

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Zootecnia

Gean Paulo Andrade Reis

Efeito da cor do tanque sobre o desempenho, metamorfose, coloração da pele e parâmetros bioquímicos de girinos de rã-touro americana (*Aquarana catesbeiana*)

BELO HORIZONTE - MG

2025

Gean Paulo Andrade Reis

Efeito da cor do tanque sobre o desempenho, metamorfose, coloração da pele e parâmetros bioquímicos de girinos de rã-touro americana (*Aquarana catesbeiana*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Dr. Galileu Crovatto Veras

Coorientadora: Dra. Érika Ramos de Alvarenga

Coorientador: Dr. Daniel Abreu Vasconcelos Campelo

Reis, Gean Paulo Andrade, 1996-

R375e Efeito da cor do tanque sobre o desempenho, metamorfose, coloração da pele e parâmetros bioquímicos de girinos de rã-touro americana (Aquarana catesbeiana)/Gean Paulo Andrtade Reis-2025.

75 f. il.

Orientador: Galileu Crovatto Veras

Coorientadora: Érika Ramos de Alvarenga

Coorientador: Daniel Abreu Vasconcelos Campelo

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Bibliografia: 59-64.

1. Rã - Teses – 2. Zootecnia – Teses – 3. Criação - Teses – I. Veras, Galileu Crovatto - II. Alvarenga, Erika Ramos de. - III. Campelo, Daniel Abreu Vasconcelos. – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 639.378

Bibliotecário responsável Marcio Alves dos santos CRB 3589
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



Escola de Veterinária
UFMG

ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte- MG
TELEFONE (31)-3409-2173

www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao
E-mail cpgzootec@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE TESE DO ALUNO GEAN PAULO ANDRADE REIS

Às 09:00 horas do dia 17 de abril de 2025, reuniu-se, a Comissão Examinadora de Tese, aprovada em reunião ordinária no dia 11/04/2025, para julgar, em exame final, a defesa da tese intitulada: Efeito da cor do tanque sobre o desempenho, metamorfose, coloração da pele e parâmetros bioquímicos de girinos de rã-touro americana (Aquarana catesbeiana), como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Zootecnia, área de concentração Produção Animal - Aquacultura.

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Galileu Crovatto Veras, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof.(a)/Dr.(a) Adriana Xavier Alves	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Érika Ramos de Alvarenga	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Jéssica Almeida da Silva	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Renan Rosa Paulino	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Galileu Crovatto Veras	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado (a)

Reprovado (a)

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar 03 volumes encadernados da versão final da tese acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da tese apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 17 de abril de 2025.

Assinatura dos membros da banca:

Documento assinado digitalmente
gov.br GALILEU CROVATTO VERAS
Data: 27/04/2025 23:11:16-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br JESSICA ALMEIDA DA SILVA
Data: 30/04/2025 09:34:57-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br ERIKA RAMOS DE ALVARENGA
Data: 07/05/2025 10:45:33-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA XAVIER ALVES
Data: 28/04/2025 22:10:04-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br RENAN ROSA PAULINO
Data: 06/05/2025 07:04:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Doutorado/Atadefesa.doc

A todos os pesquisadores no Brasil, que, mesmo diante das adversidades, continuam a buscar soluções inovadoras para mudar o mundo. Que sua paixão continue a iluminar o caminho do conhecimento para um futuro transformador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço formalmente à CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa a partir do segundo ano do doutorado. No entanto, não posso deixar de expressar uma gratidão especial ao meu pai, Belchior G. dos Reis, que durante o meu primeiro ano de mestrado e primeiro ano de doutorado me proporcionou todo o apoio financeiro, garantindo minha permanência em Belo Horizonte e permitindo o início e a continuidade da minha pós-graduação.

Ainda em agradecimento ao meu pai, juntamente, agradeço a minha mãe Nilza A. Silva Reis e meus irmãos Nathan e Jonnathan A. Reis, obrigado por serem minha primeira fonte de apoio, carinho e por todo o apoio incondicional na minha formação pessoal e acadêmica. Amo vocês.

Ao Galileu C. Veras, ao qual tenho grande admiração, minha eterna gratidão por ter me aceitado no Setor de Ranicultura, que tenho imenso orgulho de ter feito parte. Sou grato pela experiência e conhecimentos que adquiri ao longo desses anos, além dos grandes amigos que fiz na equipe. Agradeço pela paciência, pelo respeito e pela confiança ao longo desses seis anos de trabalho.

Aos meus queridos colegas do Setor de Ranicultura, que se tornaram verdadeiros amigos, minha imensa admiração, respeito e gratidão. A Jessica Almeida, agradeço a amizade, apoio e carinho, pelos momentos de acolhimento durante os períodos difíceis, obrigado por ser o ponto mais divino nessa linda teia de amigos que formamos. À Nayara N. dos Santos, meu muito obrigado pela amizade, pela confiança e por ter sido meu braço direito no setor durante esses anos. Agradeço profundamente aos alunos de iniciação científica que passaram pelo setor e contribuíram significativamente no meu desenvolvimento, como Thaissa P. M, da Silva, Victor R. Pawlowski e Sr. Luiz A. Gonçalvez.

Não poderia encerrar este ciclo sem mencionar Adriana X. Alves, minha grande amiga, que marca um evento canônico na minha vida como pesquisador, é você minha mais profunda gratidão e admiração por todo ensinamento que ultrapassa as portas de um laboratório, muito além de técnicas de laboratório, com você aprendi como o acolhimento pode fazer toda diferença no desenvolvimento de alguém em uma instituição. Na pós você foi uma verdadeira madrinha e na vida uma grande amiga.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Aquicultura (LAQUA), agradeço por me mostrarem que é possível construir uma rede de apoio verdadeira, onde a colaboração sempre se sobrepõe aos muros e egos acadêmicos. Cada um de vocês foi essencial para a minha jornada. Menciono, com carinho, Rafael Furtado, Helder, Naiara Pinho, Mariana, Juliana, Dara, Williane, Carol, Carina, Natalia, Narcia, Tamara, Ragli, Laryssa Evelyn, Larissa, Maria Clara,

Daniele Salgueiro, Veronica, Luiza, Matheus Philip, Livia, Paulo Mol, Professor Eduardo Turra, Sr. Roberto, Sr. Antônio, Sr. Osmar, Lucas, Suelen (e minhas amigas Agatha e Gabi) e Franklin. Muito obrigado!

Erika R. Alvarenga, agradeço de coração por cada ensinamento que você me passou. Você, sem dúvida, foi minha melhor professora. Ser professor é a habilidade de transmitir conhecimento de forma que todos, desde os mais sábios até os menos experientes, consigam entender. E ensinar é algo que você faz com maestria. Muito obrigado por tudo! Tenho grande respeito e admiração por você, e sua trajetória como pesquisadora sempre será uma fonte de inspiração para mim.

Yhago P. A. Assis na família que eu construí em Belo Horizonte, você é meu gêmeo, obrigado pela amizade incrível nesses 6 anos de convivência e 3 de colegas de apartamento na “Casita”. Obrigado pelo carinho, apoio e muita conversa fiada. Tenho muito orgulho de você e, mesmo que nossos caminhos sigam por diferentes direções, lembre-se sempre de que estarei aqui para o que precisar. “Não se esqueça que ouviu de mim: amigo, estou aqui!”

Vinicius M. Bezerra, com você aprendi como a gentileza e educação pode moldar o mundo ao nosso redor. E foi essa importante e incrível característica sua que moldou o meu mundo até aqui. Obrigado por fazer parte dessa jornada. Obrigado pelo apoio, até quando eu não queria, pelo carinho, quando eu também não merecia, pela paciência que eu mesmo nunca tive. Juntos, aprendemos muito e continuaremos a aprender. Que nossa sede de conhecimento nunca cesse, e, se um dia ela diminuir, que lembremos que "o conhecimento é a única coisa que ninguém pode tirar" e "o aprendizado é contínuo".

Por fim, assim como em Belo Horizonte, criei laços de amizade que me acompanham e sempre foram uma importante rede de apoio nesta trajetória. A todos esses amigos, expresso meus mais sinceros agradecimentos por todo o carinho. Um agradecimento especial a minha grande amiga Letícia R. Rodrigues, que sempre foi fonte de apoio e carinho incondicional em todos os meus processos de vida até aqui. E aos meus amigos Patrycya Yhanny, Lara Dias, Tainara Luana, Aura Stefhany Montilla, Elizeth Montilla e Patrícia Pedras. E um carinho especial a minhas “meninas” Gamora e Nebulosa que são amor em cada fio de pelo. Amo muito vocês!

Obrigado por tudo! Eu sou uma construção de cada um de vocês!

“If you could see your whole life from start to finish, would you change things?... Despite knowing the journey and where it leads, I embrace it and welcome every moment”

(Dr. Louise Banks from the movie “Arrival”, 2016)

RESUMO

Com a finalidade de oferecer ambientes mais éticos na produção animal, que promovam o bem-estar alinhado ao potencial produtivo, é necessário investigar o impacto das características dos ambientes de criação sobre o desempenho dos animais. Na ranicultura, os materiais e estruturas utilizados na criação de girinos apresentam variedade de cores, muitas vezes influenciando o custo e o investimento inicial, sendo o azul, branco e preto os mais comuns. Por possuir capacidade de distinguir cores, a rã-touro americana (*Aquarana catesbeiana*) pode apresentar preferências por determinados ambientes, afetando o conforto e desenvolvimento do animal. Com isso é importante investigar o impacto da cor do ambiente no desenvolvimento da rã-touro, auxiliando na tomada de decisão sobre a estruturação dos ambientes de produção. Assim o presente estudo objetivou investigar o impacto da cor do ambiente no desempenho zootécnico, uniformidade de lote, tempo de metamorfose e parâmetros bioquímicos corporal de girinos de rã-touro. Seiscentos girinos ($0,94 \pm 0,11$ g – estágio de Gosner 25) foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em 15 tanques de 40 L (1 girino L^{-1}), em sistema de recirculação de água, com cinco repetições por cor: azul, branco e preto. As biometrias foram realizadas a cada 14 dias. Os animais também foram avaliados no clímax metamórfico e ao final da metamorfose quanto ao desempenho do crescimento, a uniformidade e pigmentação da pele. Ao concluir a metamorfose, 24 imagos, coletados aleatoriamente por tratamento foram eutanasiados, doze destes foram utilizados para as análises bioquímicas de corpo inteiro e doze para obtenção dos índices biológicos. Os girinos criados em tanques azuis e pretos atingiram o clímax metamórfico mais rápido (tempos medianos de 81 e 80 dias respectivamente) e completaram a metamorfose em menor tempo (97 e 96 dias respectivamente), em comparação aos criados em tanques brancos (85 dias para o clímax metamórfico e 104 dias para completar a metamorfose). O tempo para concluir o clímax metamórfico foi ligeiramente superior nos tanques pretos (13 dias) em comparação aos criados em tanques azuis e tanques brancos (12 dias). Em relação ao desempenho de crescimento, de acordo com a análise de regressão, houve interação significativa entre o tempo de acompanhamento e os tratamentos, de modo que ao longo do tempo acentuou-se a diferença entre o peso final dos girinos criados em tanques azuis (maior peso médio) em relação aos cultivados em tanques brancos e em tanques pretos. Para ganho de peso, comprimento, ganho de comprimento e taxa de eficiência proteica também houve interação significativa entre os dias de acompanhamento e o tratamento, acentuando a diferença entre os animais cultivados nos tanques azuis (melhor desempenho) em relação aos cultivados em tanques brancos. Para taxa de crescimento específico houve redução de cerca de 1% do crescimento dos animais cultivados nos tanques brancos em comparação aos cultivados

nos tanques azuis. A conversão alimentar aumentou ao longo do tempo com interação significativa entre o tempo de acompanhamento e o cultivo em tanques brancos, resultando em uma piora da conversão alimentar nos animais desse tratamento. A cor do tanque também influenciou a uniformidade do lote. Girinos criados em tanques azuis e pretos apresentaram menor variância de peso comparados aos mantidos em tanques brancos aos 14 dias (azuis: 0,29, pretos: 0,27 e brancos: 0,42) , 42 dias (azuis: 7,58, pretos: 6,56 e brancos: 9,47), 56 dias (azuis: 10,35, pretos: 8,40 e brancos: 14,69) e 70 dias de criação (azuis: 9,26, pretos: 8,45 e brancos: 12,93). Aos 98 dias, a variância de peso dos girinos em tanques pretos (8,53) não diferiu da observada nos tanques brancos (8,62), porém ambos diferiram estatisticamente dos girinos criados em tanques azuis (4,95). A coloração da pele dos girinos em clímax metamórfico e imagos recém metamorfoseados também foi afetada pela cor do tanque de criação. A análise colorimétrica das coordenadas $L^*a^*b^*$ da pele dos animais, demonstrou tons mais claros nos girinos criados em tanques brancos diferindo dos animais mantidos nos tanques azuis e pretos. O comprimento corporal, peso corporal e uniformidade do peso de girinos em clímax metamórfico e imagos recém metamorfoseados, e a bioquímica de corpo inteiro de imagos recém metamorfoseados não foram afetados pela cor do tanque. Portanto, considerando a homogeneidade no crescimento e o tempo para metamorfose, os tanques azuis representam a melhor escolha para a criação de girinos de rã-touro americana.

Palavras-chave: anfíbios; *Aquarana catesbeiana*; bem-estar animal; *Lithobates catesbeianus*; *Rana catesbeiana*; ranicultura.

ABSTRACT

Research that investigates the impact of structural environmental enrichment on performance and welfare in captive animals is necessary to provide more ethical environments for animal production that promote welfare aligned with productive potential. In frog farming, the materials and structures used for tadpole rearing vary in color, often influencing costs and initial investment, with blue, white, and black being the most common. Due to its ability to distinguish colors, the American bullfrog (*Aquarana catesbeiana*) may show preferences for specific environments, which can affect comfort and development. Therefore, it is important to investigate the impact of environmental color on bullfrog development to assist in decision-making regarding production structure design. This study aimed to investigate the impact of environmental color on the growth performance, batch uniformity, metamorphosis time, and biochemical body parameters of bullfrog tadpoles. Six hundred tadpoles (0.94 ± 0.11 g – Gosner stage 25) were randomly distributed into 15 tanks (40 L; 1 tadpole L⁻¹) in a water recirculation system, with five replicates per color: blue, white, and black. Biometric evaluations were performed every 14 days. The animals were also assessed at the metamorphic climax and at the end of metamorphosis for growth performance, uniformity, and skin pigmentation. After completing metamorphosis, 24 individuals per treatment were randomly collected and euthanized, twelve were used for whole-body biochemical analyses and twelve for biological index determination. Tadpoles reared in blue and black tanks reached the metamorphic climax faster (median times of 81 and 80 days, respectively) and completed metamorphosis in a shorter period (97 and 96 days, respectively) compared to those reared in white tanks (85 days for climax and 104 days for completion). The time to complete the metamorphic climax was slightly longer in black tanks (13 days) than in blue and white tanks (12 days). According to regression analysis, there was a significant interaction between time and treatments for growth performance, with a greater increase over time in the final weight of tadpoles reared in blue tanks compared to those in white and black tanks. Significant interactions between days and treatment were also observed for weight gain, length, length gain, and protein efficiency ratio, showing improved performance for tadpoles in blue tanks compared to those in white tanks. The specific growth rate was about 1% lower in white tanks compared to blue ones. Feed conversion ratio increased over time with a significant interaction between time and rearing in white tanks, resulting in poorer feed conversion in that treatment. Tank color also influenced batch uniformity. Tadpoles reared in blue and black tanks showed lower weight variance than those in white tanks at 14 days (blue: 0.29, black: 0.27, white: 0.42), 42 days (blue: 7.58, black: 6.56, white: 9.47), 56 days (blue: 10.35, black: 8.40, white: 14.69), and 70 days (blue: 9.26,

black: 8.45, white: 12.93). At 98 days, weight variance of tadpoles in black tanks (8.53) did not differ from those in white tanks (8.62), but both differed significantly from those in blue tanks (4.95). Skin pigmentation at the metamorphic climax and post-metamorphosis was also affected by tank color. Colorimetric analysis of skin L*a*b* coordinates showed lighter tones in tadpoles reared in white tanks compared to those in blue and black tanks. The mean of growth performance (body length, body weight, and weight uniformity of metamorphic climax tadpoles and newly metamorphosed froglets), and the mean of whole-body biochemistry parameters of newly metamorphosed froglets, were not affected by tank color. Therefore, considering homogeneity of growth performance and time to complete the metamorphosis, blue tanks represent the best choice for rearing American bullfrog tadpoles.

Keywords: amphibians; animal welfare; *Aquarana catesbeiana*; frog farming; *Lithobates catesbeiana*; *Rana catesbeiana*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 1: Ciclo de vida da rã-touro americana.....	20
Figura 2: Comparação entre as classificações da metamorfose de rã descritas por Etkin (1996) e Gosner (1960).....	22
Figura 3. Efeitos da disponibilidade de alimentos e redução nos níveis de água no tempo metamórfico de <i>Rana Sylvatica</i>	30
Figura 4. Gráfico de Kaplan-Meier dos dados para a estimativa de probabilidade de girinos atingirem a metamorfose ao longo do tempo, apresentados na Tabela 1.....	33

CAPÍTULO 3

Figure 1. Experimental facilities.....	47
Figure 2. Stages of metamorphosis.....	49
Figure 3. Analysis of skin color.....	51
Figure 4. Probability of transformation in American bullfrog tadpoles raised in different colors tanks occurrence over time estimated by Kaplan-Maier and compared by the Logrank test.	55
Figure 5. Proportion of American bullfrog tadpoles and froglets phases according to Etkin's classification (Etkin, 1966) throughout the experiment.....	56
Figure 6. Final weight (g) of American bullfrog tadpoles raised for 108 days in blue, white and black tanks.....	57
Figure 7. Weight gain (g), length (cm) and length gain (cm), specific growth rate (%. day ⁻¹), feed conversion ratio and protein efficiency ratio, of American bullfrog tadpoles raised in blue, white and black tanks.....	58

Figure 8. Weight distribution of American bullfrog tadpoles (including metamorphic climax tadpoles) raised in blue, white and black tanks throughout the experimental period.....60

Figure 9. Weight distribution of American bullfrog tadpoles in metamorphic climaxes and froglets raised in black, blue, and white tanks.....61

Figure 10. Skin color difference in American bullfrog tadpoles and froglets coloration reared in black, blue, and white tanks.....63

Figure 11. L*a*b* coordinates of skin coloration of American bullfrog tadpoles in metamorphic climax (A, B and C) and froglets (D, E and F).....64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Estimativa de Kaplan-Meier para dados de metamorfose.....32

CAPÍTULO 3

Table 1. Growth performance of Bullfrogs tadpoles raised in three different color environments during metamorphic climax and froglets phase.....61

Table 2. Biological indexes of Bullfrogs froglets raised in blue, white, and black tanks.....62

Table 3. Biochemical parameters of whole-body macerate of Bullfrog froglets reared in tanks of different colors.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/G: Albumina/ Globulina
ALT - Alanine aminotransferase
AST - Aspartate aminotransferase
CA: Conversão alimentar
CRD: Consumo de ração diária
FCR - Feed conversion ratio
FW - Final weight
GC: Ganho de comprimento
GP: Ganho de peso
HSI - Hepatosomatic index
IHS: Índice hepatossomático
ILS: Índice lipossomático
IVS: Índice viscerossomático
LSI - Liposomatic index
MSH - Melanophore-stimulating hormone
PER - Protein efficiency rate
RAS - Recirculating Aquaculture System
rpm - Rotação por minuto
SGR - Specific growth rate
SR - Survival rate
TC: Taxa de canibalismo
TCE: Taxa de crescimento específico
TEP: Taxa de eficiência proteica
TS: Taxa de sobrevivência
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
VSI - Viscerosomatic index
W - Weight
WG - Weight gain

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO DA TESE.....	17
1.1 Introdução	17
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo geral.....	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA - INFLUÊNCIA DO AMBIENTE NA METAMORFOSE DA RÃ-TOURO (AQUARANA CATESBEIANA).....	20
2.1 O desenvolvimento da rã-touro americana (<i>Aquarana catesbeiana</i>) e as etapas da metamorfose	20
2.2 A metamorfose dos sentidos	23
2.3 A preferência dos anfíbios sobre a cor do ambiente	25
2.4 Ferramentas estatísticas de análise de sobrevivência para a avaliação do tempo de metamorfose de girinos de rã-touro	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 3: REARING AMERICAN BULLFROG TADPOLES IN DIFFERENT TANK COLORS: EFFECT ON METAMORPHOSIS, PERFORMANCE, AND BIOCHEMISTRY RESPONSES.....	42
Abstract	44
3.1. Introduction.....	45
3.2. Material and methods	46
3.2.1 <i>Ethics statement and location</i>	46
3.2.2 <i>Experimental facilities, conditions, and experimental design</i>	46
3.2.3 <i>Feeding management</i>	48
3.2.4 <i>Biometrics and assessment of metamorphosis stages</i>	48
3.2.5 <i>Analysis of skin color</i>	50
3.2.6 <i>Growth performance</i>	51
3.2.7 <i>Biochemical analyses</i>	52
3.2.8 <i>Biological indexes</i>	53
3.2.9 <i>Statistical analysis</i>	53
3.3. Results	55
3.3.1 <i>Effect of tank color on metamorphosis</i>	55
3.3.2 <i>Growth performance of pre- and pro-metamorphic tadpoles</i>	56
3.3.3 <i>Growth performance of tadpoles in metamorphic climaxes and froglets and biological indexes of froglets</i>	59
3.3.4 <i>Effect of tank color on skin coloration of tadpoles in metamorphic climax and froglets</i>	62
3.3.5 <i>Biochemistry of whole-body macerate</i>	64
3.4. Discussion	65

3.5. Conclusions	68
Acknowledgements	68
References	69
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO DA TESE

1.1 Introdução

Os girinos, fase aquática dos anuros, passam por inúmeras alterações anatómicas e fisiológicas até atingirem a forma adulta como rã, e devido a todas estas mudanças este processo também é um momento desafiador para estes animais. Como descreve Gilbert e Frieden (1981), a metamorfose dos anfíbios anuros é um notável fenômeno da natureza, que se destaca pela transição de um organismo estritamente aquático para um ser adaptado ao ambiente terrestre.

