

## **Eficácia da hipoxantina-3-N-óxido como método alternativo na proteção da ictiofauna em usinas hidrelétricas**

### **Efficacy of hypoxanthine-3-N-oxide as an alternative method to protect ichthyofauna in hydroelectric power plants**

DOI: 10.34188/bjaerv6n2-013

Recebimento dos originais: 05/01/2023

Aceitação para publicação: 31/03/2023

#### **Wllyane Silva Figueiredo**

Mestra em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural pela Universidade de Brasília, Faculdade UnB Planaltina

Instituição: Universidade de Brasília / Vínculo acadêmico  
Endereço: Vila Nossa Sra. de Fátima, Brasília – DF, Brasil  
E-mail: wllyane@gmail.com

#### **Tania Machado da Silva**

Mestra em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural pela Universidade de Brasília, Faculdade UnB Planaltina

Instituição: Universidade de Brasília / Vínculo acadêmico  
Endereço: Vila Nossa Sra. de Fátima, Brasília – DF, Brasil  
E-mail: taniamachado91@gmail.com

#### **Edilene Cristina Pereira Sargentini**

Mestra em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia pela Universidade do Estado do Amazonas

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia\_INPA / Local de trabalho  
Endereço: Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus – AM, Brasil  
E-mail: sargentinedilene@gmail.com

#### **Marcos Alexandre Bolson**

Mestre em Ciências pela Universidade de São Paulo  
Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia\_INPA / Local de trabalho  
Endereço: Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus – AM, Brasil  
E-mail: mabolson@gmail.com

#### **Gilmar Martins Pereira**

Mestre em Química pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho\_UNESP.  
Instituição: Venturo Análises Ambientais / Local de trabalho  
Endereço: Rua Castro Alves, 1036, Vila Bela Vista, Araraquara – SP, Brasil  
E-mail: mpgilmar2@gmail.com

#### **Caio Prior Rocha**

Mestre em Filosofia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho\_UNESP.  
Instituição: Venturo Consultoria Ambiental / Local de trabalho  
Endereço: Rua Castro Alves, 1036, Jardim dos Ipês, Araraquara – SP, Brasil  
E-mail: caiopriorrocha98@gmail.com

#### **Ézio Sargentini Junior**

Doutor em Química Analítica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho\_UNESP.  
Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia\_INPA / Local de trabalho  
Endereço: Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus – AM, Brasil  
E-mail: eziosargentini@gmail.com

## RESUMO

As substâncias de alarme, liberadas após danos às células epidérmicas de peixes, é um dos sinais mais eficientes no grupo *Osteriophysan*, isto é, 72% das espécies de água doce. A hipoxantina-3-*N*-óxido é indicada como um dos possíveis componentes ativos dessas substâncias. Ensaios foram feitos com as espécies Matrinxã e Tambaqui através de aquários com capacidade de 100 L, instrumentalizados com sistemas de introdução de amostra e aquisição de imagens de forma remota. Os resultados indicaram na concentração de  $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$  alterações comportamentais incomuns como letargia, forrageio para o fundo e ataques, que apoiam a premissa de que a hipoxantina-3-*N*-óxido é eficaz na indução de sinais de alarme. A hipoxantina pode ser futuramente um bom método de manejo para proteção da ictiofauna, sobretudo no setor hidrelétrico, por ter eficácia comprovada, ser uma substância sintética, comercial e não tóxica à biota e ao ambiente aquático.

