

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Análises cromatográficas e parâmetros hematológicos  
de tilápia, *Oreochromis niloticus*, anestesiadas com  
eugenol em condições laboratoriais e de transporte**

Marina Carvalho Delbon

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani de Paiva

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Agosto de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Análises cromatográficas e parâmetros hematológicos  
de tilápia, *Oreochromis niloticus*, anestesiadas com  
eugenol em condições laboratoriais e de transporte**

Marina Carvalho Delbon

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani de Paiva

Tese apresentada ao  
Centro de Aquicultura da  
Unesp, sediado no Campus  
de Jaboticabal, como parte  
das exigências para  
obtenção do Título de  
Doutor em Aquicultura.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Agosto de 2010

## **DEDICATÓRIA**

Ofereço e dedico este trabalho aos meus pais

Aryovaldo e Maria Irene

e a minha irmã e avó

Camila e Irene,

Pelo incentivo e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por dar-me capacidade de realizar meu trabalho.

À minha família por dar-me apoio em todos os momentos.

Ao CAUNESP e ao Instituto de Pesca-APTA/SP, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva, pela confiança, orientação, incentivo, serenidade e amizade em todos os momentos.

À profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi e Dra. Luciana Polese, pela confiança, incentivo e orientação do trabalho.

Aos professores da banca de qualificação e de defesa pelo auxílio e sugestões do trabalho.

À todos os professores do CAUNESP, pelos ensinamentos.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca-APTA/SP, pelo apoio e auxílio no preparo do trabalho.

Ao Dr. Leonardo Tachibana e MSc. Danielle de Carla Dias, e aos estagiários do Instituto de Pesca: Fernanda, Natália e Thaís, pela ajuda concedida durante o experimento.

Ao APTA – Pariquera-Açú, por emprestar o laboratório para armazenar os peixes e realização de parte do experimento.

Aos amigos de São Paulo: Luciana, Cincotto e Itauã, por me arrumarem vaga na república.

À minha prima, Luisa e meu namorado, Felipe pelos conselhos transmitidos durante a realização deste trabalho.

E a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                     | Página |
|-------------------------------------|--------|
| RESUMO .....                        | 6      |
| 1. INTRODUÇÃO .....                 | 7      |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....      | 8      |
| 2.1 Anestesia .....                 | 8      |
| 2.2 Eugenol .....                   | 9      |
| 2.3 Transporte .....                | 11     |
| 2.4 Aquicultura e tilápia .....     | 11     |
| 2.5 Cromatografia gasosa .....      | 13     |
| 2.6 Validação analítica .....       | 15     |
| 3. OBJETIVOS DO ESTUDO .....        | 16     |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 17     |
| CAPÍTULO I .....                    | 25     |
| Resumo .....                        | 25     |
| Introdução .....                    | 26     |
| Materiais e métodos .....           | 28     |
| Resultados e discussão .....        | 30     |
| Conclusão .....                     | 35     |
| Referências bibliográficas .....    | 36     |
| CAPÍTULO II .....                   | 40     |
| Resumo .....                        | 40     |
| Introdução .....                    | 41     |
| Materiais e métodos .....           | 44     |
| Resultados e discussão .....        | 47     |
| Conclusão .....                     | 54     |
| Referências bibliográficas .....    | 54     |
| CAPÍTULO III .....                  | 59     |
| Resumo .....                        | 59     |
| Introdução .....                    | 60     |
| Materiais e métodos .....           | 61     |
| Resultados e discussão .....        | 65     |
| Conclusão .....                     | 74     |
| Referências bibliográficas .....    | 75     |
| CAPÍTULO IV .....                   | 81     |
| Resumo .....                        | 81     |
| Introdução .....                    | 82     |
| Materiais e métodos .....           | 85     |
| Resultados e discussão .....        | 89     |
| Conclusão .....                     | 104    |
| Referências bibliográficas .....    | 105    |
| CONCLUSÕES GERAIS.....              | 115    |

## RESUMO

Anestésicos são utilizados para anestésiar peixes para facilitar o manejo, evitar ferimentos e reduzir o estresse desses animais. Sabendo-se que a aplicação de eugenol em peixes resulta em baixos tempos de indução anestésica, objetivou-se, avaliar diferentes concentrações do fármaco e sua ação sucessiva sobre os estágios anestésicos; testar a eficácia do produto como mitigador dos parâmetros hematológicos, em alta concentração (aplicada para anestesia profunda) e em pequenas concentrações (aplicadas no transporte de peixes); otimizar e validar um método determinação de resíduos de eugenol em músculo, fígado e plasma; e avaliar os resíduos anestésicos dos peixes submetidos às concentrações de anestesia profunda e de transporte, ao longo de 24 horas de depuração. Para isso, utilizaram-se exemplares de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, provenientes do Pólo Regional da APTA do Vale do Ribeira, município de Pariquera-Açu/SP. A concentração de eugenol, considerada mínima necessária para produzir anestesia profunda, foi de 100 mg L<sup>-1</sup>. Em relação à ação sucessiva do fármaco, pode-se observar que não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os estágios anestésicos. O produto aplicado como anestésico não teve interferência sobre os parâmetros hematológicos de tilápia, em todas as concentrações testadas. Para avaliar os resíduos de eugenol em amostras biológicas, a técnica escolhida foi cromatografia em fase gasosa (CG) utilizando-se coluna capilar e detector de ionização de chama (DIC). Com esse instrumento, obtiveram-se picos cromatográficos com resolução apropriada e ampla faixa de linearidade, permitindo quantificar com segurança, desde baixas concentrações até níveis elevados do produto. A partir da concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de anestésico, analisou-se resíduos em amostras de tilápia e, após 24 horas de depuração anestésica não houve eliminação total do fármaco. Nas menores concentrações (5 e 10 mg L<sup>-1</sup>), após o período de depuração, ocorreu redução

significativa nos valores residuais de eugenol, nas três amostras analisadas e nas duas concentrações aplicadas. Portanto, a maior concentração aplicada pode ser utilizada em tilápias para anestesia profunda, assim como 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>, empregadas em transporte de peixes, sem causarem alterações nos parâmetros hematológicos. Entretanto, o período de 24 horas de depuração não é suficiente para eliminar o resíduo de eugenol nas amostras de plasma, fígado e músculo de tilápia.