A metamorfose é influenciada por fatores fisiológicos e ambientais que podem atrasar ou acelerar o tempo da transformação, como por exemplo, alterações hormonais (Etkin, 1966), temperatura ambiental (Wollmuth e Crawshaw, 1988; Loman, 2002; Álvarez e Nicieza, 2002; Bellakhal et al., 2014), disponibilidade de água (Denver, 1997); nutrição (Álvarez e Nicieza, 2002; Bellakhal et al., 2014) e densidade (Loman, 2002). Essas possíveis intercorrências enfrentadas durante a metamorfose podem resultar em imagos menores e leves, que poderão ter dificuldade em se desenvolver durante esta fase. Imagos menores reduzem a atividade por estarem em constante risco de serem predados por animais maiores, o que pode agravar a heterogeneidade do lote (Alves et al., 2020).

A visão é importante na interação dos anfíbios com o ambiente. Durante as fases iniciais, os girinos exibem a visão e a linha lateral como os órgãos sensoriais primários na interação entre o organismo e o ambiente, desempenhando um papel crucial na identificação de diversos aspectos ambientais como iluminação, cor, temperatura e textura (Mohun e Davies, 2019). Similarmente a outros vertebrados, as rãs possuem células fotorreceptoras, sugerindo que as rãs-touro possam diferenciar cores com base na intensidade luminosa (Yovanovich et al., 2017).

Em peixes, diversos estudos com diferentes espécies de produção têm investigado as preferências ambientais e como elas influenciam no desenvolvimento e desempenho zootécnico destes animais (Volpato et al., 2004; McLean et al., 2008; Jegede, 2011; Elnwishy et al., 2012; Opiyo et al., 2014; Pedreira e Sipaúba-Tavares, 2001; Boaventura et al., 2021; Costa et al., 2017; Ferosekhan et al., 2020). Em relação aos anfíbios, há um menor volume de dados disponíveis, uma vez que a maioria dos estudos existentes nesta área se concentra predominantemente na esfera da conservação de espécies (Hilken et al., 1994; Moriya et al., 1996; Went e Philips, 2005; Holmes et al., 2016; Eterovick et al., 2018; Graves et al., 2023; Mirč et al., 2023), carecendo de informações e estudos que

avaliem o impacto do ambiente de criação no desempenho zootécnico de espécies de anuros cultivados para produção animal.

A ranicultura cresceu mundialmente cerca de 48% nos últimos 15 anos, atingindo 147,8 mil toneladas no ano de 2020, com destaque para a rã-touro-americana (*Aquarana catesbeiana*), que corresponde a 88% desta produção global (FAO, 2022). Apesar do déficit em dados de produção e comércio, causado principalmente pela falta de licenciamento ambiental, o Brasil ainda figura entre os principais produtores de rã-touro do mundo, junto a Taiwan, Malásia, Cingapura, Equador e México (FAO, 2021). Em recente trabalho, Ribeiro e Toledo (2022), estimaram que o Brasil produziu cerca de 191,4 toneladas de carne de rã no ano de 2019.

O Brasil possui um grande potencial para o desenvolvimento da ranicultura, com clima subtropical e disponibilidade de recursos hídricos, apresentando um cenário perfeito para o desenvolvimento da rã-touro americana. Desta forma, o desenvolvimento de estudos que busquem aprimorar os ambientes de criação contribuirá para a melhora e padronização da produção de rãs em cativeiro, ajudando assim a promover o crescimento da produção nacional.

Diante disso, a realização de pesquisas destinadas a investigar o impacto das características físicas de instalações de criação de rãs-touro, sobre o desempenho, tempo de metamorfose e bem-estar dos animais, colabora para o desenvolvimento de ambientes de criação mais eficientes e para a otimização da produção de rãs.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Com o estudo objetivou-se investigar se há influência da cor do ambiente de criação sobre o desempenho, tempo de metamorfose, coloração e bem-estar de girinos de rã-touro americana.

1.2.2 Objetivos específicos

Avaliar se a cor do tanque de criação exerce efeito sobre:

- O ganho de peso, peso final, ganho de comprimento, comprimento final, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência proteica e taxa de sobrevivência de girinos e imagos de rãs-touro;

- Uniformidade do lote de girinos durante o período de criação e uniformidade do lote de imagos recém metamorfoseados.
- Tempo de metamorfose de girinos de rã-touro;
- O bem-estar dos animais após o processo de metamorfose, através das análises bioquímicas de glicose, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina/globulinas, colesterol total, triglicerídeos, lactato, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e ureia;
- Coloração da pele dos girinos de rã-touro em clímax metamórfico e dos imagos recém metamorfoseados;

CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA - INFLUÊNCIA DO AMBIENTE NA METAMORFOSE DA RÃ-TOURO (*AQUARANA CATESBEIANA*)

2.1 O desenvolvimento da rã-touro americana (*Aquarana catesbeiana*) e as etapas da metamorfose

Nativa da região leste da América do Norte, a rã-touro americana *Aquarana catesbeiana* (Dubois, 2021), como grande parte dos anfíbios anuros, passa por metamorfose, apresentando uma fase de vida totalmente aquática, chamada de girino, e outra semiaquática, denominada de imago e rã.

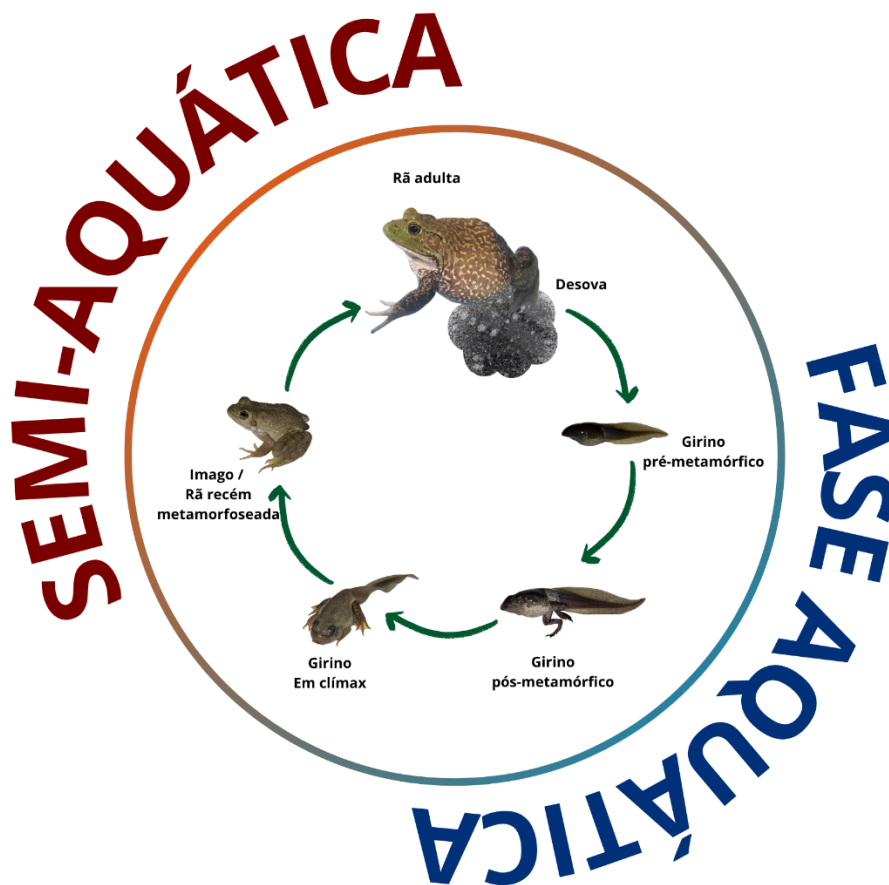


Figura 1: Ciclo de vida da rã-touro americana (*Aquarana catesbeiana*)

A fase de vida aquática da rã-touro se inicia na reprodução que, em ambiente natural, é realizada em poças d'água, pequenos lagos ou áreas alagadas (Bury e Whelan, 1984). Durante o acasalamento, ato conhecido como amplexo, o macho abraça a fêmea firmemente, pressionando o abdômen dela para a liberação dos ovócitos. Enquanto estes

são liberados na água, o macho libera o sêmen, onde ocorre a fertilização (Seixas-Filho et al., 2018).

Após a eclosão, as larvas de rã-touro passam por inúmeras alterações morfofisiológicas até atingirem a fase pós-metamórfica (Gilbert e Frieden, 1981). Para a melhor identificação dessas alterações foram desenvolvidos métodos de classificação das fases de desenvolvimento, sendo a classificação de Gosner (1960) e a Etkin (1966) os métodos mais utilizados, conforme ilustrado na figura 2. A classificação de Gosner (1960) permite a identificação visual precisa dos estágios de desenvolvimento com base em estruturas externas, como membros, boca e cauda. Por sua vez, a classificação proposta por Etkin (1966) demonstra a influência dos hormônios tireoidianos sobre o processo de metamorfose. Ambas as classificações são principalmente utilizadas em pesquisas científicas, para determinação da fase de desenvolvimento do girino utilizado no estudo.

Na classificação de Gosner (1960), o processo é dividido em 46 estágios de desenvolvimento. Estas alterações são divididas em cinco fases: embriogênese, composta pelo estágio 1 até o estágio 19; a fase larval, que se inicia com a eclosão do ovo e perdura até o estágio 24; fase de crescimento do girino, que compreende do estágio 25, após absorção do saco vitelínico, até o 35, com o desenvolvimento inicial dos membros posteriores; fase de maturação, que compreende do estágio 36 ao 41, correspondendo a fase de maturação dos membros posteriores; e o clímax da metamorfose, correspondendo do estágio 42, quando surgem os braços, ao 46, em que finaliza com a absorção completa da cauda do girino (Gosner, 1960).

Na classificação de Etkin (1966), o processo é classificado em quatro categorias baseadas na atividade hormonal da tireoide, caracterizando em pré-metamorfose, pró-metamorfose, clímax metamórfico e rã (imagos e adultos).

O fator principal que define a divisão das fases na classificação de Etkin (1966) é a atividade da tireoide e secreção dos hormônios tiroidianos T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina). Durante a pré-metamorfose os níveis dos hormônios são muito baixos, promovendo poucas alterações morfológicas, enquanto a atividade da prolactina está alta, assim durante este período os girinos desenvolvem consideravelmente em seu tamanho, mas com poucas alterações em sua estrutura. Essa ação da prolactina foi observada em outro estudo desenvolvido por Etkin e Gona (1967), em que os autores observaram que os girinos tratados com injeção peritoneal de prolactina apresentaram um maior crescimento, porém tiveram sua metamorfose inibida. Esta função da prolactina é muito importante para impedir que ocorra metamorfose precoce.

Pré-metamorfose

A pré-metamorfose apresentada no estudo de Etkin, corresponde a um momento de considerável desenvolvimento do girino em comprimento, porém com poucas alterações morfológicas. Neste momento a atividade dos hormônios tiroídianos ainda é baixa enquanto que a prolactina está elevada, promovendo o crescimento sem que ocorra a metamorfose precoce dos animais.



Estágio de Gosner 25

Estágio de Gosner 30

Estágio de Gosner 32

Estágio de Gosner 34

Paralelo a classificação de Etkin, na escala de Gosner, este período da pré-metamorfose corresponderia do momento de eclosão até aproximadamente o estágio 35. Durante esta fase os animais crescem em tamanho, e desenvolvem o apêndice que se tornará os membros posteriores, finalizando com o início do desenvolvimento dos dedos.

Pró-metamorfose

Os níveis de prolactina começam a cair em contrapartida inicia-se a atividade dos hormônios tiroídianos, promovendo assim as alterações e o início da metamorfose. Nesta fase ocorre o completo desenvolvimento dos membros.



Estágio de Gosner 36

Estágio de Gosner 38

Estágio de Gosner 40

Estágio de Gosner 41

A pró-metamorfose inicia-se com a diferenciação dos dedos dos membros posteriores (Estágio 36) e segue até o desenvolvimento completo dos mesmos, e formação dos membros anteriores dentro da pele (Estágio 41). A fase de pró-metamorfose se encerra com a exposição dos membros anteriores (Estágio 42), dando início ao clímax da metamorfose.

Clímax da metamorfose

Durante o clímax ocorre então o pico na atividade dos hormônios tiroídianos, promovendo as últimas alterações morfológicas. Que em seguida cai abruptamente até retornar aos níveis iniciais, encerrando a metamorfose.

Metamorfose completa

A atividade hormonal volta aos níveis basais, concluindo a metamorfose da rã touro.



Estágio de Gosner 42 e 43



Estágio de Gosner 46

No clímax da metamorfose, o girino já apresenta os quatro membros totalmente desenvolvidos. Ocorre as alterações em tamanho, formato e disposição dos olhos, boca, crânio, a postura do corpo, além de mudanças nos órgãos internos que vão fazer com que a dependência do ambiente aquático diminua enquanto desenvolve adaptações para viver em ambientes semi-aquáticos. Essa fase se inicia com o estágio 42 e vai até a completa absorção da cauda marcado a conclusão da metamorfose no estágio 46.

Figura 2: Comparação entre as classificações da metamorfose de rã descritas por Etkin (1996) e Gosner (1960).

Quando os níveis dos hormônios tireoidianos começam a se elevar, inicia-se a pró-metamorfose. Paralelamente ao aumento dos níveis dos hormônios tireoidianos, ocorre o alongamento dos membros e definição de estruturas como dedos e divisões dos membros, que segue até o desenvolvimento e exposição dos membros anteriores. Os membros dianteiros, diferentemente dos posteriores, crescem dentro do corpo do animal e são expostos por um processo absorção e remodelação cutânea, no tronco, próximo a região da cabeça (Etkin, 1996).

Após a formação completa dos membros posteriores e anteriores, inicia-se a última fase da metamorfose, o clímax metamórfico, neste momento os níveis dos hormônios tireoidianos estão consideravelmente elevados atingindo seu maior pico de atividade e cai abruptamente na metade do período, apresentando níveis semelhantes aos encontrados nos adultos (Etkin, 1966).

Devido a todas as mudanças morfológicas e fisiológicas, o novo organismo precisa se adaptar ao novo estilo de vida terrestre. A dependência pelo ambiente aquático reduz e o animal inicia uma maior atividade pulmonar, precisando buscar ambientes com menor lâmina d'água, que permitam ao animal manter a cabeça fora da água para a respiração aérea (Cribb et al., 2013).

Durante o clímax metamórfico os girinos não se alimentam, utilizando os nutrientes para completar a metamorfose e sobrevivência a partir das reservas de gordura e absorção da cauda (Hourdry et al., 1996). Este é o momento mais crítico do desenvolvimento de um anuro. Durante essa fase do processo, o animal passa por alterações em todo o trato gastrointestinal, passando a ter hábito alimentar carnívoro. Nessa fase da transformação, ocorre desde o encurtamento do intestino até a abertura da boca, processos que exigem um grande gasto energético (Albinati e Lima, 1994). A completa absorção da cauda indica o fim das transformações morfofisiológicas e a completa metamorfose do girino em rã (Gosner, 1960).

2.2 A metamorfose dos sentidos

Durante a metamorfose, ocorre também o desenvolvimento dos sentidos e seus respectivos órgãos, o crescimento de membros e absorção de estruturas, migração e aperfeiçoamento de órgãos e alterações no formato corporal. Uma mudança morfológica marcante na metamorfose dos girinos é a alteração dos mecanismos de locomoção, com o desenvolvimento dos membros posteriores e anteriores e absorção da cauda. Estas transformações alteram a mobilidade e confere habilidade natatória e locomotora,

permitindo o animal a capacidade de migrar do ambiente aquático para o ambiente terrestre (Gilbert e Frieden, 1981).

Simultaneamente ao desenvolvimento dos membros, outras estruturas começam a se desenvolver. As estruturas da boca dos girinos começam a se diferenciar ainda na pró-metamorfose, embora a sua alteração só se conclua durante o clímax da metamorfose (Gilbert e Frieden, 1981).

A estrutura bucal dos girinos se difere de acordo ao ambiente em que as espécies vivem. Os girinos que vivem em águas de ambiente lântico possuem boca em forma de bico córneo com abertura, lábios e dentes labiais inferiores e superiores, que permitem a alimentação na superfície da água, enquanto espécies de ambientes lóticos, em grande maioria, não possuem bico, lábios ou dentes e sim um disco oral que os girinos usam para se fixar em rochas ou substratos. A espécie rã-touro americana consegue se adaptar a diferentes ambientes, mas tem preferência pela reprodução em ambientes lânticos (Ryan, 1980). Assim a anatomia bucal dos girinos de rã-touro apresenta papilas labiais e dentes queratinizados, que são utilizados na sua alimentação (Gilbert e Frieden, 1981).

A percepção dos sons também sofre mudanças com a metamorfose. Enquanto girinos, a rã-touro se orienta principalmente pela linha lateral, que capta vibrações e mudanças do ambiente através das células sensoriais chamadas de neuromastos (Braun, 2017). A medida em que se desenvolve a metamorfose, a linha lateral se degenera e um complexo órgão auditivo começa a se desenvolver. Após o clímax metamórfico, a atividade da linha lateral é praticamente nula, e ocorre o completo desenvolvimento da membrana timpânica e órgãos internos da audição da rã-touro (Horowitz et al., 2007). Um órgão auditivo bem desenvolvido é fundamental para esta espécie que transita por dois ambientes, sendo necessário um aparelho complexo que permita a percepção de sons dentro da água e do ambiente fora d'água. Além disso, as rãs-touro possuem o comportamento de vocalização, principalmente durante o período reprodutivo, assim a audição é um sentido muito importante também para a reprodução destes animais (Gilbert e Frieden, 1981).

Assim como a boca, os olhos sofrem alteração quanto seu formato, posição, tamanho e função. Os girinos de rã-touro possuem olhos pequenos, redondos e posicionados na lateral da cabeça, permitindo uma ampla visão do ambiente. Com a evolução da metamorfose, os olhos aumentam consideravelmente em relação ao tamanho da cabeça e são reposicionados para parte mais frontal (Hoskins, 1990). Além do tamanho e posicionamento, os olhos dos anfíbios anuros sofrem importantes transformações

quanto função e complexidade. De acordo com Hoskins (1990), as alterações no formato e tamanho dos olhos, ocorrem para que a visão consiga se adaptar a migração de ambientes, conferindo poder ótico para que o animal adulto tenha boa visão tanto no ambiente aquático quanto fora d'água. Caso essa adaptação não ocorresse, os animais seriam acometidos com um tipo de miopia grave. Por ser um animal carnívoro a qualidade da visão é uma habilidade importante na vida da rã-touro.