**Palavras-chave:** alterações comportamentais, células epidérmicas, resposta repulsiva, substâncias de alarme.

## ABSTRACT

Alarm substances, released after damage to fish epidermal cells, is one of the most effective signals in the *Osteriophysan* group, which represents 72% of freshwater species. Hypoxanthine-3-*N*-oxide is indicated as one of the possible active components of these substances. Tests were conducted with the species Matrinxã and Tambaqui using 100 L capacity aquariums, instrumented with sample introduction and remote imaging systems. The results indicated at the concentration of  $6.0 \mu\text{g L}^{-1}$  unusual behavioral changes such as lethargy, bottom foraging and seizures, which support the premise that hypoxanthine-3-*N*-oxide is effective in inducing alarm signals. Hypoxanthine may in the future be a good management method for protecting ichthyofauna, especially in the hydropower sector, because it has proven efficacy, is a synthetic, commercial, and non-toxic substance to biota and the aquatic environment.

**Keywords:** behavioral changes, epidermal cells, repulsive response, alarm substances.

## 1 INTRODUÇÃO

A comunicação química na ictiofauna pode ser intencional quando, por exemplo, fêmeas estimulam os machos para reprodução, liberando feromônios na água; ou acidental quando lesões na pele de peixes danificam células “club”, as quais eliminam substâncias que provocam comportamentos de alerta ou fuga em outros peixes [1]. Essas substâncias foram inicialmente denominadas como “Schreckstoff”, em alemão [2]. Atualmente essa substância também é conhecida como “Scary stuff” em inglês, e “Substância do medo” ou “Substância de alarme”, em português [1].

A composição das substâncias de alarme ainda está sendo estudada pela ciência, contudo estudos sugerem a presença da hipoxantina-3-*N*-óxido [3]-[5]. Os principais comportamentos decorrentes da exposição do peixe a essa substância são busca por abrigo, formação de cardumes, natação rápida e imobilidade [4].

A capacidade de um indivíduo detectar e responder à substância de alarme e/ou à hipoxantina-3-*N*-óxido, aumenta a probabilidade de evitar a predação, sendo um importante fator

no processo evolutivo [1]. A adaptação de metodologias eficazes no comportamento anti-predador de peixes com uso da hipoxantina-3-N-óxido pode ser promissora na proteção da ictiofauna.

Embora a maioria dos estudos com tais substâncias se restrinjam a algumas espécies e tenham sido analisadas apenas em laboratório, existem conclusões muito similares quando testadas em ambiente natural [5].

Em usinas hidrelétricas muitas espécies de peixes, sobretudo as migradoras, concentram-se em suas proximidades. Ocasionalmente, as unidades geradoras demandam revisões técnicas e/ou manutenções, onde a vazão turbinada é reduzida a zero, e os peixes presentes no canal de fuga podem entrar no tubo de sucção, na caixa espiral ou no poço de esgotamento. Essa situação demanda procedimentos complexos, devido às questões de segurança dos trabalhadores que adentram nas áreas de risco e ao tempo de confinamento até o resgate eficiente dos peixes [6].

Soluções construtivas e novas regras de operação têm sido amplamente empregadas em diversas usinas hidrelétricas, contudo é de grande interesse o desenvolvimento de novos métodos [6]. A hipoxantina-3-N-óxido é uma candidata promissora na repulsão de peixes, e alguns estudos comprovaram sua eficiência [3], [4], [7], [8]. Além disso, a hipoxantina é facilmente adquirida e manuseada, além de não ser um método perigoso ou invasivo aos peixes [5].

## 2 OBJETIVO

Avaliação em ambiente controlado da eficiência da hipoxantina-3-N-óxido, como substância de alarme, analisando a alteração comportamental das espécies Matrinxã e Tambaqui.

## 3 METODOLOGIA

### Sistema remoto para análises comportamentais de peixes

Para avaliar o efeito da hipoxantina-3-N-óxido no comportamento dos peixes foram utilizados 3 aquários com as dimensões 20x30x200 cm (LxAxC). Todos eram equipados com sistemas circulação de água, oxigenação, injeção e dispersão de amostra líquida. Além disso, um sistema de monitoramento remoto através de capturas de imagens com 3 câmeras foi instalado em uma estrutura de perfil de alumínio, a qual pode ser acoplado sobre cada aquário. As câmeras foram dispostas em formato “V”, ou seja, a câmera central é oposta às câmeras das extremidades de forma a se evitar ficar fora do ponto de captura e/ou sobreposição de imagem. Um software também foi desenvolvido para detectar e registrar a posição do(s) peixe(s) no aquário, bem como controlar a introdução da hipoxantina-3-N-óxido. O software utilizou linguagem computacional *C# (C Sharp)*, fazendo uso das funcionalidades da biblioteca *open source* de visão computacional *OpenCvSharp*.