**Palavras-chave:** cromatografia gasosa, estágios anestésicos, peixe, sangue.

## **1. Introdução**

A anestesia, em estações de pisciculturas, é utilizada para facilitar o manejo, evitar a possibilidade de ferimentos e, possivelmente, reduzir o estresse dos peixes (Small, 2004; Bolasina, 2006).

Quando os peixes são submetidos a situações de estresse, alterações são verificadas nos parâmetros hematológicos (Morgan & Iwana, 1997), dentre outros. Sabe-se que a imobilização química ajuda o peixe a minimizar os efeitos causados por procedimentos, como, manejo e transporte.

Dentre os anestésicos comumente utilizados em peixes, o óleo de cravo, cuja substância majoritária é o eugenol, tem se destacado por apresentar características de anestésico adequado como, baixo custo; facilidade de aquisição; alto grau de eficiência e pouco tóxico (Ross & Ross, 2008).

Nesta tese, estudou-se o uso do eugenol como anestésico para a espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Esta espécie foi escolhida, pois, sabe-se que a produção anual de tilápias cresceu, apontada como a primeira em produtividade na região do Médio Paranapanema e a segunda em produção no Estado de São Paulo

(Ayrosa *et al.*, 2005). O Brasil está em sexto lugar na escala mundial dos maiores produtores de tilápia, responsável por 3,3% do total da produção (FAO, 2007).

O aumento na produção da tilápia se deve às características relativas à carne, ao elevado valor nutricional, excelentes características organolépticas, ausência de espinhos intermusculares em forma de Y (Souza & Maranhão, 2001). Os raios duros que formam a nadadeira dorsal desta espécie facilmente ocasionam ferimentos aos operadores (Simões & Gomes, 2009), por isso é importante a aplicação de anestésicos durante o manejo desses animais.

De acordo com Bosworth *et al.* (2007), o peixe sedado dentro do processo de captura, antes do abate, evita o estresse que possivelmente ocorreria durante o manejo e abate, conseqüentemente, melhorando a qualidade da carne. Entretanto, existem preocupações nos resíduos anestésicos deixados na carne, que possa alterar as características organolépticas (aroma e sabor) natural do peixe, podendo resultar na rejeição pelos consumidores (Ribas *et al.*, 2007).

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1 Anestesia**

Agentes químicos são usados para a realização de anestesia em peixes, cujas concentrações recomendadas variam conforme o agente utilizado, a via de administração, a espécie do peixe e a qualidade da água (temperatura, concentração de oxigênio e constituição iônica).

Sabe-se que a resistência à atuação do anestésico e a tolerância variam de peixe para peixe e que mesmo espécies com filogenias próximas podem diferir muito a esse respeito (Hikasa *et al.*, 1986). Os procedimentos anestésicos são utilizados visando à

realização da biometria de peixes, marcação, corte de nadadeiras, transporte, exame físico e procedimentos cirúrgicos (Hubbell *et al.*, 1989).

Caracterizam-se como agentes farmacológicos capazes de conduzir esses peixes a um estado de perda parcial ou completa da percepção dos estímulos externos, comprometendo a capacidade de restabelecimento da postura normal (Iwana & Ackerman, 1994).

Apesar da anestesia aparentemente minimizar o impacto de agentes estressores, é importante a determinação de concentrações seguras de fármacos com características anestésicas para se evitar os efeitos adversos da prática, pois a utilização de quantidade excessiva de anestésicos pode promover alterações metabólicas detectadas somente horas após a exposição, ou a morte dos peixes (Summerfelt & Smith, 1990; Park *et al.*, 2008).

A concentração necessária para indução à anestesia varia de acordo com a espécie e está relacionada à tolerância e ao tempo de recuperação (Summerfelt & Smith, 1990). Segundo Park *et al.* (2008), quanto maior a concentração utilizada, menor o tempo para indução à anestesia, havendo também uma relação inversa entre esse tempo e a recuperação. O tempo de indução à anestesia pode também ser afetado pela temperatura da água (Walsh & Pease, 2002), pelo gênero e pelo tamanho do peixe (Woody *et al.*, 2002).

A eficácia e a segurança de qualquer anestésico variam entre as espécies de peixes, o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais (King *et al.*, 2005). De acordo com os critérios de eficiência recomendados por Marking & Meyer (1985) e Ross & Ross (2008), um anestésico deve ser eficaz em baixas concentrações e apresentar toxicidade em doses muito superiores às efetivas. Sua escolha baseia-se nos critérios de disponibilidade, custo, facilidade de utilização, natureza do estudo e segurança para o usuário e ambiente, características essenciais encontradas no óleo de cravo (Iversen *et al.*, 2003).

## 2.2 Eugenol

O óleo de cravo é extraído do caule, das flores e folhas das espécies *Eugenia caryophyllata* e *E. aromatica*, e tem como princípio ativo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), considerado seguro para humanos, animais e ambiente. O eugenol é utilizado como flavorizante na indústria alimentícia e como agente analgésico, antibacteriano, antifúngico, antiviral e anestésico local na odontologia (Keene *et al.*, 1998; Ross & Ross, 2008).

Estudos reportam a eficácia do óleo de cravo e de seus derivados, em espécies de peixes, incluindo kinguio, *Carassius lapides* (Endo *et al.*, 1972), rabbitfish, *Siganus lineatus* (Soto & Burhanuddin, 1995), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Keene *et al.*, 1998; Guenette *et al.*, 2007), bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (Waterstrat, 1999), salmão vermelho, *Oncorhynchus nerka* (Woody *et al.*, 2002) e tilápia, *Oreochromis niloticus* (Deriggi *et al.*, 2006).