Quanto a complexidade da visão, os anuros, como a maioria dos vertebrados, possuem células fotorreceptoras de bastonetes e cones, geralmente os bastonetes estão relacionados a sensibilidade da luz e as células de cones estão relacionadas a visão em cores (Yovanovich et al., 2017). No entanto, após a metamorfose, é observado um aumento nos números de bastonetes em relação aos cones, indicando uma maior participação das células de bastonete na identificação de cores através da percepção da luz (Gilbert e Frieden, 1981).

Em estudo de Yovanovich et al. (2017), foi observado que as rãs-touro conseguem identificar e diferenciar tons de azul e verde. Um fator interessante sobre este tipo de visão é como ele pode estar relacionado com as necessidades, hábitos e ambiente natural do animal, uma vez que as rãs-touro possuem maior atividade crepuscular e noturna, quando a iluminação é menor, se limitando a uma penumbra. Além disso, a identificação de tons verdes pode estar relacionada a escolha sexual para copula, uma vez que durante o período reprodutivo os animais apresentam colorações de verde mais intensas.

Ainda que poucas, as informações a respeito da capacidade de distinção de cores da rã-touro são importantes na compreensão de como os sentidos destes animais se desenvolvem durante a metamorfose, e como eles são utilizados na vida adulta. E como a transição de ambiente promovido pela metamorfose exerce influência sobre a sua dependência e desenvolvimento plenos.

2.3 A preferência dos anfíbios sobre a cor do ambiente

São muitos os fatores que influenciam no tempo do processo metamórfico dos girinos, apesar de espécie-específicos, podemos citar a temperatura (Wollmuth e Crawshaw, 1988; Loman, 2002; Álvarez e Nicieza, 2002; Bellakhal et al., 2014), densidade de estocagem (Bellakhal et al., 2014) e nutrição (Denver, 1997; Álvarez e Nicieza, 2002) e que por consequência destes fatores, impactos fisiológicos, como alterações nos níveis hormonais (Etkin, 1966) afetaram o tempo e desenvolvimento da metamorfose. As alterações morfofisiológicas promovidas pela metamorfose permitem

que o animal passe a ocupar um ambiente com características distintas daquele da fase larval. Nesse sentido, aspectos do ambiente inicial, como a cor, luminosidade e profundidade, podem influenciar positivamente o desenvolvimento do girino, mas deixar de ser adequados em fases mais avançadas. Durante o clímax metamórfico, por exemplo, o animal naturalmente abandona as áreas mais profundas e busca locais mais rasos e protegidos para completar sua transformação (Cribb et al., 2013).

Com poucas exceções entre as espécies de anfíbios, os girinos possuem uma relação positiva com a iluminação, apresentando preferência por ambientes mais iluminados, e além da incidência, o espectro de luz também é um fator de escolha (Gilbert e Frieden, 1981).

A escolha por ambientes mais claros pode estar relacionada a fatores ambientais, que fazem com que as águas sejam mais quentes em ambientes mais iluminados devido ao contato da luz solar. Também, em águas mais iluminadas se torna mais fácil a percepção de ameaças, bem como a identificação de alimentos. A preferência por ambientes verdes e azuis pode estar relacionada também a ambientes com maior disponibilidade de alimentos, ambientes aquáticos com maior concentração de fitoplâncton tendem a ter uma coloração mais esverdeada. Essas características se tornam atrativas uma vez que a temperatura e a disponibilidade abundante de alimento são fatores muito importantes na metamorfose (Wollmuth e Crawshaw, 1988; Denver, 1997; Álvarez e Nicieza, 2002; Loman, 2002; Bellakhal et al, 2014).

As preferências quanto aos aspectos ambientais podem mudar de acordo com a fase de desenvolvimento dos girinos. Em estudo com *Rana temporaria* de Jaeger e Hailman (1976), foi observado que enquanto na fase larval essa espécie apresenta predileção por ambientes verdes, ao atingir o clímax metamórfico ocorre uma mudança na preferência para ambientes azuis. Essa transição da preferência pode ser explicada pelas necessidades fisiológicas de cada fase de desenvolvimento, enquanto na fase larval a predileção é por ambientes mais verdes, devido ao fato de indicar maior disponibilidade de alimento, após o clímax metamórfico as rãs-touro possuem hábitos mais crepusculares, apresentando uma predileção por ambientes azuis. Essas afirmações são reforçadas por McLean (2021), em artigo de revisão, que descreve a preferência por determinado ambiente como espécie-específico e que muitas vezes pode estar relacionado com hábitos alimentares e comportamentais da espécie, bem como sua capacidade visual em distinguir cores dadas as suas necessidades fisiológicas e características evolutivas.

A grande maioria dos trabalhos disponíveis não foi desenvolvido para o ambiente de produção (Hilken et al., 1994; Moriya et al., 1996; Went e Phillips, 2005; Holmes et al., 2016; Eterovick et al., 2018; Graves et al., 2023; Mirč et al., 2023), e mesmo que as preferências tenham sido relatadas anteriormente como espécie específico, as informações disponíveis sobre diferentes espécies de anfíbios podem oferecer perspectivas iniciais para o desenvolvimento de novas pesquisas. Hilken et al. (1994) constataram que rãs *Xenopus laevis* pós-metamórficas criadas em aquários de fundo preto exibiram crescimento mais acelerado após o primeiro mês em comparação com aquelas criadas em tanques com fundo branco. Já rãs criadas em tanques cinza tiveram resultados intermediários. Os achados de Moriya et al. (1996) com animais do mesmo gênero e espécie corroboram os resultados de Hilken et al. (1994), indicando uma preferência dos girinos por ambientes com fundo preto em comparação ao fundo branco, exceto pelos girinos em sua fase inicial (pré-metamórficos), que apresentaram preferência pelo fundo branco. Em estudo de Holmes et al. (2016), fêmeas adultas de *Xenopus laevis* criadas em ambientes branco apresentaram uma maior liberação de corticosterona na água, comportamentos atípicos e perda de massa corporal, indicando um maior efeito estressor do ambiente branco em relação ao preto.

Em trabalho de Graves et al. (2023) utilizando outra espécie pertencente ao mesmo gênero (*Xenopus longipens*), avaliou padrões comportamentais de frequência de natação e frequência de repouso. Os autores constataram um menor efeito estressor nos animais criados em fundos de cores verde e cinza em comparação aos tratamentos com fundo transparente ou de fundo preto.

Eterovick et al. (2018) avaliaram a preferência de girinos de duas espécies de anuros (*Bokermannohyla martinsi* e *Ololygon machadoi*) quanto ao fundo amarelo, preto e azul. Os girinos jovens de *O. machadoi* apresentaram preferência pelo ambiente de fundo amarelo, uma vez que o ambiente de fundo azul não oferecia uma boa estratégia de camuflagem, enquanto os girinos de *B. martinsi* não demonstraram preferência alguma. Corroborando aos achados quanto ao comportamento encontrado por Moriya et al. (1996), em estudo com girinos jovens de *X. laevis*, que também apresentaram preferências por fundo claro (branco) em relação ao fundo preto, enquanto os girinos em avançado estágio de metamorfose que demonstraram preferência por fundo preto.

Wente e Phillips (2005) avaliaram a preferência sobre a cor do ambiente de pererecas *Hyla regilla* de duas diferentes colorações de pele, verde e marrom. Os autores observaram que a escolha sobre a cor do substrato foi diferente entre os grupos

observados, enquanto as pererecas de cor verde apresentaram preferência sobre um substrato correspondente (verde), as marrons não apresentaram preferência alguma.

Em recente estudo de Mirč e colaboradores (2023), com outra espécie de perereca do gênero *Hyla* (*H. arbórea*), foi identificado que estes animais possuem a capacidade de alterar sua coloração conforme o ambiente de criação. Embora reversível, os girinos de *H. arborea* buscam ativamente por um ambiente que consigam se camuflar. Também observado pelos autores, os girinos criados em tanques brancos apresentaram alterações nos formatos do corpo (focinho, cauda e nadadeiras) em relação aos criados em cores mais escuras.

As descobertas apresentadas por todos esses autores evidenciam como a preferências dos anfíbios sobre o ambiente ainda não são claras, e podem ser influenciadas por inúmeros fatores. Os trabalhos reforçam também a importância de estudos que investiguem o impacto de diferentes aspectos dos ambientes de criação no bem-estar e desempenho dos anfíbios criados em cativeiro.

2.4 Ferramentas estatísticas de análise de sobrevivência para a avaliação do tempo de metamorfose de girinos de rã-touro

Um dado importante a ser observado em estudos que avaliem a influência do ambiente no desenvolvimento de girinos, é o tempo de metamorfose. Para tal avaliação é necessária uma ferramenta estatística capaz de comparar a probabilidade de diferentes grupos experimentais de atingir o clímax ou completar a metamorfose em um determinado tempo.

A análise de sobrevivência é uma ferramenta estatística utilizada quando o objetivo é avaliar o tempo até um evento de interesse, comumente denominado de “falha”, uma vez que essa ferramenta é usada principalmente para analisar tempo de vida de materiais e tempo de sobrevivência em humanos. Quando se avalia tempo até um evento é frequente não observar o evento (falha ou morte, por exemplo) em parte das unidades experimentais, gerando assim uma observação parcial da resposta avaliada, chamada censura (Colosimo e Giolo, 2006).

A censura é a ocasião pela qual não é possível observar o evento de interesse, que no caso da análise de sobrevivência, o fim da vida do paciente. Desta forma a censura pode ser qualquer situação adversa que gere a perda do acompanhamento dele. Quando há a censura do dado, o resultado que se tem é de que o tempo até o evento em um determinado indivíduo é maior do que o observado, uma vez que não é possível inferir sobre esse tempo após a última observação (Colosimo e Giolo, 2006).

Ainda de acordo com Colosimo e Giolo (2006), censuras podem ser classificadas em três tipos, I, II e censuras aleatórias. A censura do tipo I ocorrem quando a avaliação dos dados é feita por um período preestabelecido, e até o fim deste tempo, alguns indivíduos não apresentaram o evento de estudo. O tipo II é quando o estudo é finalizado após um número preestabelecido de indivíduos apresentarem o evento estudado. Enquanto o terceiro tipo, ocorre quando se perde a informação de um indivíduo sem que tenha atingido o evento de avaliação.

Apesar da sua grande relação com estudos da área da saúde, atualmente as análises de sobrevivência têm sido aplicadas em estudos de diversas áreas de conhecimento, incluindo pesquisas nas áreas de ciências agrárias (DiMaggio et al, 2009; Crespi e Warne, 2013; Guedes et al, 2017; Ferreira et al, 2023).

Considerando que a análise de sobrevivência tem o tempo até um evento como variável de interesse e faz o tratamento de dados com censura, essa ferramenta pode ser adequadamente aplicada na ranicultura para avaliar o tempo de metamorfose de girinos em diferentes condições. Nesse caso, o evento de interesse é a metamorfose, assim é possível estimar o tempo até o clímax metamórfico, o tempo para concluir o clímax metamórfico completando a transformação e o tempo total para a conclusão da metamorfose.

No estudo do tempo até a metamorfose, é possível se deparar com os 3 tipos de censura descritas na análise de sobrevivência. Quando o experimento define um tempo para o acompanhamento até a metamorfose, é possível observar a censura do tipo I, pois ao final do período preestabelecido alguns indivíduos não terão sofrido a metamorfose. Em experimentos cujo término é definido quando um número de indivíduos pré-estabelecido atinge a metamorfose (com a finalidade de manter um número mínimo de observações) tem-se a censura do tipo II. Em ambas as situações pode ocorrer simultaneamente a censura do tipo aleatória, devido a por exemplo, a mortalidade ocasional de girinos durante o experimento.

Dados de tempo até um evento com a presença censura gera a necessidade de incluir essas observações parciais na estimativa do tempo e a análise de sobrevivência é a ferramenta estatística adequada para essa avaliação. Há diversas ferramentas de análise de sobrevivência que podem ser aplicadas e uma das mais usadas é o método estatístico não paramétrico conhecido como estimador de Kaplan-Meier.

Proposto por Kaplan e Meier (1958), o estimador que leva o nome dos pesquisadores que o desenvolveram, é o mais utilizado em estudos da área da saúde que

realizam análise de sobrevivência, tanto que o artigo que descreve o método foi ranqueado em 2017 como o artigo de estatística mais citado de todos os tempos pela Web of Science.

O estimador de Kaplan-Meier é descrito por Colosimo e Giolo (2006), como uma função escada decrescente, em que os degraus são formados nos tempos em que ocorre o evento. A função é uma adaptação da função empírica, que na ausência de censuras é definida como:

$$\hat{S}(t) = \frac{\text{total de indivíduos que sobreviveram ao tempo } t}{\text{total de indivíduos no estudo}}$$

Aplicada à observação de tempo para atingir a metamorfose, o numerador pode ser adaptado como “total de indivíduos a atingir o tempo t sem sofrer metamorfose”. Na apresentação os degraus são formados com tamanho de $1/n$, e na presença de empates o degrau é multiplicado pela quantidade de empates, ou seja, sempre que um animal atinge a metamorfose, se eleva um degrau, se mais de um animal atingir ao mesmo tempo, o degrau é multiplicado pelo número de indivíduos que sofreram o evento. Os intervalos entre os degraus são determinados pelo número de tempos em que se apresenta os eventos. Quanto mais tempos distintos com a presença de eventos, maior é o número de intervalos (Figura 3).

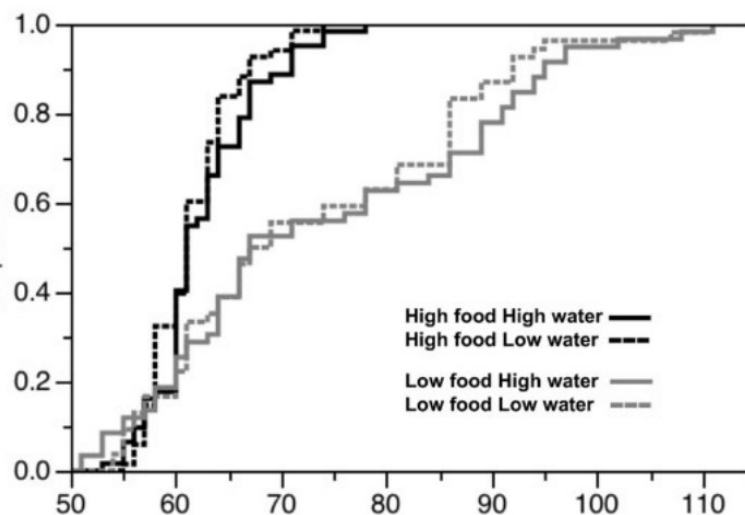


Figura 3. Efeitos da disponibilidade de alimentos e redução nos níveis de água no tempo metamórfico de *Rana Sylvatica*. Gráfico de Kaplan Meier ilustrando a proporção cumulativa de indivíduos metamorfoseando ao longo do tempo desde o início do experimento para cada tratamento: linhas pretas indicam alta alimentação; linhas cinzas indicam baixa alimentação; linhas sólidas indicam maior nível de água; linhas pontilhadas indicam baixo nível d’água. Gráfico retirado do artigo de Crespi e Warne, 2013.

De uma maneira prática, quando um indivíduo é censurado (sai do experimento sem que tenha atingido o evento), a sua presença até o momento da censura contribui para a construção da estimativa, mas a sua saída não afeta os degraus, pois o cálculo de cada tempo é gerado a partir da informação do número total de indivíduos até aquele momento. Ou seja, dadas as censuras, o estimador de Kaplan-Meier estima a probabilidade de atingir o evento de interesse nos intervalos de tempo (q_j) da seguinte forma:

$$q_j = \frac{\text{total de indivíduos com o evento de interesse no intervalo de tempo}}{\text{total de indivíduos sob risco no intervalo de tempo}}$$

Para exemplificar, vamos considerar uma situação fictícia que se quer avaliar o tempo de transformação de girinos, baseados nos dados da Tabela 1, em que $\hat{T}(t_j)$ representa a estimativa de Kaplan-Meier para os dados dos indivíduos que atingiram a metamorfose e \bar{T} (*T complementar*) representa a probabilidade complementar, ou seja, dos indivíduos permanecerem não transformados. A probabilidade de não transformação (que é análoga a probabilidade de sobrevivência nos estudos convencionais) é representada pela fórmula:

$$\bar{T}(t) = \prod_{t_j \leq t} 1 - \left(\frac{d_j}{n_j}\right)$$

Normalmente, em estudos que se avalia a sobrevivência, o \bar{T} representa o dado de interesse, que seria a probabilidade de o indivíduo não sofrer a falha (mortalidade). No entanto, considerando a metamorfose como o evento de interesse do estudo, é necessário que a apresentação do dado seja a probabilidade de o girino sofrer a metamorfose ou \hat{T} (que corresponde a falha nos estudos convencionais), que é probabilidade complementar dele não sofrer a metamorfose e pode ser obtida pelo cálculo:

$$\hat{T}(t) = 1 - \bar{T}$$

O símbolo t_j na Tabela 1 é o tempo observado (dia), n_j é o número de indivíduos sob risco (animais que ainda podem vir a sofrer metamorfose) no determinado tempo (t_j) e d_j corresponde ao número de indivíduos que sofreram a falha, ou seja atingiram a metamorfose. É importante também, observar que os indivíduos censurados (que morreram antes de atingir a metamorfose), não aparecem no quadro, no entanto foram incluídos no cálculo do n_j do tempo seguinte.

Tabela 1. Estimativa de Kaplan-Meier para dados de metamorfose

t_j	n_j	D_j	$\bar{T}(t_j)$	$\hat{T}(t_j)$
0	40	0	1,000	0,000
56	37	5	0,865	0,135
69	32	12	0,541	0,459
80	19	8	0,313	0,687
93	10	5	0,156	0,844

Considerando que se obteve os seguintes dados, as estimativas de Kaplan-Meier para essa condição é:

Exemplo 1: Estimativa da probabilidade de girinos não atingirem a metamorfose no dia 56:

$$\bar{T}(56) = \prod_{t_j \leq t} 1 - \left(\frac{5}{37}\right) = 1 - 0,135 = 0,865$$

Como observado no exemplo acima, o produto da equação é a probabilidade de 0,865 ou 86% de chance de os girinos não começarem a metamorfose ao tempo de 56 dias de experimento. No entanto, em estudos como este, o dado de interesse é o complementar do resultado observado, que seria a probabilidade de os girinos passarem pela metamorfose ao tempo de 56 dias, para isso basta realizar a subtração do resultado por 1.

Assim, $\hat{T} = 1 - 0,865 = 0,135$, logo a probabilidade de que os girinos passem pela metamorfose no tempo 56 é de 0,135 ou 13,5% de chance.

Uma característica importante sobre a estimativa de Kaplan-Meier, é que o resultado de probabilidade é condicional, a estimativa do tempo seguinte é calculada considerando o resultado da estimativa do tempo anterior (Colosimo e Giolo, 2006).

Para que o animal chegue ao tempo 69 sem sofrer a metamorfose, ele precisa passar pelo tempo 56, sem ter entrado em metamorfose e condicionado a ter iniciado no experimento no tempo 0. Dessa forma para o segundo e terceiro exemplo, podemos tratar os tempos seguintes de 69 e 80 dias:

$$\bar{T}(69) = \prod_{t_j \leq t} \left(1 - \left(\frac{5}{37}\right)\right) * \left(1 - \left(\frac{12}{32}\right)\right) = (1 - 0,135) * (1 - 0,375) = 0,540$$

$$\hat{T}(69) = 1 - 0,540 = 0,459$$

$$\begin{aligned}\bar{T}(80) &= \prod_{t_j \leq t} \left(1 - \left(\frac{5}{37}\right)\right) * \left(1 - \left(\frac{12}{32}\right)\right) * \left(1 - \left(\frac{8}{19}\right)\right) \\ &= (1 - 0,135) * (1 - 0,375) * (1 - 0,421) = 0,313 \\ \hat{T}(80) &= 1 - 0,313 = 0,687\end{aligned}$$

Assim, a probabilidade de os girinos atingirem a metamorfose aos 80 dias de experimento é de 0,687 ou 68,7%.