## Protocolo experimental

As espécies juvenis Matrinxã (*Brycon cephalus*) e Tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram adquiridas comercialmente e mantidas num tanque de armazenamento de fibra de vidro aerado com volume de 5.000 L. Os peixes foram alimentados com ração comercial e expostos ao fotoperíodo natural de 12/12 horas e temperatura média de  $26 \pm 1$  °C até completa aclimatização dos indivíduos (60 dias).

A água dos aquários, foi ajustada para pH 7,5 com a adição de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) [4], [5], sendo previamente transferida cerca de 20% (V/V) da água do tanque de armazenamento.

Os peixes aclimatizaram nos aquários experimentais por 18 horas em jejum. No momento dos ensaios a oxigenação do sistema foi interrompida e o fluxo de água foi ajustada para  $1,7 \text{ L min}^{-1}$ . Após 20 minutos iniciais do experimento foi injetada a solução de hipoxantina-3-*N*-óxido por 2 min, sendo na sequência o fluxo de água cessado durante 20 minutos, resultando no tempo total de filmagem do experimento de 40 minutos.

## Padrões comportamentais

Para avaliar a eficiência da hipoxantina-3-*N*-óxido foi elaborado um etograma a partir das referências [2], [7], [9], considerando os comportamentos agrupamento, natação rápida e imobilidade.

## Análises estatísticas

Os resultados dos ensaios foram classificados com a presença ou ausência da hipoxantina-3-*N*-óxido considerando os comportamentos descritos no etograma (imobilidade, natação rápida e agrupamento) e as diferentes áreas dos aquários: Setor 1 – região próxima da injeção, Setor 2 – região intermediária e Setor 3: região distante da injeção.

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste *Shapiro-Wilk*, para verificar a normalidade, sendo o valor  $\alpha$  adotado para o nível de significância de 0,05 (5%).

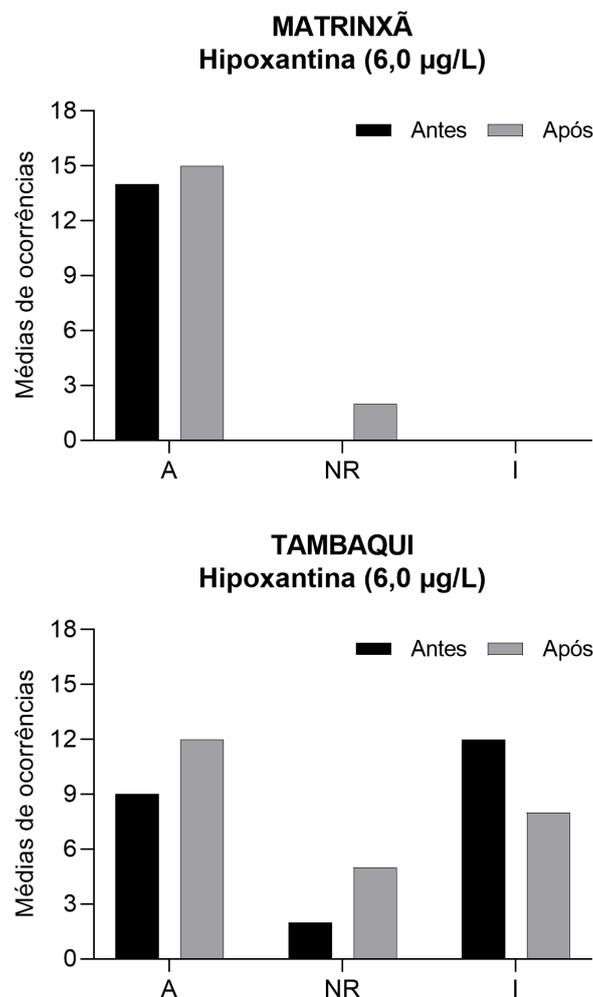
Quando os dados não apresentam significância na normalidade ( $p > 0,05$ ), aplicou-se a análise de variância (*ANOVA/MANOVA*), avaliando se determinada conjectura sobre um parâmetro é verdadeira, considerando duas hipóteses, a nula ( $H_0$ ) e a hipótese alternativa ( $H_1$ ). A  $H_0$  refere-se à afirmação considerada como verdadeira em relação a um determinado parâmetro. Quanto a  $H_1$ , trata-se daquela que se deseja testar, sendo ela aceita caso a  $H_0$  seja rejeitada. No caso aqui apresentado, a  $H_1$  infere pela diferença significativa antes e após aplicar a hipoxantina-3-*N*-óxido para cada comportamento e considerando as várias áreas do aquário. Todavia, quando os dados apresentaram significância na normalidade ( $p < 0,05$ ), aplicou-se a análise de variância multivariada