De acordo com Yang *et al.* (2003), o eugenol provoca depressão do sistema nervoso central por meio da interação com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, com efeito agonista sobre o ácido gama-amino-butírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato, que atua sobre os receptores N-metil-daspartato (NMDA).

De maneira semelhante à benzocaína, o eugenol tem características que o qualificam como um anestésico seguro, de baixo custo, eficácia comprovada, segurança ambiental e ausência de toxicidade para o operador, nas concentrações utilizadas para peixes (Keene *et al.*, 1998). Este fármaco é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não requerendo tempo de carência (Wagner *et al.*, 2002).

Além disso, o eugenol apresenta curto tempo de indução e alto tempo de recuperação anestésica, ideais para procedimentos mais demorados, comparado com o MS-222 (tricaina metanosulfonato), nas mesmas concentrações (Keene *et al.*, 1998).

Sladky *et al.* (2001) reportaram que o eugenol foi eficaz em 100% dos pacus anestesiados (*Piaractus brachipomus*) e a anestesia foi caracterizada por rápida indução e tempo de recuperação prolongado, comparado com MS-222. No entanto, os peixes expostos a altas concentrações (100 ou 200 mg L<sup>-1</sup> de eugenol) devem ser monitorados, pois pode ocorrer redução da ventilação das brânquias e colapso medular.

### **2.3 Transporte de peixes**

O transporte é um procedimento traumático que consiste da sucessão de estímulos adversos, incluindo a captura, carregamento das unidades de transporte, transporte em si, descarregamento e estocagem dos animais nos viveiros (Robertson *et al.*, 1988).

De acordo com Carneiro & Urbinati (2001), o tempo de transporte de peixes vivos é variado em função do destino, deslocamento entre propriedades, distribuição a estabelecimentos voltados à pesca esportiva, abatedouro, devendo ser realizado com cuidado para que os peixes apresentem as melhores condições fisiológicas possíveis ao destino. Isso porque este procedimento é considerado traumático e capaz de gerar claras respostas de estresse, quer seja em animais adultos, como em jovens (Urbinati *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo, é importante a adequação da densidade de estocagem durante a operação para minimizar os custos (Carneiro & Urbinati, 2002).

Segundo Grottum *et al.* (1997) & Wedemeyer (1997), o principal fator de sucesso do transporte é conter a maior densidade de peixes no menor volume de água possível, sem que haja mortalidade, deterioração da qualidade da água e estresse. Para Pádua (2001), elevadas perdas no transporte de peixes reduzem a eficiência produtiva e o rendimento da piscicultura.

## 2.4 Aquicultura e Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

A pesca e a aquicultura são consideradas pela ONU como atividades estratégicas para a segurança alimentar sustentável do planeta, pois são capazes de fornecer alimento protéico de alta qualidade e de gerar emprego, tanto em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Arana, 1999).

As tilápias são originárias da África, sendo que as pesquisas para a criação desta espécie tiveram início no Congo Belga (atual Zaire), no começo do século XIX. A partir de 1924, sua criação foi intensificada no Quênia e sua expansão para outras partes do mundo se deu a partir da Malásia (Campo, 2008). No Brasil foi introduzida em 1971, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste, difundindo-se para todo o país (Proença & Bittencourt, 1994; Castagnolli, 1996).

Provavelmente a espécie de tilápia mais conhecida é a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, que apresenta uma adaptabilidade a condições adversas, tendo importância para a aquicultura (Likogwe *et al.*, 1996). É uma espécie tropical cuja temperatura ideal para o desenvolvimento varia entre 25 e 30°C, tendo seu crescimento afetado abaixo de 15°C e não resistindo a temperaturas por volta de 9°C (Ono & Kubitza, 2003; Cyrino & Conte, 2006).

A tilápia é um dos peixes com maior potencial para a aquicultura por características como, rápido crescimento, alimenta-se dos itens básicos da cadeia trófica e onívora, respondendo com a mesma eficiência a ingestão de proteínas de origem vegetal e animal, possui capacidade fisiológica de adaptar-se em diferentes ambientes e sistemas de produção, é resistente a doenças, densidades de estocagem elevadas e baixos teores de oxigênio dissolvido, apresenta carne saborosa com baixo teor de gordura (0,9 g 100g<sup>-1</sup> de carne) e de calorias (117 kcal 100g<sup>-1</sup> de carne), rendimento de filé de 35 a 40% e ausência de espinhos em forma de “Y” (mioceptos), o que a torna apropriada para industrialização,

e possui elevado valor comercial, principalmente nos países desenvolvidos (Ono & Kubitz, 2003; Zimmermann & Fitzsimmons, 2004; Cyrino & Conte, 2006).

## **2.5 Cromatografia gasosa**

Na cromatografia gasosa (CG), a amostra é vaporizada e injetada no topo de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita por fluxo de um gás inerte que atua como fase móvel. Ao contrário da maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, sendo sua única função o transporte do analito através da coluna (Skoog *et al.*, 1998).

A amostra é introduzida no equipamento através de um injetor sob aquecimento, favorecendo a vaporização dos compostos, um fluxo de gás contínuo carrega a amostra através da coluna, que se encontra em um forno, onde a temperatura pode se manter constante, ou aumentar através de uma rampa de aquecimento. Essa programação de temperatura favorece uma melhor separação dos compostos e diminui o tempo de análise. O analito segue até um detector que gera um sinal para um sistema de aquisição (Rouessac & Rouessac, 2000).

Detecções podem ser utilizados, como Detector de Condutividade Térmica, que se baseia na modulação da condutividade térmica dos gases de arraste pelos analitos; Detector de Nitrogênio/Fósforo; de Infravermelho por Transformada de Fourier; Espectrometria de Massas, que é seletivo, sensível e universal e Detector de Ionização de Chama (DIC), considerado universal já que é capaz de detectar qualquer substância orgânica (Collins *et al.*, 1997).