Ao construir a curva da estimativa de Kaplan-Meier para os dados desta situação hipotética, é possível obter a seguinte figura (Figura 4):

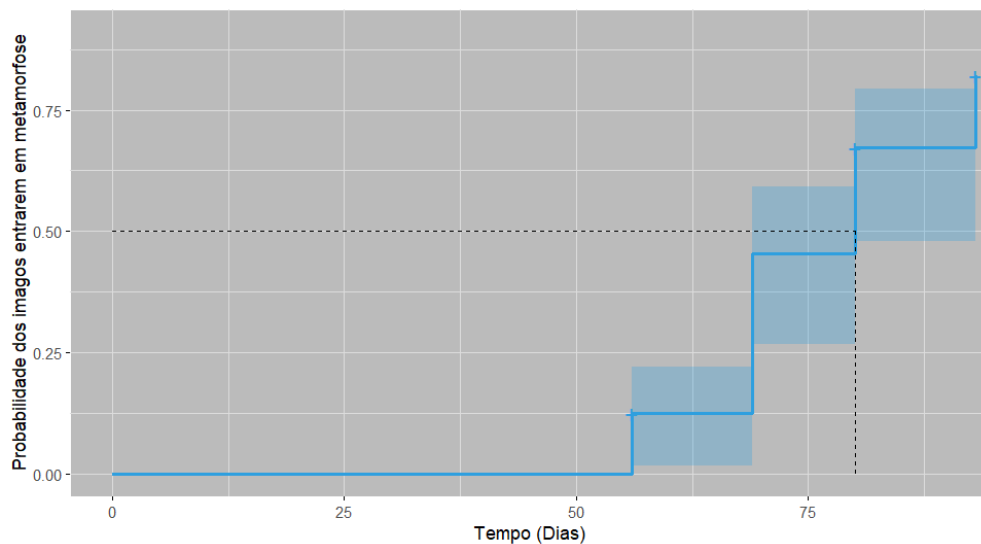


Figura 4. Gráfico de Kaplan-Meier dos dados para a estimativa de probabilidade de girinos atingirem a metamorfose ao longo do tempo (linha azul), apresentados na Tabela 1. O intervalo de confiança é representado pelo intervalo marcado de azul em torno da estimativa, representada pela linha azul..

Em estudos em que se avalie mais de um grupo de indivíduos e é desejado a comparação entre estes grupos, ao observar as curvas, é comum que se pense na comparação entre os pontos dos degraus. No entanto, esta comparação não seria adequada para avaliar os resultados fornecidos pelo estimador de Kaplan-Meier, uma vez que estaria comparado apenas um determinado tempo de toda a avaliação do tempo. Para isso são utilizados testes não paramétricos desenvolvidos para a avaliação de dados contendo censuras, como o teste *logrank* (Mantel, 1966).

O *logrank* avalia a diferença entre o número observado de ocorrência do evento de estudo em cada grupo, e uma quantidade esperada de ocorrência do evento sob a

hipótese nula, ou seja, de não diferença entre os grupos (Colosimo e Giolo, 2006). Esse teste indicado para situações em que os grupos apresentem taxa de falha proporcionalmente constantes, ou seja, situação em que os grupos apresentem certa frequência de ocorrência do evento observado. Considerando que para iniciar a metamorfose o girino precisa atingir um determinado tamanho, um processo complexo mediado pela ação dos hormônios relacionados ao crescimento, é esperado que a ocorrência do evento de atingir o clímax metamórfico ou completar a metamorfose, seja aproximadamente constante ou frequente, que ocorra em tempo semelhante ou pouco variável. O que faz da aplicação do teste de *logrank* adequada para a comparação das curvas de tempo de metamorfose geradas pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albinati, R. C. B.; LIMA, S. L. 1994. Tempo de trânsito do alimento pelo trato gastrointestinal de girino rã-touro (*Rana catesbeiana*). Arquivos da Escola Medicina de Veterinária - UFBA, 1(18):61-69.

Álvarez, D., Nicieza, A. G., 2002. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Funct. Ecol.* v. 16, n. 5, p. 640-648.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00658.x>

Alves, A. X., Lana, M., Matos, H. C., Pawlowski, V. R., Azevedo, R. O., Brabo, M. F., Capelo, D. A. V., Veras, G. C., 2020. Daily frequency of water changes in flooded pens during initial bullfrog rearing. *Aquaculture.* v. 528, p. 735555.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735555>.

Bellakhal, M., Neveu, A., Fartouna-Bellakhal, M., Missaoui, H., Aleya, L., 2014. Effects of temperature, density and food quality on larval growth and metamorphosis in the north African green frog *Pelophylax saharicus*. *J. Therm. Biol.* v. 45, p. 81-86.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.08.006>

Boaventura, T. P., Pedras, P. P. C., Santos, F. A. C., Ferreira, A. L., Favero, G. C., Palheta, G. D. A., Luz, R. K., 2021. Cultivation of juvenile *Colossoma macropomum* in different colored tanks in recirculating aquaculture system (RAS): effects on performance, metabolism and skin pigmentation. *Aquaculture.* v. 532, p. 736079.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736079>.

Braun, C. B. 2017. Lateral line systems (including electroreception). In J. H. Kaas (Ed.), *Evolution of nervous systems*. Academic Press. v. 1, 2nd ed., p. 257–276.

Bury, R. B., Whelan, J. A., 1984. Ecology and management of the bullfrog. U.S. Fish and Wildlife Service Resource. v. 155, Washington, DC.

Colosimo, E. A e Giolo, S. R., 2006. Análise de sobrevivência aplicada. São Paulo. Editora Blucher.

Costa, D. C., Mattioli, C. C., Silva, W. S., Takata, R., Leme, F. O. P., Oliveira, A. L., Luz, R. K., 2017. The effect of environmental colour on the growth, metabolism, physiology and skin pigmentation of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*. J. Fish Biol. v. 90, n. 3, p. 922-935. <https://doi.org/10.1111/jfb.13208>.

Crespi, E. J., Warne, R. W. 2013. Environmental conditions experienced during the tadpole stage alter post-metamorphic glucocorticoid response to stress in an amphibian. Integr. Comp. Biol. v. 53, p. 989-1001.

Cribb, A. Y., Afonso, A. M., Mostério, C. M. F., 2013. Manual técnico de ranicultura, first ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Brasília.

Denver, R. J., 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. Am. Zool. v. 37, n. 2, p. 172-184. <https://doi.org/10.1093/icb/37.2.172>.

DiMaggio, M. A., Ohs, C. L., and Petty, B. D. 2009. Salinity tolerance of the Seminole killifish, *Fundulus seminolis*, a candidate species for marine baitfish aquaculture. Aquaculture. v. 293, p. 74–80. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.009

Dubois, A., Ohler, A., e Pyron, R. A., 2021. New concepts and methods for phylogenetic taxonomy and nomenclature in zoology, exemplified by a new ranked cladonomy of recent amphibians (*Lissamphibia*). Megataxa. v. 5, n. 1, p. 1–738-1–738. <https://doi.org/10.11646/megataxa.5.1.1>

Elnwishy, N., Sabri, D., e Nwonwu, F., 2012. The effect of difference in environmental colours on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production efficiency. Int. J. Ag Biol. v. 14, n. 4.

Eterovick, P. C., Mendes, I. S., Kloh, J. S., Pinheiro, L. T., Václav, A. B. H. P., Santos, T., & Gontijo, A. S. B., 2018. Tadpoles respond to background colour under threat. *Sci. Rep.* v. 8, n. 1, p. 4085. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22315-8>.

Etkin, W. 1966. How a tadpole becomes a frog. *Sci. Amer.* v. 214, n. 5, p. 76-91.

Etkin, W., Gona, A. G. 1967. Antagonism between prolactin and thyroid hormone in amphibian development. *Journal of Experimental Zoology*, 1 v. 65(2), p. 249-258. <https://doi.org/10.1002/jez.1401650209>.

FAO (Food and Agriculture Organization), 2021. Global Aquaculture Production 1950–2018. Fishery Statistical Collection.

FAO (Food and Agriculture Organization), 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation (Rome).

Ferosekhan, S., Sahoo, S. K., Radhakrishnan, K., Velmurugan, P., Shamna, N., Giri, S. S., Pillai, B. R., 2020. Influence of rearing tank colour on Asian catfish, magur (*Clarias magur*) and pangas (*Pangasius pangasius*) larval growth and survival. *Aquaculture* v. 521, p. 735080. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735080>.

Ferreira, T. A., de Souza, E. R., Matos, C. R., Verado, L. L., Pedreira, M. M. 2023. Survival analysis as a tool for breeding management of Nile tilapia in an intensive system. *Aquac. Int.* <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01289-z>.

Gilbert, L. I and Frieden, E., 1981. *Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology*. Plenum Press, New York and London.

Gosner, K. L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. v. 16, n. 3, p. 183-190. <http://www.jstor.org/stable/3890061>.

Guedes, D. G. P., Cunha, E. E., Lima, G. F., C. 2017. Genetic evaluation of age at first calving from Brown Swiss cows through survival analysis. *Archivos de Zootecnia*. v. 66, p. 247-255.

Graves, A. E., Dias, J. E., & Michaels, C. J., 2022. Effects of Background Color on Stress-Linked Behavior in the Critically Endangered Lake Oku Clawed Frog (*Xenopus longipes*). *Journal of Zoological and Botanical Gardens*. v. 4, n. 1, p. 99-107. <https://doi.org/10.3390/jzbg4010011>.

Hilken G, Dimigen J, Iglauer F., 1994. Growth of *Xenopus laevis* under different laboratory rearing conditions. *Lab Anim*. v. 29, n. 2, p. 152-162. <https://doi.org/10.1258/00236779578074027>.

Holmes, A. M., Emmans, C. J., Jones, N., Coleman, R., Smith, T. E., Hosie, C. A., 2016. Impact of tank background on the welfare of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Daudin). *Appl. Anim. Behv. Sci.* v. 185, p. 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.09.005>.

Horowitz, S. S., Chapman, J. A., Simmons, A. M., 2007. Plasticity of auditory medullary-midbrain connectivity across metamorphic development. *Brain Behavior and Evolution*, v. 69, n. 1, p. 1-19. <https://doi.org/10.1159/000095027>.

Hoskins, S. G., 1990. Metamorphosis of the amphibian eye. *J. Neurobiol.* v. 21, n. 7, p. 970-989. <https://doi.org/10.1002/neu.480210704>.

Hourdry, J., L'Hermite, A., Ferrand, R., 1996. Changes in the digestive tract and feeding behavior of anuran amphibians during metamorphosis. *Physiol Zool*. v. 69, n. 2, p. 219-251. <https://doi.org/10.1086/physzool.69.2.30164181>.

Jaeger, R. G., e Hailman, J. P., 1976. Ontogenetic shift of spectral phototactic preferences in anuran tadpoles. *J. Comp. Physiol. Psychol.* v. 90, n. 10, p. 930, 1976. <https://doi.org/10.1037/h0077275>.

Jegade, T., 2011. Effects of colour on growth of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1757) fingerlings. *Int. J. Biochem. Sci.* v. 5, n. 1. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v5i1.68116>.

Kaplan, E. L e Meier, P. 1958. Nonparametric-estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association.* v. 53, p. 457–481.

Loman, J., 2002. Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the Weld. *J Zool.* v. 258, n. 1, p. 115-129. <https://doi.org/10.1017/S0952836902001255>.

Mantel, N. 1996. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports.* v. 50, p. 163-170.

McLean, E., 2021. Fish tank color: an overview. *Aquaculture.* v. 530, p. 735750. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735750>.

McLean, E., Cotter, P., Claire, T., King, N., 2008. Tank color impacts performance of cultured fish. *Ribarstvo.* v. 66, n. 2, p. 43-54.

Mirč, M., Vukov, T., Kijanović, A. & Kolarov, N. T., 2023. Effects of background color on pigmentation, morphological traits, and behavior in the European tree frog (*Hyla arborea*, *Hylidae*, *Anura*) tadpoles. *Contrib. Zool.* v. 92, n. 2, p. 112-129. <https://doi.org/10.1163/18759866-bja10040>.

Mohun, S. M. e Davies, W. I. L., 2019. The evolution of amphibian photoreception. *Frontiers in Ecology and Evolution.* v. 7, p. 321. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.0032>.

- Moriya, T., Kito, K., Miyashita, Y., Asami, K., 1996. Preference for background color of the *Xenopus laevis* tadpole. J. Exp. Zool. v. 276, n. 5, p. 335-344. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19961201\)276:5<335::AID-JEZ4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19961201)276:5<335::AID-JEZ4>3.0.CO;2-P).
- Opiyo, M. A., Ngugi, C. C., Rasowo, J., 2014. Combined effects of stocking density and background colour on growth performance and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in aquaria. J. Fish. Sci. v. 8, n. 3, p. 228. <https://doi.org/10.3153/jfscom.201429>.
- Pedreira, M. M., Sipaúba-Tavares, L. H., 2001. Effect of light green and dark brown colored tanks on survival rates and development of tambaqui larvae, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae). Acta Sci. Maringá. v. 23, n. 2, p. 521-525.
- Ribeiro, L.P., Toledo, L.F., 2022. An overview of the Brazilian frog farming. Aquaculture 548, 737623. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737623>.
- Ryan, M. J. 1980. The reproductive behavior of the bullfrog (*Rana catesbeiana*), Copeia, Washington, v. 1, p. 108-114. <https://doi.org/10.2307/1444139>.
- Seixas Filho, J. T., Pereira, M. M., Mello, S. C. R. P., 2017. Manual de Ranicultura para o Produtor, first ed. HP Comunicação Editora, Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro. FIPERJ, Rio de Janeiro.
- Volpato, G. L., Duarte, C. R. A., Luchiari, A. C., 2004. Environmental color affects Nile tilapia reproduction. Braz. J. Med. Biol. Res. v. 37, p. 479-483. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000400004>.

Wente, W. H. e Phillips, J. B., 2005. Microhabitat selection by the Pacific treefrog, *Hyla regilla*. Anim. Behav. v. 70, n. 2, p. 279-287.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.10.029>.

Wollmuth, L. P., e L. I. Crawshaw., 1988. The effect of development and season on temperature selection in bullfrog tadpoles. Physiol. Zool. v. 61, n. 5, p. 461-469.
<https://doi.org/10.1086/physzool.61.5.30161268>.

Yovanovich, C. A. M., Koskela, S. M., Nevala, N., Kondrashev, S. L., Kelber, A., Donner K., 2017. The dual rod system of amphibians supports colour discrimination at the absolute visual threshold. Philos. Trans. R. Soc. B. v. 372, n. 1717, p. 20160066.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0066>.

CAPÍTULO 3: REARING AMERICAN BULLFROG TADPOLES IN DIFFERENT TANK COLORS: EFFECT ON METAMORPHOSIS, PERFORMANCE, AND BIOCHEMISTRY RESPONSES

Gean Paulo Andrade Reis^a, Nayara Netto dos Santos^a, Vinícius Monteiro Bezerra^a, Yhago Patrycky Antunes Souza Assis^a, Thaissa Pereira Machado da Silva^a, Victor Ramos Pawlowski^a, Luiz Antônio Gonçalves^a, Nubia Maria Braga^a, Mariele Lana^a, Daniel Abreu Vasconcelos Campelo^b, Érika Ramos de Alvarenga^a, Galileu Crovatto Veras^{a*}.

^aUniversidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura, Avenida Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 567, Campus Pampulha da UFMG, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^bUniversidade Federal do Pará, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Rodovia BR-316, km 61, Campus II de Castanhal, Instituto de Medicina Veterinária, CEP: 68.740-970 Castanhal, Para, Brazil



Rearing American bullfrog tadpoles in different tank colors: Effect on metamorphosis, performance, and biochemistry responses

Gean Paulo Andrade Reis^a, Nayara Netto dos Santos^a, Vinícius Monteiro Bezerra^a, Yhago Patrycky Antunes Souza Assis^a, Thaissa Pereira Machado da Silva^a, Victor Ramos Pawlowski^a, Luiz Antônio Gonçalves^a, Nubia Gomes Braga^a, Mariele Lana^a, Daniel Abreu Vasconcelos Campelo^b, Érika Ramos de Alvarenga^a, Galileu Crovatto Veras^{a,*}

^a Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura, Avenida Antônio Carlos, 6627, caixa postal 567, Campus Pampulha da UFMG, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Rodovia BR-316, km 61, Campus II de Castanhal, Instituto de Medicina Veterinária, CEP: 68.740-970 Castanhal, Pará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Amphibia
Aquarana catesbeiana
Lithobates catesbeianus
Rana catesbeiana
Background color
Welfare

ABSTRACT

This study examined the influence of tank color on the performance, time to metamorphosis, skin pigmentation, and biochemistry parameters of American bullfrog tadpoles and froglets. Six hundred tadpoles (0.94 ± 0.11 g) were selected (Gosner stage – 25) and distributed in a completely randomized design in 15 tanks of 40 L (1 tadpole L^{-1}) in a recirculating aquaculture system, five repetitions of each color (blue, black, and white). Bio-metrics were performed every 14 days in all experimental units, and when the tadpoles at metamorphic climax and following complete transformation. Animals were weighed, measured, and photographed to evaluate the growth performance, uniformity, and skin pigmentation analyses. At the conclusion of metamorphosis, twenty-four animals randomly selected per treatment were euthanized. Twelve of them were macerated to performed of the whole-body biochemistry analysis, and the other twelve were dissected to obtain the biological indexes. The tadpoles raised in blue, and black tanks reached the metamorphosis climax and transitioned into froglets more rapidly ($P < 0.05$) than animals held in white tanks. However, tadpoles at metamorphic climax reared in black tanks had prolonged time to complete the metamorphosis ($P < 0.05$). The tadpoles raised in blue background had the higher values for final body weight throughout the experiment ($P < 0.05$). The tadpoles raised at blue and black tanks had the higher values for body weight gain, body length, body length gain, protein efficiency ratio, specific growth rate and lower feed conversion ratio throughout the experiment ($P < 0.05$). The pre- and pro-metamorphic uniformity of tadpoles was affected by the color of the tank, with the white treatment having lower uniformity at the 14, 42, 56, 70 and 98 days of the experiment ($P < 0.05$). In addition, tadpoles on metamorphic climax and froglets raised on black, and blue tanks had darker color of skin compared with the animals raised in white tanks, with animals raised in black tanks showing darker skin tones ($P < 0.05$). However, neither the growth, and uniformity of tadpoles on metamorphic climax and froglets, nor the biological indexes and whole-body biochemistry of froglets were affected by tank color ($P > 0.05$). Therefore, considering the homogeneity in growth, and time to metamorphosis, blue colored tanks represent best choice for reared of American bullfrog tadpoles.