*Kruskal-Wallis*, que compara duas ou mais populações contínuas e independentes. Assim como a ANOVA, o *Kruskal-Wallis* considera duas hipóteses, a nula ( $H_0$ ) e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) [10].

#### 4 RESULTADOS

Foram feitos 18 ensaios com as espécies *Brycon cephalus* e *Colossoma macropomum*, totalizando 12 horas de filmagens. As análises de variâncias não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para todos os comportamentos em ambas as espécies. Entretanto, para ambas as espécies houve maior ocorrência de agrupamento e natação rápida após aplicação da hipoxantina-3-*N*-óxido na concentração de  $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 1).

Figura 1. Médias de ocorrências dos comportamentos antes (preto) e após (cinza) aplicação da hipoxantina-3-*N*-óxido, na concentração de  $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , para as espécies Matrinxã e Tambaqui. A – Agrupamento; NR – Natação rápida; I – Imobilidade.



Fonte: própria autoria.

Essas respostas comportamentais não diferiram daquelas eliciadas pelo extrato de pele intraespecífico. Foi identificada natação rápida seguida de imobilidade na espécie Matrinxã (*Brycon cephalus*) na concentração de  $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$  [11]. Com uso de metodologia similar aos autores anteriores, comprovou-se a percepção ao extrato de pele e o aumento da atividade natatória foi o comportamento mais acentuado no Lambari (*Astyanax bimaculatus*), espécie muito comum no Brasil [12]. Sabe-se que o extrato de pele de *Notropis cornutus*, espécie da América do Norte, aumentou o agrupamento e a busca por abrigo em intraespecíficos [13].

O matrinxã e o tambaqui, semelhantes a outras espécies pertencentes ao grupo Ostariophysi, tendem a formar cardumes em situações de risco [5]. O agrupamento permite o forrageio, aumentando a percepção de predadores e, conseqüentemente, diminui as oportunidades dos indivíduos serem predados por estarem muito coesos [12].

A natação rápida pode ser interpretada como uma conduta comum no ambiente natural quando peixes se sentem ameaçados por alguma situação [5].

A natação lenta foi outro comportamento observado para as duas espécies. Na natação lenta o movimento é cerca de  $0,5 \text{ cm s}^{-1}$ , para tanto, a barbatana caudal do peixe fica imóvel. Este é um comportamento que muitas espécies exibem em situações de elevado estresse [5].

Nos experimentos foram observados 1 episódio de ataque entre os peixes da espécie Matrinxã e 2 episódios de ataques da espécie Tambaqui. O comportamento “ataque” se deu quando um ou mais peixes realizavam agressão ou eram vitimados, seguido ou não de uma curta perseguição. A referência [12] também observou que os peixes exibiram esse comportamento, característico de medo e ansiedade, após estarem na presença de predadores.