Os detectores de ionização de chama (DIC) são usados para quantificação de compostos orgânicos voláteis em amostras gasosas (Bought, 1993).

O DIC foi proposto em 1958, por Harley e de McWilliam e Dewar (Bartle & Myers, 2002). O princípio é de que o composto eluído da coluna (analito), misturado

com hidrogênio e ar sintético seja queimado, produzindo uma chama que tem energia suficiente para ionizar as moléculas do analito que tenham baixos potenciais de ionização. As espécies iônicas produzidas são coletadas por eletrodos e a corrente elétrica resultante é amplificada e enviada para o sistema de registro, conforme ilustra a figura 1 (Neto & Nunes, 2003).

Um parâmetro de grande influência no desempenho do detector de ionização de chama é a relação existente entre os gases envolvidos no processo de combustão. Na prática, a razão mais comumente utilizada é 1:1:10 (gás de arraste : hidrogênio : ar sintético), porém os fluxos ideais devem ser determinados experimentalmente, para cada sistema utilizado.

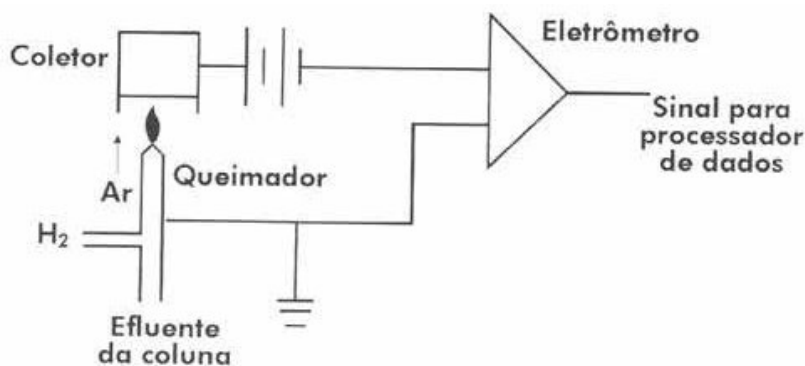


Figura 1: Esquema de funcionamento do detector de ionização de chama (adaptado por Neto & Nunes, 2003).

O DIC possui grande aplicabilidade, sendo um detector quase universal na cromatografia de compostos orgânicos voláteis. Tal universalidade, acoplada a sua elevada sensibilidade, alta estabilidade e resposta rápida, faz com que seja o detector mais popular de uso corrente (Ciola, 1985).

## 2.6 Validação analítica

No desenvolvimento de um método analítico, a validação é uma etapa fundamental, para garantir a confiabilidade. Os parâmetros de desempenho analítico dos métodos mais utilizados são: linearidade, exatidão (recuperação), precisão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade, especificidade e robustez (Ribani *et al.*, 2004).

Crítérios para se realizar a validação de um método são discutidos por Brito (2002) e ANVISA (2004). Os principais critérios definidos:

- Especificidade/Seletividade: seletividade é a capacidade de o método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz.
- Linearidade: é a capacidade de um método gerar resultados proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa específica de concentrações.
- Intervalo de trabalho: é a faixa do menor ao maior valor de concentração que possa ser determinado com precisão e exatidão usando a linearidade do método.
- Sensibilidade: é a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. A sensibilidade é definida como o coeficiente angular da curva analítica.
- Robustez: é definido como a capacidade de manter-se inalterado em pequenas variações nos parâmetros do método.
- Exatidão: é a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico.
- Precisão: é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A precisão de um procedimento analítico é usualmente expressa como o desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medidas.

Estudos de recuperação são utilizados para avaliar a exatidão e precisão de um método. Neste estudo podem ser empregados materiais de referência certificados, ou ensaios de recuperação mediante adição de padrões à amostra de interesse (The Fitness, 1998).

- Limite de detecção (LD): é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal/ruído (normalmente três vezes) e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

- Limite de quantificação (LQ): é a menor concentração do analito, em uma amostra que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitável, sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal/ruído (normalmente dez vezes) e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

Entre os critérios descritos acima, a exatidão e a precisão são os considerados de maior importância para o propósito da validação de um método analítico.

### 3. Objetivos do estudo

Os objetivos desse trabalho para tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, foram:

- Avaliar diferentes concentrações e a ação da administração sucessiva de eugenol sobre os estágios anestésicos;
- Otimizar e validar um método simples, rápido e eficiente para determinação de resíduos de eugenol em músculo, fígado e plasma;
- Avaliar os parâmetros hematológicos e os resíduos do anestésico eugenol (100 mg L<sup>-1</sup>) nas amostras dos peixes ao longo de 24 horas de depuração anestésica;
- Testar a eficiência do eugenol como mitigador dos parâmetros hematológicos durante o transporte, nas concentrações de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>, em sistema fechado;
- Avaliar os resíduos do anestésico eugenol submetidos a concentrações aplicadas no transporte (5 e 10 mg L<sup>-1</sup>) nas amostras dos peixes ao longo de 24 horas de depuração anestésica.

#### 4. Referências bibliográficas

- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para qualidade em química analítica:** uma assistência a acreditação. Brasília,. (Série Acreditação, v. 1, 2004.
- ARANA L.V. **Aqüicultura e Desenvolvimento Sustentável.** Editora UFSC. 310p., 1999.
- AYROZA, L. M. S.; FURLANETO, F. P. B.; AYROZA, D. M. M. R.; SUSSEL, F. R. Piscicultura no Médio Paranapanema: situação e perspectiva. **Revista Aqüicultura e Pesca.** São Paulo, n. 12, ano II, 33p., 2005.
- BARTLE, K. D.; MYERS, P. History of gas chromatography. **Trends Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9-10, 2002.
- BOLASINA, S. N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. **Aquaculture International**, v. 14, p. 569-575, 2006.
- BOSWORTH, B. G.; SMALL, B. C.; GREGORY, D.; KIM, J.; BLACK, S.; JERRETT, A. Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-S™ on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. **Aquaculture**, v. 262, p. 302–318, 2007.
- AYROZA, L.M.S; FURLANETO, F.P.B; AYROZA, D.M.M.R; SUSSEL, F.R. **Piscicultura no Médio Paranapanema: situação e perspectiva.** Revista Aqüicultura e Pesca. São Paulo, n. 12, ano II, 33p. 2005.
- BRITO, N. M. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, n. 1, p. 155-168, jan.-dez. 2002.
- CAMPO, L. F. C. **La Tilapia Roja:** una evolucion de 26 años, de la incertidumbre al exito. México, 147 p., 2008.
- CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 298-307, 2001.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. **Aquaculture International**, v. 34, p. 1-9, 2002.