1. Introduction

The welfare of an animal in captivity is influenced by its production facilities. Optimizing environmental conditions in animal production not only aligns with ethical standards, but promote welfare, and

significantly enhances performance by creating favorable environments for these organisms. In this context, it is important to understand how the animal perceives and responds to the rearing environment. Among the senses, vision plays a prominent role for most production animals, and the color of the rearing environment plays a fundamental role in

* Corresponding author.
E-mail address: galileucv@ufmg.br (G.C. Veras).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740994>

Received 29 January 2024; Received in revised form 15 April 2024; Accepted 22 April 2024

Available online 26 April 2024

0044-8486/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abstract

This study examined the influence of tank color on the performance, time to metamorphosis, skin pigmentation, and biochemistry parameters of American bullfrog tadpoles and froglets. Six hundred tadpoles (0.94 ± 0.11 g) were selected (Gosner stage 25) and distributed in a completely randomized design in 15 tanks of 40 L (1 tadpole L⁻¹) in a recirculating aquaculture system, five repetitions of each color (blue, black, and white). Biometrics were performed every 14 days in all experimental units, and when the tadpoles at metamorphic climax and following complete transformation. Animals were weighed, measured, and photographed to evaluate the growth performance, uniformity, and skin pigmentation analyses. At the conclusion of metamorphosis, twenty-four animals randomly selected per treatment were euthanized. Twelve of them were macerated to performed of the whole-body biochemistry analysis, and the other twelve were dissected to obtain the biological indexes. The tadpoles raised in blue, and black tanks reached the metamorphosis climax and transitioned into froglets more rapidly ($P < 0.05$) than animals held in white tanks. However, tadpoles at metamorphic climax reared in black tanks had prolonged time to complete the metamorphosis ($P < 0.05$). The tadpoles raised in blue background had the higher values for final body weight throughout the experiment ($P < 0.05$). The tadpoles raised at blue and black tanks had the higher values for body weight gain, body length, body length gain, protein efficiency ratio, specific growth rate and lower feed conversion ratio throughout the experiment ($P < 0.05$). The pre- and pro-metamorphic uniformity of tadpoles was affected by the color of the tank, with the white treatment having lower uniformity at the 14, 42, 56, 70 and 98 days of the experiment ($P < 0.05$). In addition, tadpoles on metamorphic climax and froglets raised on black, and blue tanks had darker color of skin compared with the animals raised in white tanks, with animals raised in black tanks showing darker skin tones ($P < 0.05$). However, neither the growth, and uniformity of tadpoles on metamorphic climax and froglets, nor the biological indexes and whole-body biochemistry of froglets were affected by tank color ($P > 0.05$). Therefore, considering the homogeneity in growth, and time to metamorphosis, blue colored tanks represent best choice for reared of American bullfrog tadpoles.

Keywords: Amphibia, *Aquarana catesbeiana*, *Lithobates catesbeianus*, *Rana catesbeiana*, Background color, Welfare.

3.1. Introduction

The welfare of an animal in captivity is influenced by its production facilities. Optimizing environmental conditions in animal production not only aligns with ethical standards, but promotes welfare, and significantly enhances performance by creating favorable environments for these organisms. In this context, it is important to understand how the animal perceives and responds to the rearing environment. Among the senses, vision plays a prominent role for most production animals, and the color of the rearing environment plays a fundamental role in productive success (McLean, 2021).

Frogs, like most vertebrates, have rod and cone photoreceptor cells. Rods are associated with light sensitivity, while cones are related to color perception (Yovanovich et al., 2017). Evidence suggests that anurans can identify and differentiate certain colors based on light intensity, and the preference for the color of the environment may even change according to the developmental phase of animal (Jaeger and Hailman, 1976; Yovanovich et al., 2017). Moriya et al. (1996) demonstrated that *Xenopus laevis* tadpoles show a preference for the color white, in the initial stages of development, during pre-metamorphosis, while animals at the climax of metamorphosis and froglets prefer to remain in an environment with a black background. Furthermore, Ruchin (2003) demonstrated that the exposure of *Rana temporaria* tadpoles to monochromatic lights of different wavelengths interferes with the growth, uniformity, and metamorphosis duration in this species.

Several studies have investigated the color preferences of the production environments of different fish species, e.g., tilapia *Oreochromis niloticus* (Volpato et al., 2004; McLean et al., 2008; Jegede, 2011; Elnwishy et al., 2012; Opiyo et al., 2014), tambaqui *Colossoma macropomum* (Pedreira and Sipaúba-Tavares, 2001; Boaventura et al., 2021), pacamã *Lophiosilurus alexandri* (Costa et al., 2017), panga *Pangasius pangasius* (Ferošekhan et al., 2020), among other species of productive interest. On the other hand, information on the influence of environment color on the lives of amphibians is limited. Moreover, most such studies have not been focused on frog production systems (Hilken et al., 1994; Moriya et al., 1996; Ruchin, 2003; Wentz and Phillips, 2005; Holmes et al., 2016; Eterovick et al., 2018; Graves et al., 2023; Mirč et al., 2023; Wei et al., 2023). Furthermore, although the American bullfrog *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802) is the main frog species produced in the world for human consumption, there is no record in the literature about the influence of environment color on the production of this species.

World production of live frogs increased by approximately 48% in 15 years, jumping from 71.2 to 147.8 thousand tons from 2005 to 2020 (FAO, 2022). Among the species produced, the American bullfrog stands out, the species responsible for 88% of global production. Currently the largest producers of the American bullfrog are Taiwan, Malaysia, Singapore, Brazil, Ecuador, and Mexico (FAO, 2021). However, despite being produced in several countries, problems related to the lack of standardization of facilities, as well as management techniques, are very common in all phases of American bullfrog reared, which negatively impacts the productive capacity of bullfrog farming.

Given the recognition of American bullfrog production on the world stage, the importance of developing research into the preferences of this anuran regarding environmental aspects focused on animal production stands out, with the purpose of promoting knowledge and improvement in production environments, offering better welfare conditions for a more ethical and efficient production chain. Therefore, the present study aimed to understand the influence of the color of the production environment on performance, time to metamorphosis and some biochemistry parameters of American bullfrog tadpoles.

3.2. Material and methods

3.2.1 Ethics statement and location

All procedures of this study were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), under protocol: 114/2023. The experiment was conducted at the Aquaculture Laboratory of the Veterinary School of UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (19° 52'15.916" S - 43° 58' 13.157" W).

3.2.2 Experimental facilities, conditions, and experimental design

The American bullfrog tadpoles (*Aquarana catesbeina*) used in the research were obtained from four events of spawning carried out from November to December 2022 in the UFMG Bullfrog Farming Sector. Six hundred tadpoles were selected at stage 25 of Gosner's (1960) classification. The animals were weighed (0.94 ± 0.11 g), measured – total length (4.45 ± 0.37 cm) and distributed in a completely randomized design in 15 tanks, five repetitions of each color (blue royal – code: #2431cf, white – code: #ffffff, or black – code: #000000) (Fig. 1A and B), with a volume of 40 L of water at a density of one tadpole per liter (40 tadpoles per tank), in a Recirculating Aquaculture System - RAS. The water flow was adjusted to two complete renewals per hour in the system (80 L h⁻¹

tank⁻¹). These colors were chosen because they are the most available on the Brazilian market and, therefore, are the most used in aquaculture.

The tadpoles were maintained in artificial photoperiod of 12 L:12 D (L – hours of light and D – hours of dark). Air temperature (25.02 ± 1.18 °C) and water temperature (26.42 ± 1.67 °C) were daily measured, 3× daily (8:00 h, 12:00 h, and 16:00 h). The maximum and minimum air temperatures (26.23 ± 1.08 °C and 23.12 ± 1.37 °C) and water temperatures (27.26 ± 1.55 °C and 25.48 ± 1.86 °C) were also measured daily, before the first feeding. A maximum and minimum digital thermometer was used to measure temperatures (Instrutherm® – TH-200).

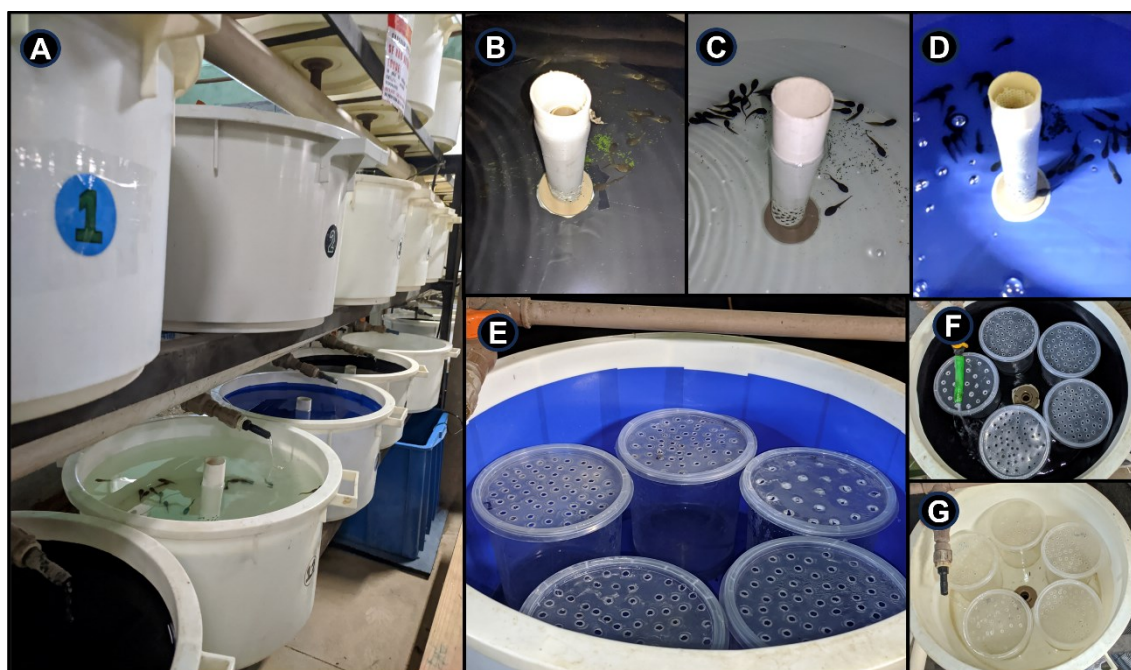


Figure 1. Experimental facilities

A – photo of the water recirculation system used in the experiment; B, C and D – representation of the black, white and blue tanks, respectively, used to raise American bullfrog tadpoles until they reach their metamorphic climax; E, F and G – representation of the blue, black and white tanks, respectively, used to accommodate American bullfrog tadpoles in metamorphic climax until the metamorphosis completion; Inside the tanks are translucent plastic pots where the animals were individually accommodated. Each of these pots had perforations in the base and lid to allow water circulation and air, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Toxic ammonia (0.01 ± 0.01 mg L⁻¹), pH (7.28 ± 0.25) and nitrite (1.53 ± 0.83 mg L⁻¹) were measured using specific commercial tests (LABCON®), once a week, before the first feeding of the day. Dissolved oxygen (4.59 ± 0.66 mg L⁻¹) and oxygen

saturation percentage ($54.46 \pm 9.24\%$) were also measured once a week with an EcoSense[®] DO200A oximeter.

3.2.3 Feeding management

The tadpoles were fed with an extruded commercial feed for carnivorous fish (Pira Evolution Carnivorous, Guabi[®]), which contained 40% crude protein, 10% ether extract, 7% fibers and 16% mineral matter. For better consumption by the tadpoles, the feed was crushed in a stirred pin-mill and passed through a 1 mm sieve until a meal was obtained. Feeding was conducted five times a day (8:00 h, 10:00 h, 12:00 h, 14:00 h and 16:00 h), using a maximum feeding rate based on the average weight of the tadpoles to avoid overfeeding and compromising water quality. Feeding rates were updated according to the biometric table of Lima et al. (2003).

The tanks were cleaned daily, by siphoning, 30 min. after the last feeding of the day. After cleaning the tanks, the water was replaced directly in the filter, to maintain system water volume.

3.2.4 Biometrics and assessment of metamorphosis stages

Biometrics were performed every two weeks (14 days), randomly sampling 25 tadpoles per box. For each box, tadpoles were weighed, measured – total length and photographed. The images were obtained from a 48MP super quad camera (8000 × 6000 pixels resolution) on an Android smartphone (Xiaomi Redmi Note 10, M2101K7AI). The photos were recorded using a white background to better identify the stages of metamorphosis, according to Gosner (1960) (Fig. 2). At each biometric sampling, animals were staged and grouped into pre-metamorphic, pro-metamorphic, metamorphic climax and froglets stages, according to Etkin's classification (Etkin, 1966), to determine the proportions of the animals in each phase of metamorphosis.

The tadpoles were kept in the tanks until the last treatment reached 80% of tadpoles at stage 42 of Gosner's classification (Gosner, 1960), corresponding to the climax of metamorphosis, which occurred after 108 days of experimentation. The other 20% that did not reach stage 42 of metamorphosis were weighed and measured at 108 days to obtain performance data; and photographed, to identify the stages of metamorphosis. This strategy in the methodology was used to overcome the lack of synchronization in the metamorphosis of American bullfrog tadpoles (even with tadpoles of the same age), a problem that is already widely known within American bullfrog farming.

Upon reaching the metamorphic climax, the tadpoles from each treatment were transferred to metamorphosis tanks of the same color (Fig. 1C), according to the color of the tank of origin. In the metamorphosis tanks, the tadpoles in metamorphic climax were separated individually into transparent circular polyethylene pots measuring 12 cm in diameter and 20 cm in height, which were duly marked to record the day the tadpole entered the climax of metamorphosis and exited as an froglet. To allow the exchange of water with the metamorphosis tank, these pots were perforated at their base. To prevent escape of the animals at the end of metamorphosis, these pots contained lids with small perforations to allow air to enter. The metamorphosis tanks were also circular, with a capacity of 40 L of useful volume, maintained in a water layer of 2 cm high (Fig. 1C). The metamorphosis tanks were also maintained in a water recirculation system.

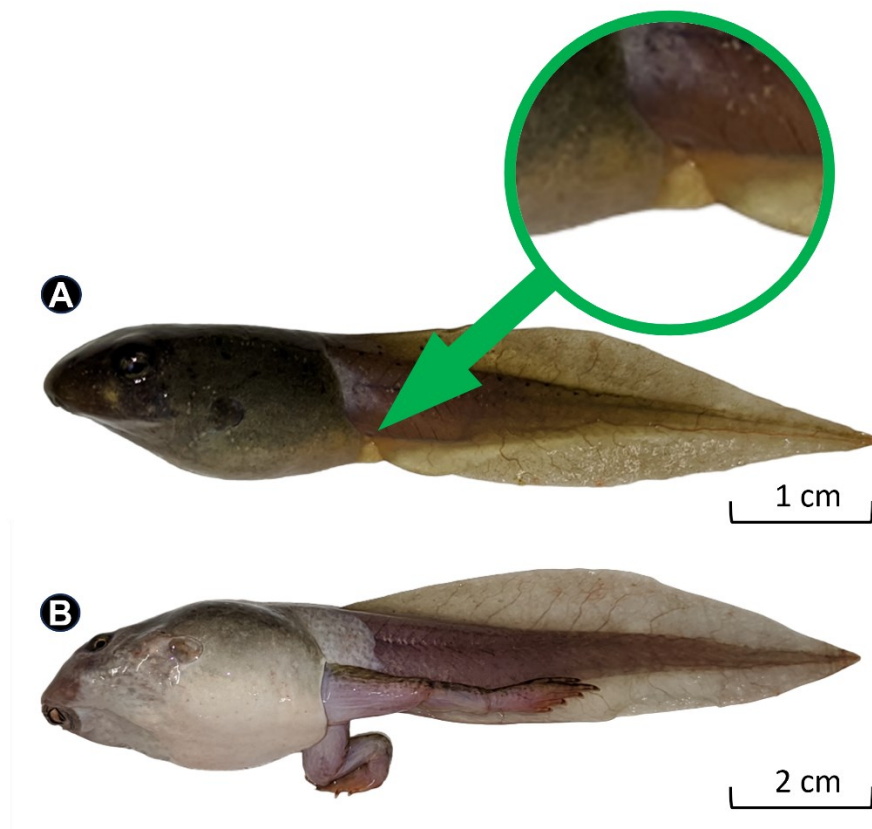


Figure 2. Stages of metamorphosis.

A – American bullfrog tadpole in the pre-metamorphosis stage (Stage 29 of Gosner's table – where the length (L) and diameter (D) ratio of the appendage is: $L \geq 1.5 \times D$). B – American bullfrog tadpole in the pro-metamorphosis stage (Stage 41 of Gosner's table – where the legs are fully formed and the forelimbs are already noticeable, but internally). The green arrow and enlarged image show the presence of a small

appendage that will become the hind legs. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Therefore, the time for reach the metamorphosis climax and complete metamorphosis were estimated based on the start date of the experiment and the dates which animals reached the metamorphic climax and completed metamorphosis, respectively. Likewise, the duration of the metamorphic climax phase until the animal transformed into a froglet was estimated, based on the date the tadpoles entered metamorphic climax and the day they completed metamorphosis. After 120 days of experimentation, the last tadpole kept in the metamorphosis tank, which had entered at 108 days, transformed into a froglet, ending the experimental period.

3.2.5 Analysis of skin color

The skin color of tadpoles in metamorphic climax and froglets were measured following the $L^*a^*b^*$ coordinates, using the Colorimeter application developed by Research Lab Tools, São Paulo, Brazil, available on the Play Store (Ravindranath et al., 2018; Boaventura et al., 2021). Pictures of ten animals per treatment were taken by a 48MP super quad camera (resolution of 8000×6000 pixels) on an Android smartphone (Xiaomi Redmi Note 10, M2101K7AI) when they reached the metamorphic climax, and from ten other animals per treatment upon completing the metamorphosis, during the transformation into froglets. The pictures were taken with the animals in a horizontal-dorsal position, framing the entire body from the base of the tail to the mouth when tadpoles in metamorphic climax and from the cloaca to the mouth when froglets.

From the photos, four points were marked, center of the head, right side of the body, left side of the body and close to the base of the tail, and the coordinates $L^*a^*b^*$ were measured (Fig. 3), where L^* represents luminosity (with lower values closer to black and higher values closer to white), a^* measures from green to red (lower values closer to green, higher values closer to red), and b^* measures from blue to yellow (lower values closer to blue, higher values closer to yellow). Using the coordinates, the individual average color value of each animal photo graphed was determined, and the difference in skin color among the animals in different treatments was analyzed.

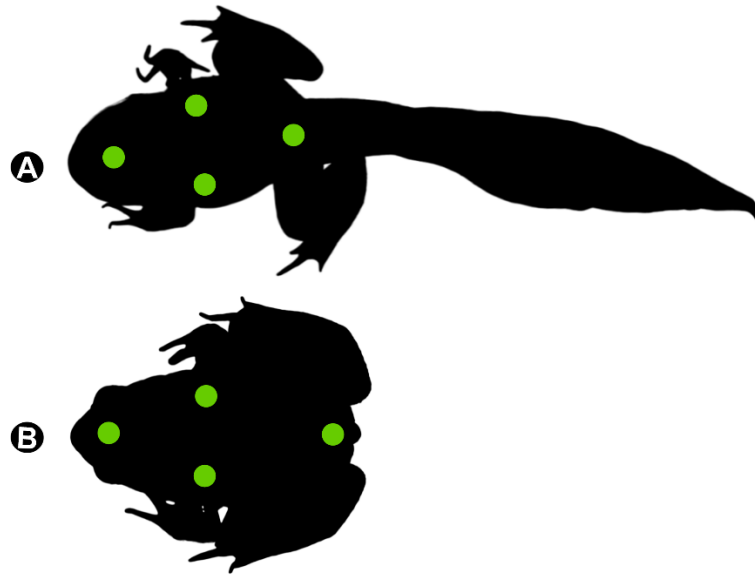


Figure 3. Analysis of skin color.

The green circles represent the points used to measure the L*a*b* coordinates. A – American bullfrog tadpole in metamorphic climax and B – American bull frog froglet. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

3.2.6 Growth performance

The animals were counted, weighed, and measured to determine the growth performance variables, throughout the experiment, during bio metrics, and as soon as the tadpoles reached the metamorphosis climax and the froglets phase:

- Survival rate (SR) $SR (\%) = (\text{final number of animals} / \text{initial number of animals}) \times 100$

- Weight (g) of the tadpole at the climax of metamorphosis (FW_{climax}) and weight gain (g) until the tadpole reaches metamorphic climax (WG_{climax})

$$WG_{\text{climax}} (\text{g}) = FW_{\text{climax}} - W_{\text{initial}}$$

- Specific growth rate of the tadpole in the metamorphic climax phase (SGR_{climax})

$$SGR_{\text{climax}} (\% \text{day}^{-1}) = [(\ln FW_{\text{climax}} - \ln W_{\text{initial}}) / n \text{ ° of days}] \times 100$$

- Weight (g) of froglets (FW_{froglets}) and weight gain (g) until the animal reaches the froglet stage (WG_{froglets})

$$WG_{\text{froglets}} (\text{g}) = FW_{\text{froglets}} - W_{\text{initial}}$$

- Specific growth rate of froglets (SGR_{froglets})

$$SGR_{\text{froglets}} (\% \text{day}^{-1}) = [(\ln WF_{\text{froglets}} - \ln W_{\text{initial}}) / n \text{ ° of days}] \times 100$$

- Length (cm) of tadpoles in the metamorphic climax phase (L_{climax}) and length of froglets (L_{froglets})

- Length gain (cm) of tadpoles until the animal reaches metamorphic climax

$$LG_{\text{climax}} (\text{g}) = FL_{\text{climax}} - L_{\text{initial}}$$

- Feed conversion ratio of tadpoles at the climax of metamorphosis (FCR_{climax})

$$FCR_{\text{climax}} = \text{feed intake} / WG_{\text{climax}}$$

- Feed conversion ratio of froglets (FCR_{froglets})

$$FCR_{\text{froglets}} = \text{feed intake} / WG_{\text{froglets}}$$

- Protein efficiency ratio of tadpoles at the climax of metamorphosis (PER_{climax})

$$PER_{\text{climax}} = WG_{\text{climax}} / \text{protein intake}$$

- Protein efficiency ratio of froglets (PER_{froglets})

$$PER_{\text{froglets}} = WG_{\text{froglets}} / \text{protein intake}$$

3.2.7 Biochemical analyses

In the metamorphosis tank, twenty-four animals from each treatment were collected after completing metamorphosis. Eight animals were selected in three different periods (May, June, and July), to avoid possible interference of time on the evaluated parameters.