A comunicação química deve ser vantajosa para o emissor, receptor ou para ambos. Caso contrário, o estímulo emitido tende a se extinguir com o processo evolutivo das espécies. As respostas à hipoxantina-3-*N*-óxido para as espécies matrinxã e tambaqui no presente estudo reforçam as afirmações de que respostas de alarme interespecíficas são eficientes e frequentes tais como as respostas intraespecíficas [14].

Tanto para o matrinxã quanto para o tambaqui também não foram encontradas respostas ao uso das áreas dos aquários (Setor 1, Setor 2 e Setor 3) (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Entretanto, nos experimentos foram observadas aproximações seguidas por evasões de indivíduos ou grupos na área mais próxima de aplicação da  $\text{H}_3\text{NO}$ , sendo para Matrinxã cerca de 10 e para Tambaqui cerca de 7 eventos. Apesar dos aquários serem extensos, o confinamento dos peixes pode ter contribuído para esse resultado. A falta de um canal de fuga pode ter obrigado os peixes a retornarem à fonte de aplicação da hipoxantina repetidas vezes.

A hipoxantina pode ser facilmente adquirida comercialmente e não há dados que comprovem malefícios à sanidade dos peixes e/ou do ambiente [5].

As questões ambientais são de grande importância no setor hidrelétrico, visto que a sustentabilidade tem caracterizado este setor frente a outras formas de geração de energia elétrica. A utilização de novos métodos de repulsão ou de condicionamento dos peixes é essencial e muito almejado nesse setor. A  $H_3NO$  é uma alternativa promissora, integrante de soluções e melhorias práticas de proteção da ictiofauna durante a operação e manutenção de usinas hidrelétricas. Contudo, mais estudos com as espécies Matrinxã e Tambaqui, bem como com outras espécies nativas do Brasil, necessitam ser amplamente estudadas.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados preliminares desse estudo em aquários demonstraram que as espécies Matrinxã e Tambaqui apresentaram evidências incomuns, como natação lenta, forrageio para o fundo dos aquários e ataques entre os peixes, confirmam a percepção da  $H_3NO$  e provavelmente incômodos para ambas as espécies.