CASTAGNOLLI, N. **Aqüicultura para o ano 2000**. Brasília: CNPq, 95 p., 1996.

CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Watbaum). **Aquaculture Research**, v. 31, p. 537-546, 2000.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a gás**. São Paulo: Edgard Blucher, 1985.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campinas/SP: UNICAMP, 1997.

CYRINO, J. E.; CONTE, L. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). **AquaCiência: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, cap.12, p. 151-171, 2006.

DERIGGI, G. F. *et al.* Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 28, p. 269-274, 2006.

ENDO, T.; OGIHIMA, K.; TANAKA, H.; OSHIMA, S. Studies on the anesthetic effect of eugenol in some freshwater fishes. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, v. 38, p. 761-767, 1972.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fish Stats Plus**: universal software for fishery statistical time series: version 2.32. Rome, 2007.

GOMES, L. C.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, p. 426-431, 2001.

GROTTUM, J. A.; STAURNES, M.; SIGHOLT, T. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 159-164, 1997.

GUÉNETTE, S.A. et al. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.266, p.262-265, 2007.

HIKASA, Y.; TAKASE, K.; OGASAWARA, T.; OGASAWARA, S. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp. *Cyprinus Carpio*. **Nippon Juigaku Zasshi**, Towada, v. 48, n. 2, p. 341-351, 1986.

HUBBELL, J. A. E.; MUIR, W. W.; SKARDA, R. Anesthetic procedures and techniques in birds, fish, reptiles, amphibians, rodents and exotic cats. In: MUIR, W. W.; HUBBELL, J. A. E. **Handbook of veterinary anesthesia**. St Louis: Mosby, p. 234-259, 1989.

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio ambiente e dos Recursos Naturais renováveis. **Estatística da Pesca 2005**: Grandes regiões e unidades da federação, Brasília, 2007.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; McKINLEY, R. S.; ELIASSEN, R. A. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potencial stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566, 2003.

IWANA, G.; ACKERMAN, A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P.; MOMMSEN. **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, v. 3, cap. 1, p. 1-5, 1994.

KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

KING, W.V.; HOOPER, B.; HILLSGROVE, S.; BENTON, C.; BERLINSKY, D. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for

inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropomus striata* L.). **Aquaculture Research**, p. 1-8, 2005.

LINKONGWE, J. S.; STECKO, T. D.; STAUFFER, Jr, J. R.; CARLINE, R. F. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). **Aquaculture**, p. 37-46, 1996.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries. **Fisheries**, v. 10, n. 6, p. 2-5, 1985.

MORGAN, J. D.; IWANA, G. K. Measurements of stressed states in the field. In: IWANA, G. W.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p. 247-270, 1997.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

ONO, E. A.; KUBITZA, F. **Cultivo de peixes em tanques-rede**. 3ªed. Jundiaí: Eduardo A. Ono. 112p., 2003.

PÁDUA, D.M.C. **Fundamentos da piscicultura**. 2 ed. Ed. UCG. Goiânia- GO, 341p., 2001.

PARK, M. O.; HUR, W. J.; IM, S. Y.; SEOL, D. W.; JINHWAN, L.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884, 2008.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de Piscicultura Tropical**. Brasília: IBAMA. 196p., 1994.

RIBANI, M.; BOTTOLI, B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBAS, L.; FLOS, R.; REIG, L.; MACKENZIE, S.; BARTON, B. A.; TORT, L. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**, v. 269, p. 250–258, 2007.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R. Plasma cortisol and the secondary responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. **Aquaculture**, v. 68, p. 115-130, 1988.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 240 p., 2008.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical Analysis: Modern Instrumental Methods and Techniques**. French: Jonh Wiley & sons, LTD, 2000.

SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 613-620, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. Philadelphia: Brooks/Cole, 832 p., 1998.

SLADKY, K. K.; SWANSON, C. R.; STOSKOPF, M. K.; LOOMIS, M. R.; LEWBART, G. A. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.

SMALL, B. C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. **Aquaculture**, v. 238, p. 469-481, 2004.

SOTO, C.; BURHANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v. 136, p. 149-152, 1995.

SOUZA, M. L. R. de; MARANHÃO, T. C. F. Rendimento da carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* (L.), em função do peso corporal. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 897-901, 2001.

SUMMERFELT, R. C.; SMITH, L. S. Anaesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Eds.), **Methods for Fish Biology**. American Fisheries Society, Bethesda, MD, p. 213-272, 1990.

THE FITNESS for purpose of analytical methods: **a laboratory guide to method validation and related topics**, Eurachem Guides, 1998.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; LANDINES, M. A. Loading and transport stress in juveniles matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389-400, 2004.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: José Eurico Posseibon Cyrino, Elisabeth Criscuolo Urbinati, Débora Machado Fracalosi, Newton Castagnolli (Editores), **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, São Paulo: TecArt, Cap.9, p. 239-266, 2004.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, p. 353-366, 2002.

WALSH, C. T.; PEASE, B. C. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). **Aquaculture Research**, v.33, p.627-635, 2002.

WATERSTRAT, P. Induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, p. 250-255, 1999.

- WEDEMEYER, G. A. Effect of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press, p. 35-71, 1997.
- WOODY, C.A. *et al.* Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 340-347, 2002.
- YANG, B.H. *et al.* Activation of vanilloid receptor 1(VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v. 82, p. 781-785, 2003.