The animals were euthanized by an overdose of eugenol (84.8 mg mL^{-1}). Twelve froglets were used for whole body biochemistry analyses, while the other twelve animals were used to determine biological indexes (viscerosomatic, hepatosomatic and liposomatic indexes). After euthanasia, the froglets were placed on a dry, clean cloth to remove excess liquid and then macerated individually in a ceramic mortar with a pestle until a homogeneous product was obtained. The macerated product of each froglet was identified and stored individually, in 15 mL falcon tubes and frozen at -20°C .

Subsequently, the tubes were thawed at room temperature and the macerated materials were individually weighed. For each weighed sample, milli-Q water was added in equal proportion to the sample weight (1:1). The material was then homogenized and transferred to 50 mL falcon tubes, which were centrifuged for 6 min. at a g-force of 8664 g (10,000 rpm and centrifuge radius of 6.5 cm) (Thermo Scientific® Heraeus Megafuge 16R), to separate solid material from body fluids. Afterwards, the supernatant was collected and transferred to 2 mL microtubes and centrifuged again (Spinlab® model SL-5 AM) for 6 min. at a g-force of 7267 g (10,000 rpm and centrifuge radius of 7.75 cm) for complete separation of the solids from liquid material. The liquid part was collected

again, which was transferred to new 2 mL microtubes, which were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent biochemical analyses.

The supernatant liquid resulting from the technique was used to determine glucose (mg dL^{-1}), total proteins (g dL^{-1}), albumin (g dL^{-1}), lactate (mg dL^{-1}), triglycerides (mg dL^{-1}), cholesterol (mg dL^{-1}), alanine aminotransferase (U dL^{-1}), aspartate aminotransferase (U dL^{-1}) and urea (mg dL^{-1}), analyzed using commercial kits for biochemical determination (Bioclin[®]). The globulins (g dL^{-1}) were determined based on the difference between total proteins and albumin, and the albumin:globulins ratio (A:G) was also performed.

3.2.8 Biological indexes

Twelve froglets, recently metamorphosed per treatment, were weighed, measured and, after being euthanized by an overdose of eugenol (84.8 mg mL^{-1}), they were dissected to remove the viscera, which were weighed to determine the viscerosomatic index. Then, the liver and body fat were separated, which were individually weighed to determine the hepatosomatic and liposomatic index respectively.

- Viscerosomatic index – VSI (%):

$$\text{VSI (\%)} = (\text{viscera weight live weight}) \times 100$$

- Hepatosomatic index – HSI (%):

$$\text{HSI (\%)} = (\text{liver weight live weight}) \times 100$$

- Liposomatic index – LSI (%):

$$\text{LSI (\%)} = (\text{fat body weight live weight}) \times 100$$

3.2.9 Statistical analysis

To calculate the time estimates for each phase (total metamorphosis time, time between the beginning of the experiment and the metamorphic climax and time between the metamorphic climax and the completion of metamorphosis) and survival, the animals were monitored individually, recording the beginning and end of each phase for each individual and the moment of mortality, respectively. These data were analyzed using the Kaplan-Meier non-parametric estimator (Colosimo and Giolo, 2006). This technique calculates the probability of an event occurring (in this case, completing each of the phases or death) over time for each treatment (tank color white, blue or black). Logrank test was used to compare the curves of estimated transformation time and survival (Colosimo and Giolo, 2006). Chi-square test was used to analyze the distribution of animals in each category of Etkin's classification (Etkin, 1966).

Linear regression models were fitted for over time for each treatment (tank color white, blue or black). The goodness of fit of regression models was evaluated by residual analysis and coefficient of determination (R^2) (Agresti, 2015). The method of weighted least squares was used for fitted models of final weight, weight gain, length, length gain, specific growth rate, and feed conversion of tadpole since unequal variance were observed over the time for these variables. The feed intake model was adjusted by the ordinary least squares and weighted least squares method and by mixed models considering the tank as a random effect, however for none of these models the adjustment was adequate.

To compare body size uniformity between treatments, an individual measurement of body weight was made in 25 tadpole per tank at 0, 14, 28, 42 and 56 days (125 individuals per treatment in each time), due to the inconsistent number of animals in the treatments, which changed due to the transformation of the animals at 70, 84, 98 and 108 days, the number of animals evaluated was corrected (159, 130, 86, 46 in individuals per treatment respectively), and 109 froglets. The homogeneity of variance was tested by Levene test and F-test (with Bonferroni correction for multiple-comparison).

The normality and homogeneity of variance (assumptions of ANOVA) were tested by Shapiro-Wilk test and Levene test, respectively, for variables of growth performance (weight gain, length gain; protein efficiency rate, feed conversion, specific growth rate and feed consumption per tadpole), whole body biochemistry parameters and biological indices. When assumptions of ANOVA were met, the data was subjected to ANOVA followed by Tukey's test ($CV < 10\%$), Student–Newman–Keuls (SNK) test (CV from 10% to 15%) or Duncan test ($CV > 15\%$). For data that did not follow a normal distribution and/or homogeneity of variance, we used the Kruskal–Wallis nonparametric test.

For the skin color of tadpoles in metamorphic climax and froglets, the $L^*a^*b^*$ coordinate information of the four measured points was tabulated, and the median values were used to calculate the average color for each individual. Subsequently, treatment averages were computed. As the treatment means did not exhibit normality and/or homoscedasticity, the Kruskal-Wallis non-parametric test was performed.

The results were analyzed using the 'R' software (R Core Team, 2022) and survival (Therneau, 2022), survminer (Kassambara et al., 2021), Tidyverse (Wickham et al., 2019), Car (Fox and Weisberg, 2019), grid Extra (Auguie, 2017) and ResourceSelection packages (Lele et al., 2019). For all statistical analysis, differences were considered significant at $P < 0.05$.

3.3. Results

3.3.1 Effect of tank color on metamorphosis

The color of the tank affected the total metamorphosis time of the tadpoles. Tadpoles in blue and black tanks tend to complete metamorphosis in a shorter time than tadpoles raised in white tanks (Fig. 4A).

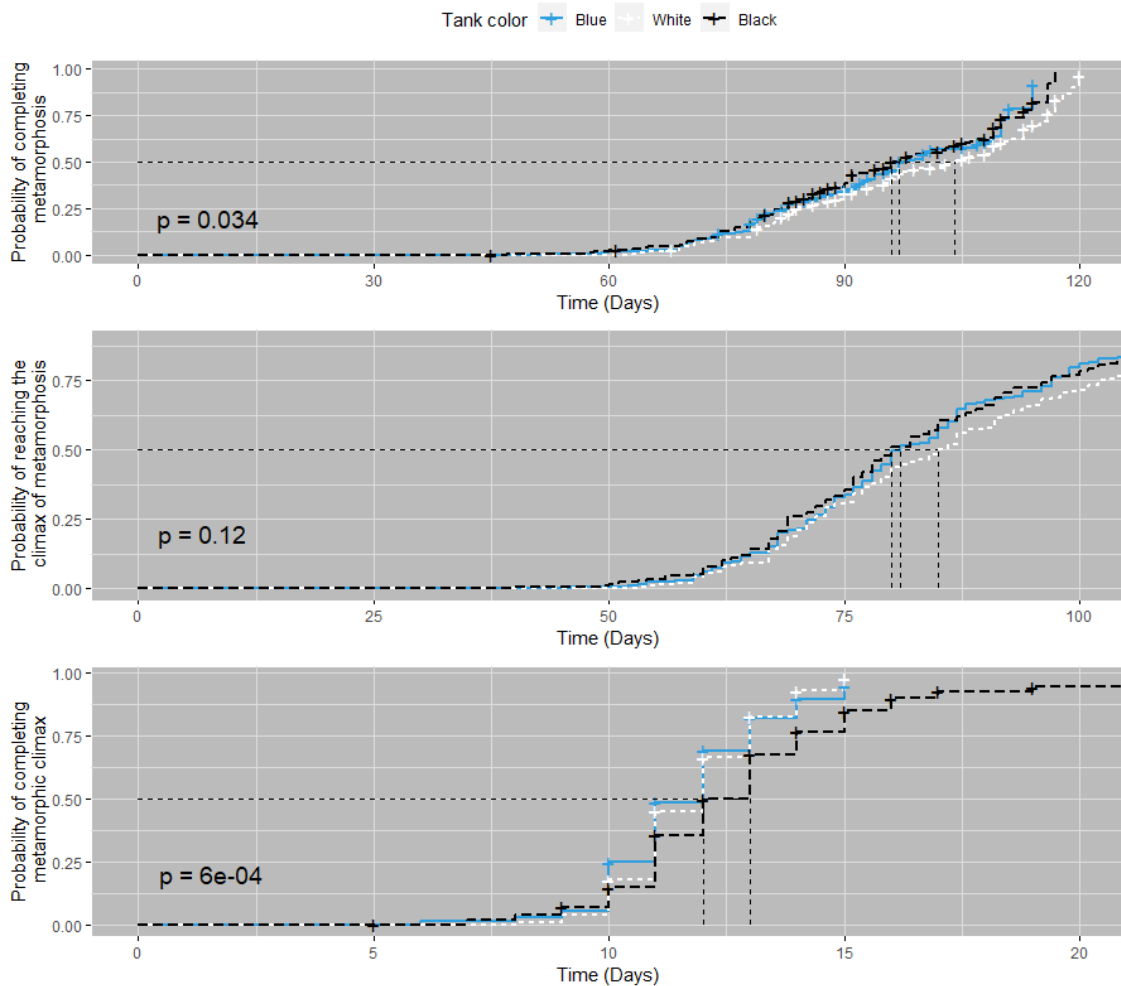


Figure 4. Probability of transformation in American bullfrog tadpoles raised in different colors tanks occurrence over time estimated by Kaplan-Maier and compared by the Logrank test.

A – represents the probability of a treatment completing the metamorphosis; B – represents the probability of a treatment reaching the metamorphic climax; C – represents the probability of a treatment completing metamorphosis from the metamorphic climax.

Considering only the time to reach the metamorphic climax, the color of the tank did not have a significant effect on the transformation (Fig. 4B). As for the time to

complete the metamorphic climax, animals kept in black tanks had a longer time to complete this period, when compared to those kept in white and blue tanks (Fig. 4C).

Regarding the proportion of animals per category, according to Etkin's (1966) classification, the color of the tanks did not significantly affect ($P > 0.05$) the proportions of the animals in metamorphosis phases at any of the evaluation times. Throughout the experimental period, a greater proportion of tadpoles were observed in the pre-metamorphosis stage, up to the 42nd day of evaluation. On the 56th and 70th days of evaluation, there was a greater proportion of tadpoles in the pro-metamorphosis phase. Greater proportions of tadpoles at the climax of metamorphosis were demonstrated on the 84th, 98th, 108th and 120th days of evaluation (Fig. 5).

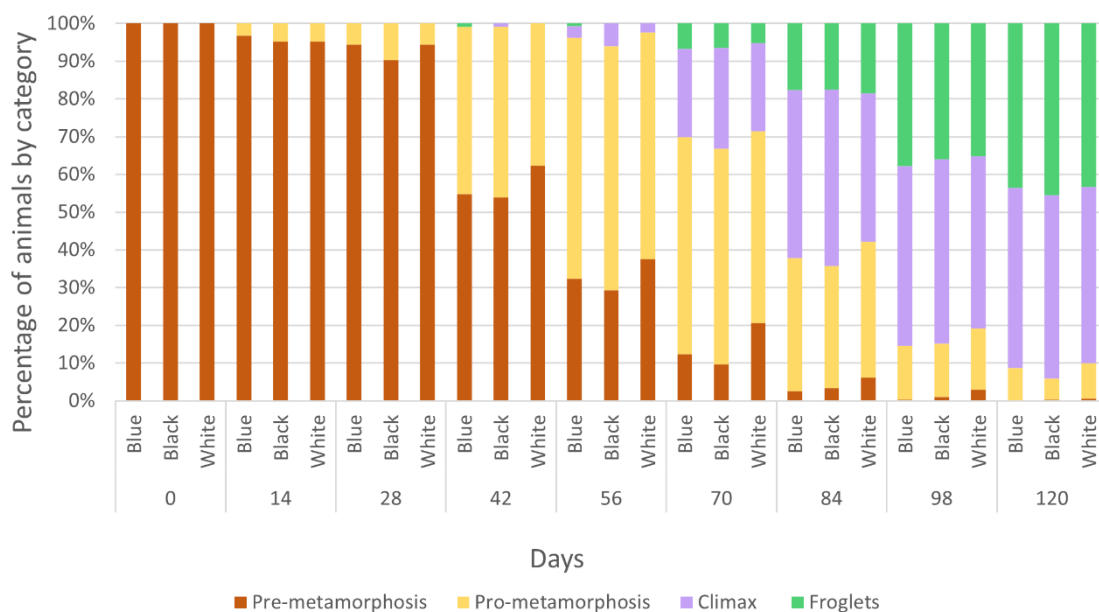


Figure 5. Proportion of American bullfrog tadpoles and froglets phases according to Etkin's classification (Etkin, 1966) throughout the experiment.

The categories distribution did not differ between treatments according to the chi-square test ($P > 0.05$).

3.3.2 Growth performance of pre- and pro-metamorphic tadpoles

At the end of the experiment, there was no effect of tank color on animal survival ($P > 0.05$). Mean survival was 96.5 ± 4.1 ; 98.0 ± 3.2 ; and 99.5 ± 1.1 , for animals raised in black, blue, and white tanks, respectively.

Tadpoles reared in white tanks showed lower values for final weight, weight gain, feed conversion ratio and protein efficiency ratio ($P < 0.05$) compared to those tadpoles raised in black and blue tanks (Figs. 6 and 7). Animals raised at blue tanks showed the highest values for final weight ($P < 0.05$).

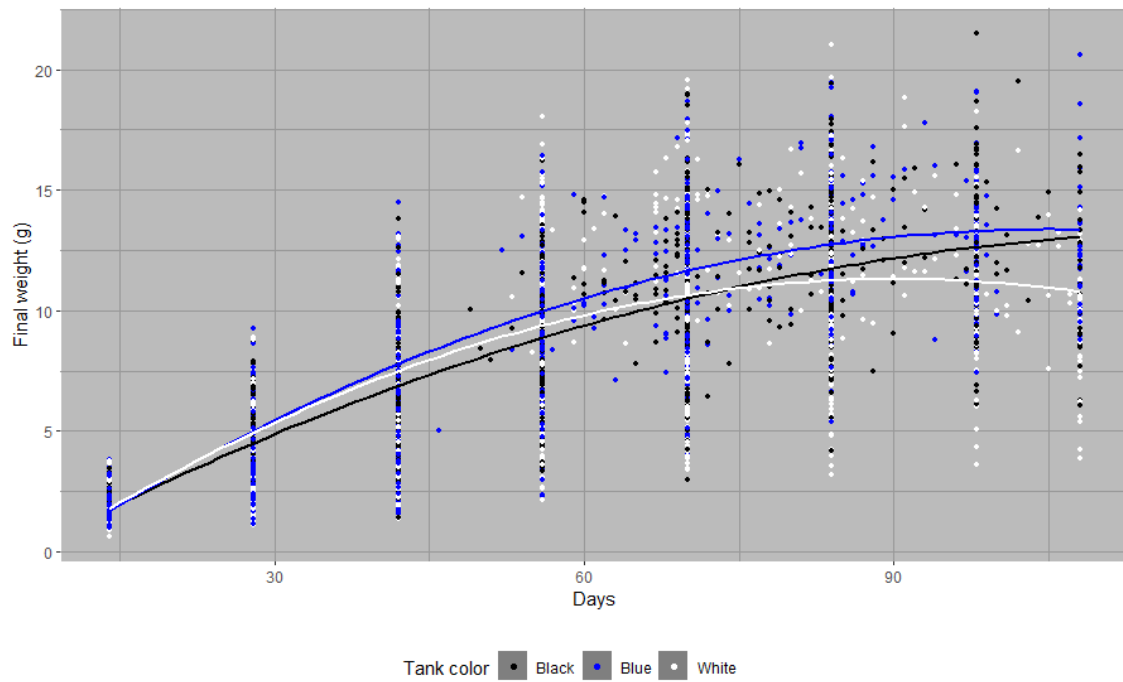


Figure 6. Final weight (g) of American bullfrog tadpoles raised for 108 days in blue, white and black tanks.

Regression model: Final weight = $-2.19 + 0.30 \cdot \text{Day} - 0.001 \cdot \text{Day}^2 + 0.47 \cdot \text{White} + 0.23 \cdot \text{Black} - 0.02 \cdot \text{Day} \cdot \text{White} - 0.01 \cdot \text{Day} \cdot \text{Black}$ $R^2 = 0.898$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Final length and length gain were also affected by the treatment ($P < 0.05$). Tadpoles raised in white and black tanks showed lower values compared to those raised in blue tanks (Fig. 7).

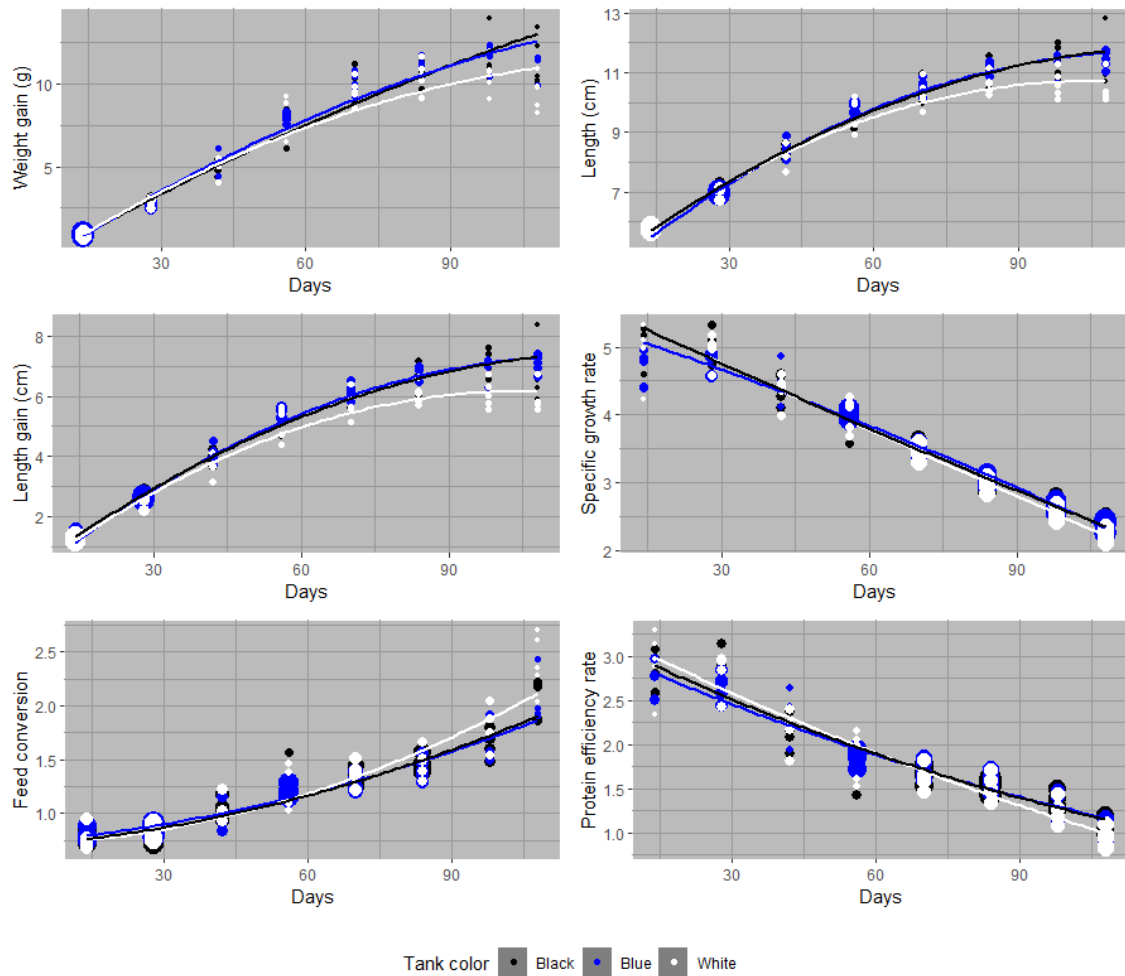


Figure 7. Weight gain (g), length (cm) and length gain (cm), specific growth rate ($\% \cdot \text{day}^{-1}$), feed conversion ratio and protein efficiency ratio, of American bullfrog tadpoles raised in blue, white and black tanks.

