *Efeitos da própolis sobre unidades formadoras de colônias de Pasteurella mutocida, desempenho produtivo e constituintes sangüíneas de coelhos*. 2001. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOUZA, J.R. *et al*. *Longibucca catesbeiana* n. sp. Nematoda: Cylindrocorporidae, a gastrointestinal parasite of the bullfrog *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 in Brazil. *Singapore*

Med J., Singapore, v. 53, n. 3, p. 97-102, 1993.

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

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

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

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

Received on March 17, 2006.
Accepted on March 27, 2007.