## Capítulo I

### Concentrações anestésicas e administrações sucessivas de eugenol em estágios anestésicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*

Marina Carvalho Delbon<sup>1</sup>

Maria José Tavares Ranzani Paiva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda de pós-graduação, CAUNESP, Unesp, Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Pesquisadora científica, Instituto de Pesca-APTA-SAA, São Paulo, SP, Brasil.

#### Resumo

Objetivou-se avaliar diferentes concentrações de eugenol em comparação à benzocaína e a ação da administração sucessiva sobre os estágios anestésicos (sedação, perda de equilíbrio e anestesia) em tilápia revertida. No primeiro experimento os peixes foram submetidos, individualmente, a cinco concentrações de eugenol (40, 60, 80, 100 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e uma de benzocaína (100 mg L<sup>-1</sup>) e no segundo, a três concentrações de eugenol (60, 80 e 100 mg L<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos mostraram que todas as concentrações testadas foram capazes de induzir os peixes a todos os estágios de anestesia, e revelaram relação inversa entre as concentrações e os tempos de indução. A concentração de eugenol, considerada mínima necessária para produzir anestesia profunda, foi de 100 mg L<sup>-1</sup>. No segundo experimento, avaliando as diferenças nos parâmetros analisados entre os dias sucessivos, pode-se observar que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os estágios anestésicos nas concentrações de eugenol testadas, sugerindo que o anestésico é eliminado do organismo do peixe em um período inferior a 24 horas.

**Palavras-chave:** benzocaína, ciclídeos, óleo de cravo, piscicultura, recuperação anestésica.

## **Introdução**

As práticas realizadas na piscicultura, como biometria, análise patológica, implante hormonal e transporte, frequentemente expõem os peixes a fatores estressantes, afetando o desempenho (Barton, 2000). De fato, estudos têm revelado que os peixes podem sentir dor e medo com influências importantes no metabolismo em geral (Sneddon, 2003; Chandroo *et al.*, 2004; Dunlop & Laming, 2005).

Para auxiliar os manejos, visando amenizar a intensidade do estresse destas atividades, têm-se utilizado anestésicos. Os anestésicos podem ser injetados no peixe, no entanto, a maioria é administrada com diluição em água (Bowser, 2001). Deste modo, o anestésico, através das brânquias e pele, penetra no sistema circulatório do animal, bloqueando algumas ações reflexas (Summerfelt & Smith, 1990).

A anestesia é alcançada quando ocorre uma perda completa ou parcial dos sentidos corporais devido à diminuição das funções nervosas (Iwama & Ackerman, 1994). Biologicamente, o procedimento tem por objetivo anestésicar os peixes sem causar nenhum problema no crescimento e reprodução. Do ponto de vista econômico, a utilização de uma dose correta do anestésico é fundamental para evitar desperdícios ou a morte dos peixes pelo excesso de exposição ao produto.

O anestésico pode se acumular no organismo dos animais por um determinado tempo e, para eliminar esses resíduos, é necessário que o mesmo seja submetido à depuração. O tempo deste processo depende: espécie alvo, tipo da droga utilizada, concentração do anestésico e via de administração utilizada, que pode ser de algumas horas a várias semanas (Booth, 1988). Mesmo que os resíduos anestésicos presentes nos peixes não sejam prejudiciais ao consumo humano, segundo Stone & Tostin (1999), estes podem afetar o sabor natural do peixe, quando consumidos.

São conhecidos diversos fármacos destinados à anestesia de peixes, mas o único anestésico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) é o MS-222 (tricafina metanosulfonato) (Gomes *et al.*, 2001). No Brasil, o anestésico mais utilizado é a benzocaína. Este anestésico atende à maioria dos critérios estabelecidos por Ross & Ross (2008) como ideal para peixes, como eficácia e boa margem de segurança. No entanto, a benzocaína e o MS-222 são derivados do ácido p-aminobenzoico (Tytler & Hawkins, 1981) e são necessários 21 dias para depuração dos peixes submetidos a essas drogas, para posteriormente, serem destinados ao consumo humano (Ross & Ross, 2008).

Dessa forma, procurando anestésicos menos residuais e menos agressivos, pesquisas com anestésicos de fontes naturais começaram a ser sugeridas, como por exemplo, o óleo de cravo, substância fenólica obtida da destilação das folhas, caule e flores do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), que apresenta na composição de 70 a 95% do princípio ativo, o eugenol (Mazzafera, 2003), um depressor do sistema nervoso central (SNC) (Anderson *et al.*, 1997).

Estudos sugerem que o eugenol é uma alternativa efetiva para a sedação e anestesia de peixes e tem baixo custo, elevada disponibilidade e sem propriedades tóxicas aparentes (Inoue *et al.*, 2003). Trata-se de um anestésico seguro, de grande eficácia e ampla margem de segurança para peixes (Keene *et al.*, 1998). De acordo com Wagner *et al.* (2002), este fármaco é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não requerendo tempo de carência. Porém, Guenette *et al.* (2007), sugerem que, com administrações sucessivas de eugenol, pode ocorrer acúmulo deste produto no organismo dos peixes.

Assim, objetivou-se avaliar concentrações de eugenol, em comparação à benzocaína, na indução e recuperação anestésica em juvenis de tilápia e a ação da administração sucessiva de diferentes concentrações de eugenol (24 horas após a

primeira anestesia) sobre os estágios anestésicos (sedação anestésica, perda de equilíbrio e perda total da reação ao estímulo).

## **Materiais e métodos**

Os experimentos foram realizados no Instituto de Pesca, em São Paulo/SP. Para a realização dos experimentos, foram utilizados tilápias, *O. niloticus* (n = 66; peso médio =  $39,34 \pm 5,86$  g e comprimento total médio =  $13,46 \pm 0,86$  cm) provenientes do Pólo Regional da APTA do Vale do Ribeira, município de Pariquera-Açu/SP. Para aclimação, os peixes foram mantidos em caixas de polietileno com capacidade para 1.000 L, durante trinta dias, com aeração constante. Os peixes foram alimentados com ração extrusada, com 28% de proteína bruta até a saciedade aparente, uma vez ao dia.