A hipoxantina pode ser futuramente um bom método de manejo para proteção da ictiofauna, sobretudo no setor hidrelétrico, por ter eficácia comprovada em outros estudos, ser uma substância sintética, comercial e não tóxica à biota e ao ambiente aquático. Contudo, estudos mais aprofundados em aquários e no ambiente com espécies nativas e com diferentes condições ambientais e concentrações são imprescindíveis, pois o ambiente natural é complexo e muito dinâmico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos os envolvidos no Programa de P&D da Energia Sustentável do Brasil (ANEEL/PD-06631-0009/2019) e à equipe da Jirau Energia, que tem fornecido todo o apoio necessário para o desenvolvimento da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- [1] VOLPATO, G.L.; CASTRO, A.L.S.; FREITAS, E.G.; GIAQUINTO, P.C.; CASTILHO, M.F.; SILVA, E.M.P.; JORDÃO, L.C. Comunicação Química em Peixes. In *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*, 1nd ed. vol. I, Ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, pp. 15-52, 2006. URL: [file:///C:/Users/wllya/Dropbox/PC%20\(2\)/Downloads/CapComunicaoQuimica%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/wllya/Dropbox/PC%20(2)/Downloads/CapComunicaoQuimica%20(3).pdf).
- [2] FRISCH, K. Von. Zur Psychologie des Fisch-Schwarmes. *Naturwissenschaften*, vol. 26, pp. 601-606, 1938. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01590598>.
- [3] PFEIFFER, W.; RIEGELBAUER, G.; MEIER, G.; SCHEIBLER, B. Effect of hypoxanthine-3(N)-oxide and hypoxanthine-1(N)-oxide on central nervous excitation of the black tetra *Gymnocorymbus ternetzi* (characidae, ostariophysi, pisces) indicated by dorsal light response. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 11, pp. 507-523, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00989562>.
- [4] BROWN, G.E.; ADRIAN Jr, J.C.; SMYTH, E.; LEET, H.; BRENNAN, S. Ostariophysan alarm pheromones: Laboratory and field tests of the functional significance of nitrogen oxides," *Journal of Chemical Ecology*, vol. 26, pp. 139-154, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1005445629144>.
- [5] PARRA, K.V.; ADRIAN, JR J.C.; GERLAI, R. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, vol. 205, pp. 336-341, 2009. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.06.037.
- [6] COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS. *Avaliação de Risco de Morte de Peixes em Usinas Hidrelétrica*, vol. V. Belo Horizonte: Cemig, 2016, p. 26-27. URL: [https://www.cemig.com.br/wp-content/uploads/2020/07/Serie-Peixe-Vivo-vol5-PEIXES\\_E\\_HIDRELETRICAS-e-book.pdf](https://www.cemig.com.br/wp-content/uploads/2020/07/Serie-Peixe-Vivo-vol5-PEIXES_E_HIDRELETRICAS-e-book.pdf).
- [7] BROWN, G.E.; ADRIAN, J.C.; SHIH Jr, E.M.L. Behavioural responses of fathead minnows to hypoxanthine-3-N-oxide at varying concentrations. *Journal of Fish Biology*, vol. 58, pp. 1465-1470, 2001. DOI: 10.1006/jfbi.2000.1541.
- [8] CHIVERS, D.P.; WISENDEN, B.D.; HINDMAN, C.J.; MICHALAK, T.A.; KUSCH, R.C.; KAMINSKYJ, S.G.W.; JACK, K.L.; FERRARI, M.C.O.; POLLOCK, R.J.; HALBGEWACHS, C.F.; POLLOCK, M.S.; ALEMADI, S.; JAMES, C.T.; SAVALOJA, R.K.; GOATER, C.P.; CORWIN, A.; MIRZA, R.S. Kiesecker, J. M.; Brown, G. E.; Adrian Jr, J. C.; Krone, P. H.; Blaustein, A. R.; Mathis, A. Epidermal 'alarm substance' cells of fishes maintained by non-alarm functions: possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 274, pp. 2611-2619, 2007. DOI: 10.1098/rspb.2007.0709.
- [9] LAWRENCE B.J.; SMITH, R.J.F. Behavioral response of solitary fathead minnows *Pimephales promelas*, to alarm substance. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 15, pp. 209-219, 1989. DOI: 10.1007/BF02027783.

[10] LOPES, M.M.; BRANCO, V.T.F.C.; SOARES, J.B. Utilização dos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificação da normalidade para materiais de pavimentação. *Transportes*, vol. 21, pp. 59-66, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4237/transportes.v21i1.566>.

[11] IDE, L.M.; URBINATI, E.C.; HOFFMANN, A. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. *Journal of Fish Biology*, vol. 63, pp. 332-343, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00152.x>.

[12] GOULART, V.D.L.R. Importância da química de alarme no comportamento antipredatório do lambari, *Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758 - (Pisces: Characidae). Ph.D. dissertation, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. URL: [http://www.biblioteca.pucminas.br/teses/Zoologia\\_GoulartVD\\_1.pdf](http://www.biblioteca.pucminas.br/teses/Zoologia_GoulartVD_1.pdf).

[13] HECZKO, E. J.; SEGHERS, B. H. Effects of alarm substance on schooling in the common shiner (*Notropis cornutus*, Cyprinidae). *Environmental Biology of Fishes*, vol. 6, pp. 25-29, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00001796>

[14] SMITH, R.J.F. Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, vol. 2, pp. 33-63, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00042916>.