Regression model: Weight gain = $-1.77+0.19 \cdot \text{Day}-0.0005 \cdot \text{Day}^2+0.30 \cdot \text{White}-0.01 \cdot \text{Day} \cdot \text{White}$ $R^2 = 0.975$.

Length = $3.73+0.13 \cdot \text{Day}-0.0006 \cdot \text{Day}^2+0.39 \cdot \text{White}+0.23 \cdot \text{Black}-0.01 \cdot \text{Day} \cdot \text{White}$ $R^2 = 0.984$.

Length gain = $-0.64+0.13 \cdot \text{Day}-0.0006 \cdot \text{Day}^2+0.22 \cdot \text{White}+0.19 \cdot \text{Black}-0.01 \cdot \text{Day} \cdot \text{White}$ $R^2 = 0.985$.

Specific growth rate = $5.68-0.03 \cdot \text{Day}-0.09 \cdot \text{White}$ $R^2 = 0.969$.

Feed conversion ratio = $0.74+0.00007 \cdot \text{Day}^2-0.12 \cdot \text{White}+0.002 \cdot \text{Day} \cdot \text{White}$ $R^2 = 0.901$.

Protein efficiency ratio = $3.14-0.02 \cdot \text{Day}+0.00005 \cdot \text{Day}^2+0.25 \cdot \text{White}-0.003 \cdot \text{Day} \cdot \text{White}$ $R^2 = 0.905$.

(For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

As expected, the average final weight, weight gain, final length, length gain, and feed conversion ratio increased over the time of the experiment, while the specific growth rate and protein efficiency ratio decreased ($P < 0.05$; Figs. 6 and 7).

The interaction of treatment and biometry significantly affected ($P < 0.05$) the final weight (Fig. 6), weight gain, final length, length gain, feed conversion ratio and protein efficiency ratio of tadpoles grown in white tanks throughout pre- and pro-metamorphic development (Fig. 7).

The color of the tank affected the uniformity of tadpole weights ($P < 0.05$). Tadpoles raised in white tanks showed greater weight variation on days 14, 42, 56, 70 and 98 of the experiment (Fig. 8), while tadpoles raised in black, and blue tanks, showed better uniformity.

3.3.3 Growth performance of tadpoles in metamorphic climaxes and froglets and biological indexes of froglets

Tank color did not affect ($P > 0.05$) the survival rate of the tadpoles at the climax of metamorphosis until froglet transformation. There was no mortality at this stage. The final weight, final length, weight gain, length gain, feed conversion ratio, protein efficiency ratio and specific growth rate of tadpoles at the climax of metamorphosis and froglets also was not affected by the tank color ($P > 0.05$; Table 1).

There was also no effect of the treatment ($P > 0.05$) on the uniformity of the tadpoles in metamorphic climax and froglets (Fig. 9).

The color of the tank also did not affect ($P > 0.05$) the hepatosomatic (HSI), liposomatic (LSI) and viscerosomatic (VSI) indexes of bullfrog froglets (Table 2).

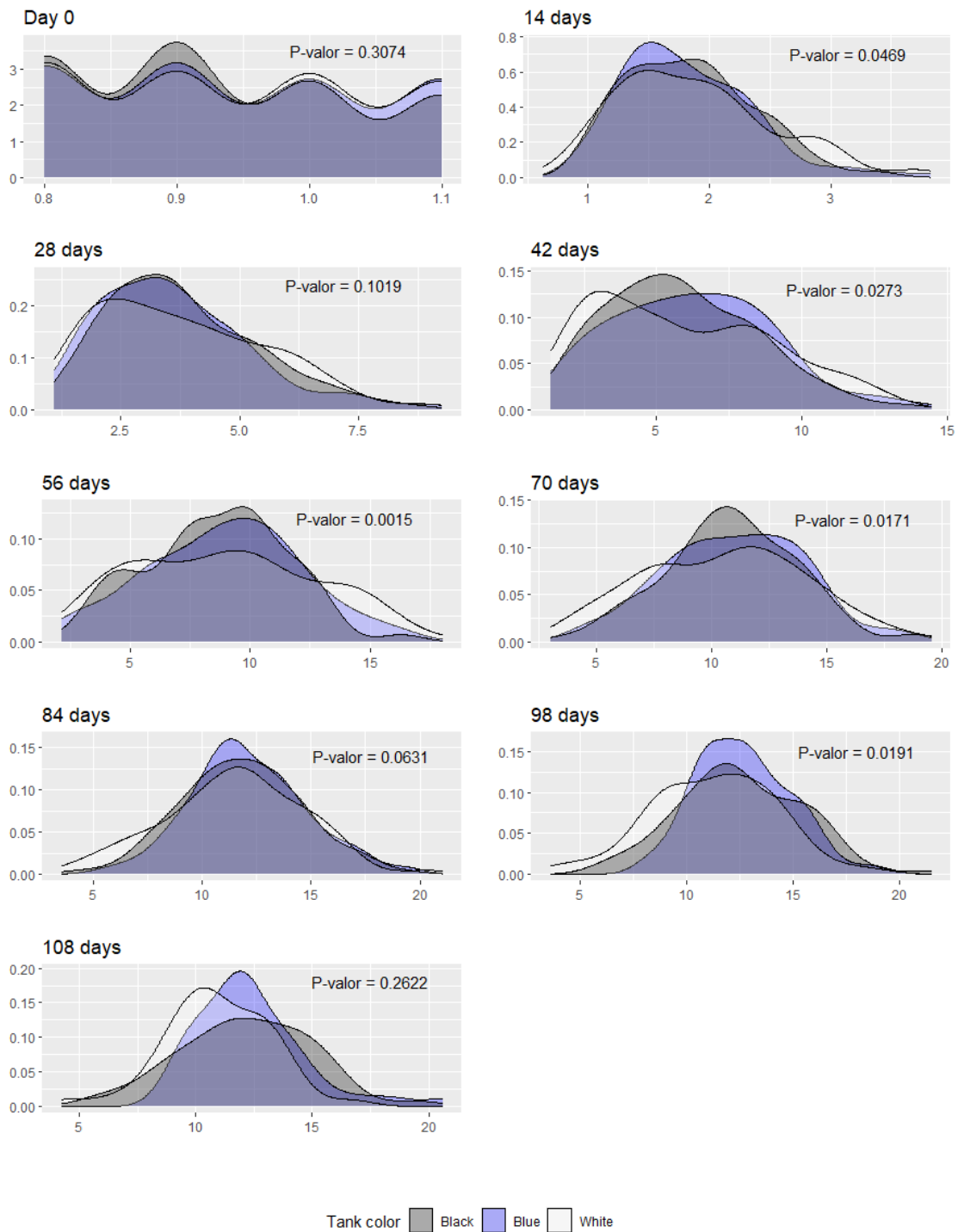


Figure 8. Weight distribution of American bullfrog tadpoles (including metamorphic climax tadpoles) raised in blue, white and black tanks throughout the experimental period.

The P-value refers to the Levene test, which compares the variances between treatments. P-value < 0.05 indicates a significant difference in variances between treatments. Standard deviation of weight of different treatments during biometrics: 0 Days: Black – 0.108, Blue – 0.112, White – 0.112; 14 Days: Black - 0.524, Blue - 0.540, White - 0.650; 28 Days: Black - 1.57, Blue - 1.60, White - 1.78; 42 Days: Black - 2.56, Blue

- 2.75, White - 3.08; 56 Days: Black - 2.90, Blue - 3.22, White - 3.83; 70 Days: Black - 2.91, Blue - 3.04, White - 3.60; 84 Days: Black - 2.78, Blue - 2.66, White - 3.23; 98 Days: Black - 2.92, Blue - 2.23, White - 2.94; 108 Days: Black - 2.81, Blue - 2.42, White - 2.28. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

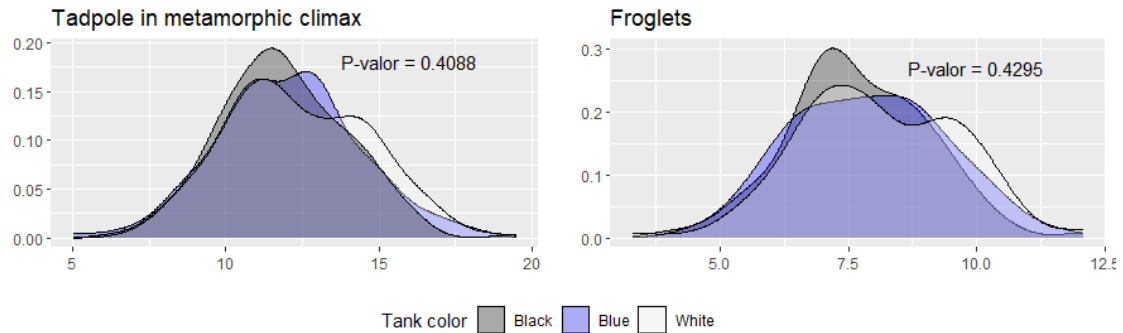


Figure 9. Weight distribution of American bullfrog tadpoles in metamorphic climaxes and froglets raised in black, blue, and white tanks.

Standard deviation of tadpole weight at metamorphic climax by treatment: Black – 1.40; Blue – 1.49; White– 1.59. Standard deviation of froglets weight by treatment: Black – 2.11; Blue – 2.31; White – 2.31. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Table 1. Growth performance of Bullfrogs tadpoles raised in three different color environments during metamorphic climax and froglets phase.

Tadpoles at metamorphic climax				
	Blue	White	Black	<i>P-value</i>
SR (%)	94.28 ± 5.35 ^a	97.68 ± 2.40 ^a	94.86 ± 1.27 ^a	0.2988 ²
W (g)	12.04 ± 0.69 ^a	12.35 ± 0.75 ^a	11.88 ± 0.37 ^a	0.4962 ¹
L (cm)	3.44 ± 0.05 ^a	3.45 ± 0.07 ^a	3.4 ± 0.03 ^a	0.2907 ¹
WG (g)	11.09 ± 0.71 ^a	11.41 ± 0.75 ^a	10.94 ± 0.36 ^a	0.5145 ¹
FCR	2.06 ± 0.16 ^a	1.98 ± 0.14 ^a	2.12 ± 0.09 ^a	0.3050 ¹
PER	1.08 ± 0.08 ^a	1.12 ± 0.08 ^a	1.05 ± 0.04 ^a	0.2977 ¹
SGR _{climax}	3.11 ± 0.03 ^a	3.11 ± 0.03 ^a	3.14 ± 0.02 ^a	0.3400 ¹
Froglets				
	Blue	White	Black	<i>P-value</i>
W (g)	7.95 ± 0.59 ^a	8.08 ± 0.44 ^a	7.70 ± 0.29 ^a	0.4219 ¹
L (cm)	3.47 ± 0.08 ^a	3.54 ± 0.09 ^a	3.47 ± 0.06 ^a	0.3396 ¹
WG (g)	7.00 ± 0.60 ^a	7.14 ± 0.44 ^a	6.77 ± 0.28 ^a	0.3296 ²
FCR	3.27 ± 0.31 ^a	3.17 ± 0.21 ^a	3.43 ± 0.19 ^a	0.2767 ¹

PER	0.68 ± 0.07 ^a	0.7 ± 0.05 ^a	0.65 ± 0.04 ^a	0.2981 ¹
SGR _{frogllets}	2.44 ± 0.04 ^a	2.43 ± 0.03 ^a	2.46 ± 0.02 ^a	0.2808 ²

SR (%) = Survival rate; W (g) = Weight; L (cm) = Length; WG (g) = weight gain; FC = Food conversion rate; PER = Protein efficiency rate and SGR = Specific growth rate. Different letters on the same line indicate significant difference ($P < 0.05$) between treatments during the corresponding period. Values are expressed as mean ± standard deviation.

¹Tukey, ²Kruskal-Wallis

Table 2. Biological indexes of Bullfrogs froglets raised in blue, white, and black tanks.

	Blue	White	Black	<i>P</i> -value
HSI	5.26 ± 0.73 ^a	4.65 ± 0.66 ^a	4.98 ± 0.57 ^a	0.0873 ²
LSI	6.76 ± 1.32 ^a	6.82 ± 0.75 ^a	6.88 ± 1.11 ^a	0.9645 ³
VSI	18.24 ± 1.18 ^a	18.28 ± 1.67 ^a	17.33 ± 1.09 ^a	0.1625 ¹

HSI = Hepatosomatic Index; LSI = Liposomatic Index and VSI = Viscerosomatic Index. Equal letters on the same line indicate that there is no significant difference ($P > 0.05$) between treatments during the corresponding period. Values are expressed as mean ± standard deviation.

¹Tukey, ²SNK e ³Duncan

3.3.4 Effect of tank color on skin coloration of tadpoles in metamorphic climax and froglets

Visual observation of skin color indicated a difference between animals from tanks of different colors (Fig. 10). In fact, the treatment influenced the color of the animals ($P < 0.05$), the average L* coordinate (Fig. 11A) were higher for the tadpoles in metamorphic climaxes raised in blue, and black tanks, indicating that the animals in those tanks are darker in relation to those raised in white tanks. For the a* coordinate (Fig. 11B), animals raised in black tanks had lower values compare to other treatments, whereas in b* coordinate (Fig. 11C) all the treatments differed from each other, with black presenting the lowest values. Thus, the a* and b* coordinates values of the black treatment were also influenced by the darker tones, resulting in tones closer to green and blue, respectively.



Figure 10. Skin color difference in American bullfrog tadpoles and froglets coloration reared in black, blue, and white tanks.

A = Metamorphic climax tadpoles raised in black tanks (1), blue tanks (2) and white tanks (3). B = Froglets from tadpoles raised in black (1), blue (2) and white (3) tanks. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Considering froglets, the treatments also influenced the skin color of the animals. As for tadpoles in metamorphic climax, froglets raised in black, and blue tanks presented lower values for L^* (Fig. 11D), compared to animals raised in white tanks, indicating that animals raised in black tanks and blue tanks had darker skin compared to those raised in white tanks. As for the b^* (Fig. 11F), the black treatment had the lowest values, differing from the white treatment. The froglets from the black tanks presented skin tones closer to the blue tone, while the froglets from the white tanks presented tones closer to the yellow. The blue treatment presented an intermediate result, not differing from white or black for

b^* coordinate. The a^* coordinate (Fig.11E) showed no difference between treatments ($P > 0.05$).

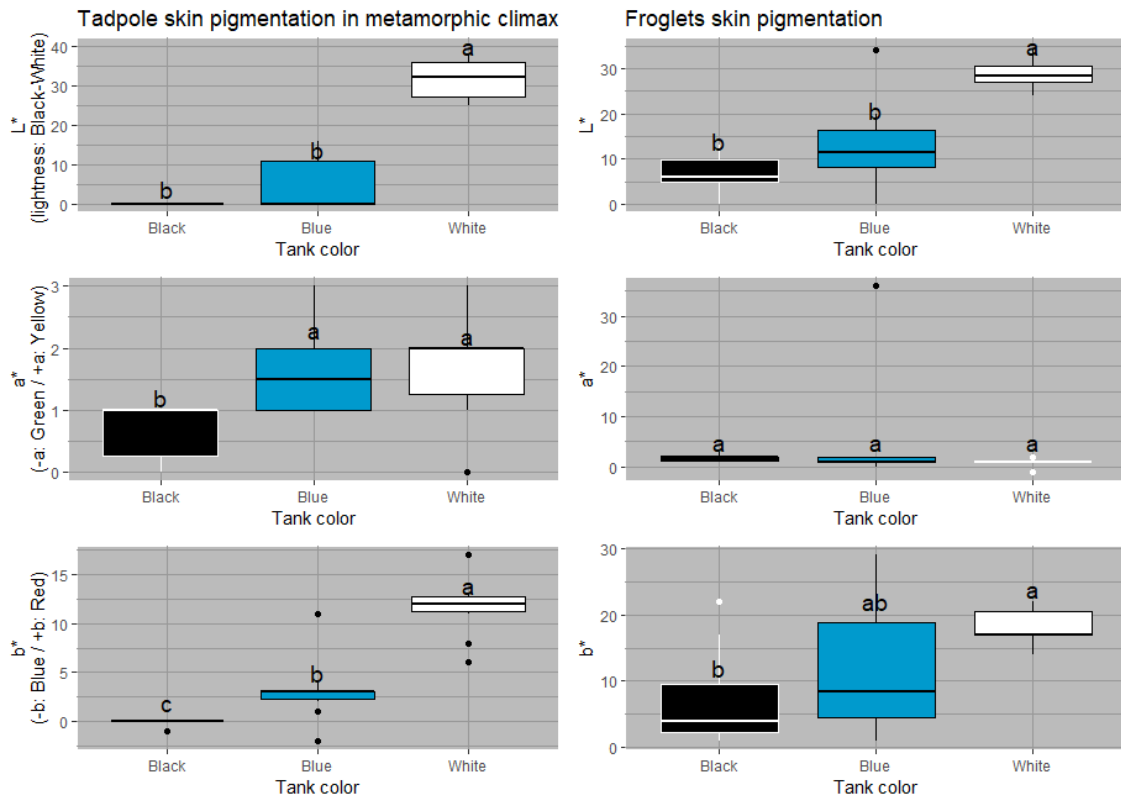


Figure 11. L*a*b* coordinates of skin coloration of American bullfrog tadpoles in metamorphic climax (A, B and C) and froglets (D, E and F).

Different letters on the same figure indicate that there is significant difference between treatments ($P < 0.05$).

3.3.5 Biochemistry of whole-body macerate

The color of the tanks did not affect ($P > 0.05$) the levels of glucose, total proteins, albumin, globulins, albumin: globulins ratio, cholesterol, triglycerides, lactate, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and urea, evaluated in the whole-body macerate of bullfrog froglets (Table 3).

Table 3. Biochemical parameters of whole-body macerate of Bullfrog froglets reared in tanks of different colors.