Foram realizados dois experimentos:

### 1º experimento: Determinação das concentrações anestésicas

Os testes foram conduzidos em 36 aquários com 5 L de água, sendo seis aquários por tratamento. Os peixes (n = 36;  $47,73 \pm 8,73$  g e  $14,23 \pm 0,81$  cm) foram individualmente expostos às concentrações de 40, 60, 80, 100 e 120 mg L<sup>-1</sup> de eugenol e 100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína.

Como os anestésicos utilizados no experimento são hidrofóbicos, ou seja, não diluem na água, as respectivas concentrações foram previamente diluídas em um béquer com 10 mL de etanol e, adicionadas individualmente, em cada aquário. Logo após a adição do anestésico à água, foi colocado um peixe por aquário e, por meio de visualização comportamental, o tempo para se atingir cada um dos três estágios de anestesia foi monitorado com o auxílio de um cronômetro.

Os estágios anestésicos avaliados foram: estágio 1 – sedação anestésica, caracterizada pela diminuição do movimento opercular; estágio 2 – perda de equilíbrio,

correspondendo ao movimento natatório de lado sem coordenação; estágio 3 – anestesia, ocorrendo a perda total da reação ao estímulo (Woody *et al.*, 2002).

No terceiro estágio, foram realizadas biometrias dos peixes, simulando o manejo de rotina na piscicultura.

Após a biometria, os peixes foram transferidos e mantidos em aquários com 10 L de água livre de anestésico, para avaliação do tempo de recuperação. O peixe foi considerado recuperado quando retornava os movimentos, nadando (Gomes *et al.*, 2001). Após a recuperação, os peixes foram mantidos nos aquários, com aeração constante e alimentação diária com ração comercial. A taxa de mortalidade foi avaliada durante 48h após a indução anestésica.

#### 2º experimento: Anestesias sucessivas

Os testes foram conduzidos em 30 aquários com 5 L de água, sendo seis aquários para cada tratamento. Os peixes ( $n = 30$ ,  $38,07 \pm 5,00$  g e  $12,7 \pm 0,54$  cm) foram, individualmente, expostos às concentrações de 60, 80 e 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol determinadas no experimento 1.

O procedimento e os estágios anestésicos avaliados foram os mesmos do experimento anterior.

Após atingirem o terceiro estágio anestésico – perda total da reação ao estímulo, as tilápias foram transferidas e mantidas, individualmente, em aquários de 10 L de água isenta de anestésico, com aeração constante, para monitorar a recuperação. Vinte e quatro horas após anestesia, os peixes, nas mesmas concentrações, foram novamente anestesiados e acompanhados quanto às alterações nos tempos de estágios anestésicos descritos por Woody *et al.* (2002).

As concentrações de eugenol testadas foram estabelecidas a partir dos resultados observados em artigos científicos (Woody *et al.*, 2002; Delbon, 2006; Vidal *et al.*,

2008) e a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína foi utilizada como referência por ser considerada ideal na anestesia de juvenis de tilápia (Coyle *et al.*, 2004).

Em cada experimento foi utilizado um grupo-controle, em água sem anestésico, para monitoramento dos sinais clínicos (sedação anestésica, perda de equilíbrio e perda total da reação ao estímulo), segundo Woody *et al.*, 2002 e possível mortalidade durante os procedimentos. O sistema de aeração foi constante, mantido por meio de pedra porosa acoplada a um soprador. Foram monitorados os parâmetros de qualidade de água: temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) e pH.

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste estatístico “ANOVA” e teste Tukey, comparando-se a diferença entre as médias dos tratamentos, por tempo e entre as concentrações (Zar, 2009).

## Resultados e discussão

A sobrevivência dos peixes foi de 100%.

Em ambos experimentos, os parâmetros de qualidade de água avaliados permaneceram dentro das faixas recomendadas para a espécie (Martins, 2004), evitando possível interferência no desempenho e saúde dos animais (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Parâmetros da qualidade de água durante realização do experimento com diferentes concentrações de eugenol e benzocaína em tilápia, *O. niloticus*.

| Anestésicos                       | Temperatura (°C) |             | Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> ) |             | pH       |             |
|-----------------------------------|------------------|-------------|-------------------------------------------|-------------|----------|-------------|
|                                   | Indução          | Recuperação | Indução                                   | Recuperação | Indução  | Recuperação |
| 40 mg L <sup>-1</sup> Eugenol     | 23,1±0,3         | 23,2±0,2    | 7,5±0,3                                   | 7,5±0,1     | 7,77±0,0 | 7,71±0,1    |
| 60 mg L <sup>-1</sup> Eugenol     | 23,1±0,2         | 23,1±0,6    | 7,3±0,5                                   | 6,9±0,3     | 7,68±0,1 | 7,70±0,0    |
| 80 mg L <sup>-1</sup> Eugenol     | 22,8±0,5         | 22,9±0,3    | 6,7±0,3                                   | 7,1±0,2     | 7,71±0,0 | 7,71±0,1    |
| 100 mg L <sup>-1</sup> Eugenol    | 23,1±0,1         | 22,9±0,4    | 7,3±0,1                                   | 7,4±0,4     | 7,80±0,1 | 7,78±0,0    |
| 120 mg L <sup>-1</sup> Eugenol    | 22,7±0,1         | 22,8±0,2    | 7,5±0,7                                   | 7,3±0,5     | 7,71±0,1 | 7,72±0,1    |
| 100 mg L <sup>-1</sup> Benzocaína | 23,2±0,2         | 23,0±0,7    | 6,9±0,2                                   | 6,9±0,3     | 7,69±0,0 | 7,73±0,1    |