Biochemical parameter	Blue	White	Black	P-value
Glucose (mg dL ⁻¹)	260.43 ± 62.69 ^a	266.81 ± 44.08 ^a	257.85 ± 56.83 ^a	0.9195 ¹
Total proteins (g dL ⁻¹)	1.35 ± 0.36 ^a	1.36 ± 0.21 ^a	1.33 ± 0.33 ^a	0.9271 ²
Albumin (g dL ⁻¹)	0.90 ± 0.30 ^a	0.81 ± 0.33 ^a	0.85 ± 0.34 ^a	0.7272 ²
Globulins (g dL ⁻¹)	0.50 ± 0.09 ^a	0.55 ± 0.44 ^a	0.49 ± 0.16 ^a	0.7689 ²
A:G	1.74 ± 0.52 ^a	2.53 ± 2.15 ^a	1.82 ± 1.05 ^a	0.8666 ²

Cholesterol (mg dL ⁻¹)	13.67 ± 8.10 ^a	11.58 ± 3.75 ^a	12.72 ± 4.18 ^a	0.9339 ²
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	601.18 ± 156.53 ^a	533.00 ± 139.64 ^a	597.46 ± 159.58 ^a	0.6023 ²
Lactate (mg dL ⁻¹)	118.20 ± 32.79 ^a	107.19 ± 15.96 ^a	112.23 ± 18.96 ^a	0.7032 ²
ALT (U dL ⁻¹)	0.33 ± 0.00 ^a	0.33 ± 0.00 ^a	0.33 ± 0.00 ^a	0.1912 ²
AST (U dL ⁻¹)	0.32 ± 0.00 ^a	0.32 ± 0.00 ^a	0.32 ± 0.00 ^a	0.5977 ²
Urea (mg dL ⁻¹)	31.96 ± 7.78 ^a	32.85 ± 7.30 ^a	30.57 ± 4.34 ^a	0.8370 ²

A:G = Albumin: Globulin Ratio, ALT = Alanine Aminotransferase and AST = Aspartate Aminotransferase. Equal letters on the same line indicate that there is no significant difference ($P > 0.05$) between treatments during the corresponding period. Values are expressed as mean ± standard deviation.

¹Tukey, ²KruskalWallis

3.4. Discussion

Tadpoles are more vulnerable than adults to predation due to their small size and relative lack of mobility (Duellman and Trueb, 1994). Therefore, amphibians adopt different strategies to increase the probability of survival, one of which is to accelerate or delay the process of metamorphosis. According to Denver (1997b), the advance or delay in metamorphosis time is influenced by genetic factors, innate to the species, and environmental factors. Variation in population density, decrease in water volume where these animals live, risk of predation and food availability are examples of environmental factors widely experienced by these organisms. However, depending on the development stage, the same environmental factor can have different effects. The factor can be inhibitory to growth and metamorphosis, if it is acting at the beginning of this phase, as well as stimulatory, if it acts at the end of metamorphosis (Denver et al., 2002).

Within this context, the delay in the metamorphosis time of tadpoles kept in white tanks is possibly related to the heterogeneous growth evident in this environment. According to Wilbur and Collins (1973), competition for food in the tadpole stage can be fierce due to the high energy demand to meet the accelerated growth rate at this stage of the amphibian's life. Furthermore, according to these authors, for meta morphosis to be possible, there is a minimum size to be reached by the tadpoles, with growth rates determining the completion of this process. In this way, the easy visualization of food in the white tanks may have increased competition for the resource, favoring the dominant (larger) tadpoles to find and consume more food than the submissive (smaller) tadpoles, which favored an increase in heterogeneity, resulting in metamorphosis of larger individuals. Therefore, as the number of tadpoles removed from the white tanks increased, when they reached the metamorphic climax, there was a decrease in growth (weight and

length) and nutrient use efficiency (increased feed conversion ratio and decreased protein efficiency ratio) of the remaining tadpoles (tadpoles in pre-metamorphosis and pro-metamorphosis phases). On the other hand, the uniformity of the tadpoles raised in the blue and black tanks was greater, and the removal of tadpoles at metamorphic climax did not affect the growth performance of remaining tadpoles, in pre-metamorphosis and pro-metamorphosis phases. A quadratic growth of tadpoles can be seen until the final measurement. Therefore, the growth performance of the animals (at the climax of metamorphosis and in the froglet phase) was similar in the three colors of tanks evaluated, since the largest tadpoles are normally the first to reach the climax of meta morphosis and, consequently, were removed from the tanks to complete the metamorphosis in the metamorphosis tanks, and no longer considered in the evaluation of tadpole's performance after that. A study with *Rana temporaria* tadpoles also demonstrated an increase in heterogeneity in growth, length, and weight, as well as in metamorphosis time when the specimens were exposed to white monochromatic light (Ruchin, 2003). The authors demonstrated that *R. temporaria* tadpoles exposed to shortwave lighting, such as blue and green, had a decrease in growth heterogeneity, as well as a significant acceleration in meta morphosis time and growth.

Therefore, considering the productive aspect, the heterogeneity in growth and the reduced growth performance of bullfrog tadpoles raised in white tanks, would result in a longer time for froglets to leave the rearing pens, which would certainly impact negatively in the storage of these animals in pens and optimization of production. So, the difference in the transformation duration compromises the uniformity of the final of froglets, which can increase cannibalism during this phase (Alves et al., 2020), if screenings by size are not carried out frequently.

Although tadpoles kept in black and blue tanks completed meta morphosis earlier than those in white tanks, it was possible to observe a delay in the period between the metamorphic climax and the froglet phase in animals raised in black tanks. A study with *Xenopus laevis* tadpoles demonstrated that the preference for the color of the environment changes according to the stage of development (Moriya et al., 1996). For these authors, tadpoles of this species showed a preference for the color white, in the initial stages of development, during pre-metamorphosis, while animals at the climax of metamorphosis preferred to remain in an environment with a black background. Wei et al. (2023) demonstrated that post-metamorphic specimens of *Rana dybowskii* preferred the color black, both during the day and at night, regardless of the availability of food in this

environment. It is important to note that during the metamorphic climax period, tadpoles do not feed, maintaining their energy requirements through the reabsorption of nutrients from the tail and triglycerides from the fat body, representing a critical moment in the lives of these animals (Wright et al., 2011). At this stage, these animals are still more susceptible to predators, as they are going through a transition in their lives, generally showing reduced mobility. Therefore, in the present study, it is very likely that the bull frog tadpoles, during the climax of metamorphosis, felt less exposed in the black tanks, due to the lower light in this environment, which allowed the metamorphic climax to be completed later than other treatments. On the other hand, maintaining the tadpoles in metamorphic climax in the white and blue tanks accelerated the completion of the metamorphosis process, probably because these animals were in an environment with greater light, which consequently left them more exposed.

Skin color change in tadpoles at the climax of metamorphosis and in froglets matched that of tank color. For adaptation to the environment, plasticity in skin color tone in tadpoles is notable and has been frequently reported, ranging from seasonal changes in phenotypes to almost instantaneous changes (Liedtke et al., 2023).

According to Thornton (1971), skin darkening is promoted by increases in circulating melanophore-stimulating hormone (MSH). Furthermore, according to the same authors, the darkening of animals' skin is faster than lightening. According to Garcia and Sih (2003), species that depend on crypsis camouflage can reduce the risk of predation by bringing their tone closer to the environment. However, in the present study, even in view of the lightening of tadpoles in metamorphic climax and froglets in white tanks, the perception of these animals in the environment was always more evident. A study on *Hyla arborea* demonstrated that tadpoles raised in white tanks had greater locomotor activity because they felt more exposed, as they were more easily visible due to the contrast between the color of the tadpoles and the light background (Mirć et al., 2023). Liedtke et al. (2023) also found that specimens of *X. laevis* raised for months in a light background environment remain noticeable, despite adjustments to skin color. Furthermore, according to these authors, adults of *X. laevis* showed increased locomotion behavior, increased corticosterone levels and decreased body weight when raised in white background.

In the present study, a decrease in tadpole performance was also found in the pre- and pro-metamorphosis stages, as well as greater observation of the swimming activity of tadpoles in white tanks. However, corticosterone levels and swimming behavior of

bullfrog tadpoles have not been determined. The possible effects of environment color on bullfrog homeostasis were verified on secondary stress responses. However, according to biochemistry analyses, the color of the environment did not change these variables. It is important to highlight that the biochemistry analyses were carried out on specimens of froglets that completed metamorphosis, and not on tadpoles. This was to avoid a possible interference of the metamorphosis phase on glucocorticoid levels since these hormones increase at the end of the metamorphosis process. Therefore, it is possible that the analyses were carried out on animals that were fully acclimatized to the color of the tank in which they were raised, which may have mitigated the responses to a possible action of the color of the environment as a stressor. Furthermore, the fact that the sampling was carried out on froglets, which were normally the dominant animals that came out of the tadpole tanks, may have contributed to the fact that no difference was detected in the biochemistry analyses.

3.5. Conclusions

During commercial bullfrog farming it would be advantageous to reduce time to metamorphosis to obtain froglets. Animals reared in blue tanks concluded their transformation in a shorter timeframe than those raised in black and white tanks. Although there was no apparent tank color-related growth benefit between colors, size uniformity was closer in the blue and black tanks. Accordingly, from the results of this study blue tanks represent the color of choice from a production perspective.

Acknowledgements

We would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brazil) and the Company Quibasa-Bioclin for donating biochemistry analysis kits.

References

- Agresti, A., 2015. Foundations of Linear and Generalized Linear Models. John Wiley & Sons.
- Alves, A. X., Lana, M., Matos, H. C., Pawlowski, V. R., Azevedo, R. O., Brabo, M. F., Capelo, D. A. V., Veras, G. C., 2020. Daily frequency of water changes in flooded pens during initial bullfrog rearing. *Aquaculture*. v. 528, p. 735555. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735555>.
- Auguie, B., 2017. gridExtra: Miscellaneous Functions for “Grid” Graphics. R Package Version 2.3. <https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra>.
- Boaventura, T. P., Pedras, P. P. C., Santos, F. A. C., Ferreira, A. L., Favero, G. C., Palheta, G. D. A., Luz, R. K., 2021. Cultivation of juvenile *Colossoma macropomum* in different colored tanks in recirculating aquaculture system (RAS): effects on performance, metabolism and skin pigmentation. *Aquaculture*. v. 532, p. 736079. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736079>.
- Colosimo, E. A and Giolo, S. R., 2006. Análise de sobrevivência aplicada. São Paulo. Editora Blucher.
- Costa, D. C., Mattioli, C. C., Silva, W. S., Takata, R., Leme, F. O. P., Oliveira, A. L., Luz, R. K., 2017. The effect of environmental colour on the growth, metabolism, physiology and skin pigmentation of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*. *J. Fish Biol.* v. 90, n. 3, p. 922-935. <https://doi.org/10.1111/jfb.13208>.
- Denver, R. J., Boorse, G. C., & Glennemeier, K. A., 2002. Endocrinology of complex life cycles: Amphibians. In A. A. D. Pfaff, A. Etgen, S. Fahrbach, R. Moss & R. Rubin (Eds.), *Hormones, brain and behavior* (pp. 469–513). San Diego, CA: Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012532104-4/50030-5>.

Denver, R. J., 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Am. Zool.* v. 37, n. 2, p. 172-184. <https://doi.org/10.1093/icb/37.2.172>.

Duellman, W and Trueb, L., 1994. *Biology of Amphibians*. JHU press.

Elnwshy, N., Sabri, D., & Nwonwu, F., 2012. The effect of difference in environmental colours on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production efficiency. *Int. J. Ag Biol.* v. 14, n. 4.

Eterovick, P. C., Mendes, I. S., Kloh, J. S., Pinheiro, L. T., Václav, A. B. H. P., Santos, T., Gontijo, A. S. B., 2018. Tadpoles respond to background colour under threat. *Sci. Rep.* v. 8, n. 1, p. 4085. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22315-8>.

Etkin, W. 1966. How a tadpole becomes a frog. *Sci. Amer.* v. 214, n. 5, p. 76-91.

FAO (Food and Agriculture Organization), 2021. *Global Aquaculture Production 1950–2018*. Fishery Statistical Collection.

FAO (Food and Agriculture Organization), 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation* (Rome).

Ferosekhan, S., Sahoo, S. K., Radhakrishnan, K., Velmurugan, P., Shamna, N., Giri, S. S., Pillai, B. R., 2020. Influence of rearing tank colour on Asian catfish, magur (*Clarias magur*) and pangas (*Pangasius pangasius*) larval growth and survival. *Aquaculture* v. 521, p. 735080. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735080>.

Fox, J and Weisberg, S., 2019. *An {R} Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA. URL: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>.

Garcia, T. S and Sih, A., 2003. Color change and color-dependent behavior in response to predation risk in the salamander sister species *Ambystoma barbouri* and *Ambystoma texanum*. *Oecologia*. v. 137, p. 131-139. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1314-4>.

Gosner, K. L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. v. 16, n. 3, p. 183-190. <http://www.jstor.org/stable/3890061>

Graves, A. E., Dias, J. E., & Michaels, C. J., 2023. Effects of Background Color on Stress-Linked Behavior in the Critically Endangered Lake Oku Clawed Frog (*Xenopus longipes*). *Journal of Zoological and Botanical Gardens*. v. 4, n. 1, p. 99-107. <https://doi.org/10.3390/jzbg4010011>.

Hilken G, Dimigen J, Iglauer F., 1994. Growth of *Xenopus laevis* under different laboratory rearing conditions. *Lab Anim*. v. 29, n. 2, p. 152-162. <https://doi.org/10.1258/002367795780740276>.

Holmes, A. M., Emmans, C. J., Jones, N., Coleman, R., Smith, T. E., Hosie, C. A., 2016. Impact of tank background on the welfare of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Daudin). *Appl. Anim. Behv. Sci.* v. 185, p. 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.09.005>.

Jaeger, R. G., and Hailman, J. P., 1976. Ontogenetic shift of spectral phototactic preferences in anuran tadpoles. *J. Comp. Physiol. Psychol.* v. 90, n. 10, p. 930, 1976. <https://doi.org/10.1037/h0077275>.

Jegede, T., 2011. Effects of colour on growth of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1757) fingerlings. *Int. J. Biochem. Sci.* v. 5, n. 1. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v5i1.68116>.

Kassambara A., Kosinski M., Biecek P., 2021. `_survminer`: Drawing Survival Curves using `ggplot2`. R package version 0.4.9, <<https://CRAN.R-project.org/package=survminer>>.

Lele, S. R., Keim, J. L., Solymos, P., 2019. `ResourceSelection`: Resource Selection (Probability) Functions for Use-Availability Data. R Package Version 0, pp. 3–5. <https://CRAN.R-project.org/package=ResourceSelection>.

Liedtke, H. C., K. Lopez-Hervas., I. Galván., N. Polo-Cavia., I. Gomez-Mestre., 2023. Background matching through fast and reversible melanin-based pigmentation plasticity in tadpoles comes with morphological and antioxidant changes. *Scientific Reports* v. 13, n. 1, p. 12064. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39107-4>.

Lima, S. L., Casali, A. P., Agostinho, C. A., 2003. Desempenho zootecnico e tabela de alimentação de girinos de ra-touro (*Rana catesbeiana*) criados no sistema anfigranja. *Rev. Bras. Zootec.* v. 32, p. 512-518. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982003000300002>.

McLean, E., 2021. Fish tank color: an overview. *Aquaculture*. v. 530, p. 735750. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735750>.

McLean, E., Cotter, P., Claire, T., King, N., 2008. Tank color impacts performance of cultured fish. *Ribarstvo*. v. 66, n. 2, p. 43-54.

Mirč, M., Vukov, T., Kijanović, A., Kolarov, N. T., 2023. Effects of background color on pigmentation, morphological traits, and behavior in the European tree frog (*Hyla arborea*, *Hylidae*, *Anura*) tadpoles. *Contrib. Zool.* v. 92, n. 2, p. 112-129. <https://doi.org/10.1163/18759866-bja10040>.

Moriya, T., Kito, K., Miyashita, Y., Asami, K., 1996. Preference for background color of the *Xenopus laevis* tadpole. *J. Exp. Zool.* v. 276, n. 5, p. 335-344.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19961201\)276:5<335::AID-JEZ4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19961201)276:5<335::AID-JEZ4>3.0.CO;2-P).

Opiyo, M. A., Ngugi, C. C., Rasowo, J., 2014. Combined effects of stocking density and background colour on growth performance and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in aquaria. J. Fish. Sci. v. 8, n. 3, p. 228. <https://doi.org/10.3153/jfscom.201429>.

Pedreira, M.M., Sipaúba-Tavares, L.H., 2001. Effect of light green and dark brown colored tanks on survival rates and development of tambaqui larvae, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae). Acta Sci. 23 (2), 521–525.

R Core Team, 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Ravindranath, R., Periasamy, A. P., Roy, P., Chen, Y. W., Chang, H. T., 2018. Smart appbased on-field colorimetric quantification of mercury via analyte-induced enhancement of the photocatalytic activity of TiO₂–Au nanospheres. Anal. Bioanal. Chem. v. 410, p. 4555-4564. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1114-7>.

Ruchin, A. B., 2003. Effect of monochromatic light on the growth and development of brown frog (*Rana temporaria*) larvae. Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences. v. 30, p. 482-484. <https://doi.org/10.1023/A:1025898519474>.

Therneau, T., 2022. A Package for Survival Analysis in R. R Package Version 3.40. <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.

Thornton, V. F., 1971. The effect of change of background color on the melanocyte stimulating hormone content of the pituitary of *Xenopus laevis*. Gen. Comp. Endocr. v. 17, n. 3, p. 554-560. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(71\)90189-4](https://doi.org/10.1016/0016-6480(71)90189-4).

Volpato, G.L., Duarte, C.R.A., Luchiari, A.C., 2004. Environmental color affects Nile tilapia reproduction. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 479–483. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000400004>.

Wei, H., Geng, L., Shang, X., Hu, G., Luan, P., Xu, W., 2023. Background color preference of Amphibian *Rana dybowskii*. *Applied Animal Behaviour Science*. v. 268, p. 106079. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2023.106079>.

Wente, W.H., Phillips, J.B., 2005. Microhabitat selection by the Pacific treefrog, *Hylaregilla*. *Anim. Behav.* 70 (2), 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.10.029>.

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L.D., François, R., Yutani, H., 2019. Welcome to the tidyverse. *J. Open Source Softw.* 4 (43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>.

Wilbur, H. M., and Collins, J. P., 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*. v. 182, n. 4119, p. 1305-1314. <https://doi.org/10.1126/science.182.4119.1305>.

Wright, M. L., Richardson, S. E. and Bigos, J. M., 2011. The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: changes in mass, histology, and melatonin content and effect of food deprivation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* v. 160, n. 4, p. 498-503. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.08.010>.

Yovanovich, C. A. M., Koskela, S. M., Nevala, N., Kondrashev, S. L., Kelber, A., Donner K., 2017. The dual rod system of amphibians supports colour discrimination at the absolute visual threshold. *Phil Trans R Soc B*. v. 372, n. 1717, p. 20160066. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0066>.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preferência sobre a coloração do ambiente pelos anfíbios anuros é espécie específica, baseando em vários aspectos da vida do animal, como habitat, hábitos alimentares e comportamentais. Conforme os resultados gerados por esta tese, foi comprovado a influência da cor do tanque de criação no desempenho, cor da pele, uniformidade e tempo de metamorfose dos girinos de rã-touro americana (*Aquarana catesbeiana*). No presente estudo, girinos de rã-touro criados em tanques azuis apresentaram os melhores resultados.

Resultados como os observados, colaboram para o entendimento das preferências desta espécie, garantindo melhores condições de bem-estar animal nos ambientes de produção. Embora não tenha sido encontrado efeito da cor do tanque sobre as análises da bioquímica de corpo inteiro, os melhores resultados de desempenho de crescimento observados nos animais criados em tanques azuis evidenciam as melhores condições ambientais para o desenvolvimento da espécie. Além disso, os resultados de melhor uniformidade de lote e menor tempo de metamorfose são pontos de partida para futuras pesquisas com o objetivo aprimorar a produção de lotes mais homogêneos de imagos.

Uma hipótese que surgiu quanto a ausência de diferença estatística nas análises de bioquímica de corpo inteiro, é que as variáveis somente foram avaliadas nos imagos recém transformados, mas não nos girinos pré-metamórficos, pró-metamórficos ou em clímax metamórfico, resultados estes que podem ser diferentes e devem ser estudados em pesquisas futuras. Um exemplo deste efeito é o resultado encontrado quanto ao tempo de metamorfose dos girinos criados em tanques brancos e em tanques pretos. Os girinos mantidos em tanques brancos tiveram tempo mais prolongado para atingir o clímax metamórfico que os girinos criados em tanques pretos, no entanto, no período de conclusão do clímax metamórfico, os girinos criados em tanques pretos apresentaram maior tempo em comparação aos mantidos em tanques brancos.

Destaca-se ainda a importância de realização de futuras pesquisas que investiguem o impacto de outros aspectos do ambiente de criação no desenvolvimento, uniformidade e na metamorfose de girinos de rã-touro, uma vez que o entendimento de como a metamorfose pode ser influenciada por estes fatores é fundamental para a elaboração de estratégias capazes de aprimorar a ranicultura.