Tabela 2: Parâmetros da qualidade de água durante realização do experimento com diferentes concentrações de eugenol em anestésias sucessivas com tilápia, *O. niloticus*.

| Anestésico                     | Temperatura (°C) |             | Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> ) |             | pH      |             |
|--------------------------------|------------------|-------------|-------------------------------------------|-------------|---------|-------------|
|                                | Indução          | Recuperação | Indução                                   | Recuperação | Indução | Recuperação |
| 60 mg L <sup>-1</sup> Eugenol  | 22,8±0,2         | 22,9±0,1    | 7,5±0,2                                   | 7,5±0,2     | 7,7±0,0 | 7,7±0,1     |
| 80 mg L <sup>-1</sup> Eugenol  | 23,1±0,5         | 23,1±0,5    | 6,9±0,5                                   | 7,0±0,3     | 7,7±0,1 | 7,7±0,1     |
| 100 mg L <sup>-1</sup> Eugenol | 23,2±0,3         | 23,0±0,3    | 7,2±0,4                                   | 7,2±0,2     | 7,8±0,1 | 7,7±0,0     |

Para constatar a ação anestésica do fármaco, e não do diluente, exemplares de tilápias foram submetidos ao tratamento com etanol, com o intuito de se observar possíveis modificações de comportamento. Os peixes mantidos em solução de etanol não apresentaram indução anestésica, ou qualquer modificação aparente no comportamento, corroborando os resultados apresentados por Mylonas *et al.* (2005).

#### 1º experimento: Determinação da concentração anestésica

Nas concentrações testadas os peixes foram induzidos ao estágio 3 -anestesia profunda (Woody *et al.*, 2002) (Tabela 3). As tilápias imersas nas soluções com benzocaína, no estágio anestésico 1, debateram-se violentamente antes de perder o equilíbrio (estágio 2). Em relação aos sinais clínicos das tilápias submetidas à anestesia com eugenol, verificou-se que estas não se debateram durante o processo de indução, corroborando com as observações de Peake (1998).

Tabela 3: Tempo, em segundos (s) de indução aos estágios de anestesia e recuperação de juvenis de tilápia, *O. niloticus*, utilizando diferentes concentrações de anestésicos.

| Anestésias                     | Estágio 1 (s) | Estágio 2 (s) | Estágio 3 (s) | Recuperação (s) |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| 40 mg L <sup>-1</sup> Eugenol  | 28,3 ± 5,6 b  | 70,3±19,3 b   | 198,8±32,9 d  | 184,2±92,8 a    |
| 60 mg L <sup>-1</sup> Eugenol  | 34,7±6,3 b    | 67,3±15,4 ab  | 126,7±21,7 c  | 214,7±32,9 ab   |
| 80 mg L <sup>-1</sup> Eugenol  | 32,2±10,0 b   | 59,7±11,6 ab  | 112,8±12,3 bc | 191,5±38,2 ac   |
| 100 mg L <sup>-1</sup> Eugenol | 15,2±4,2 a    | 46,2±12,1 ab  | 74,0±18,0 a   | 271,7±48,3 ab   |
| 120 mg L <sup>-1</sup> Eugenol | 11,5±4,5 a    | 39,5±28,1 a   | 95,3±31,7 ac  | 300,0±52,5 b    |
| 100 mg L <sup>-1</sup> Eugenol | 17,2±3,9 a    | 52,8±7,3 ab   | 70,2±13,4 a   | 282,6±52,3 bc   |

Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

De acordo com a Tabela 3, as concentrações que possibilitaram os peixes a alcançarem, primeiramente, o estágio 1 foram 100 e 120 mg L<sup>-1</sup> de eugenol e 100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína. A concentração de 120 mg L<sup>-1</sup> de eugenol induziu os animais ao 2º estágio anestésico mais rapidamente, mas não apresentaram diferenças significativas das concentrações de 60 a 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol e 100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína. Para atingir o estágio 3, as concentrações ideais, ou seja, que apresentaram menores tempos de indução anestésica, foram 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol e de benzocaína, com tempos de 74,00 ± 18,02 segundos e 70,17 ± 13,41 segundos, respectivamente.

No período de recuperação, os peixes testados na menor concentração de eugenol (40 mg L<sup>-1</sup>) apresentaram menor tempo de recuperação anestésica, diferindo apenas da maior concentração de eugenol (120 mg L<sup>-1</sup>) e de 100 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína.

De acordo com Marking & Meyer (1985), a indução à anestesia profunda deve apresentar um curto tempo de latência (1 a 3 minutos) e a recuperação não deve ultrapassar 5 min. Neste trabalho, a exposição de juvenis de tilápia ao eugenol nas concentrações de 60 a 120 mg L<sup>-1</sup> e de benzocaína a 100 mg L<sup>-1</sup> estão dentro deste intervalo proposto por Marking & Meyer (1985), sendo por isso consideradas válidas para a aplicação de anestesia profunda.

No entanto, objetivando-se avaliar uma concentração de eugenol para a substituição da benzocaína, indica-se a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol por apresentar baixos tempos de indução e recuperação anestésica. As concentrações determinadas para a tilápia encontram-se dentro do intervalo de valores já obtidos para esta espécie (Delbon, 2006; Vidal *et al.*, 2007) e para outras espécies como European sea bass, *Dicentrarchus labrax*; gilthead sea bream, *Sparus aurata* e alevinos de lambari, *Astyanax* sp. (Mylonas *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009).

Os modelos encontrados para a indução e recuperação dos peixes anestesiados com eugenol obedecem às equações  $y = -1,2984x + 225,4$  e  $y = 1,4408x + 117,04$ , sendo que a primeira representa o tempo necessário para a indução (em segundos) e a segunda, o tempo necessário para recuperação (em segundos) e  $x$  a concentração utilizada. Para a equação de indução, o  $r^2$  foi 0,7473; na recuperação o  $r^2$  foi 0,7995, em concentrações que foram de 40 à 120  $\text{mg L}^{-1}$  (Figura 1).

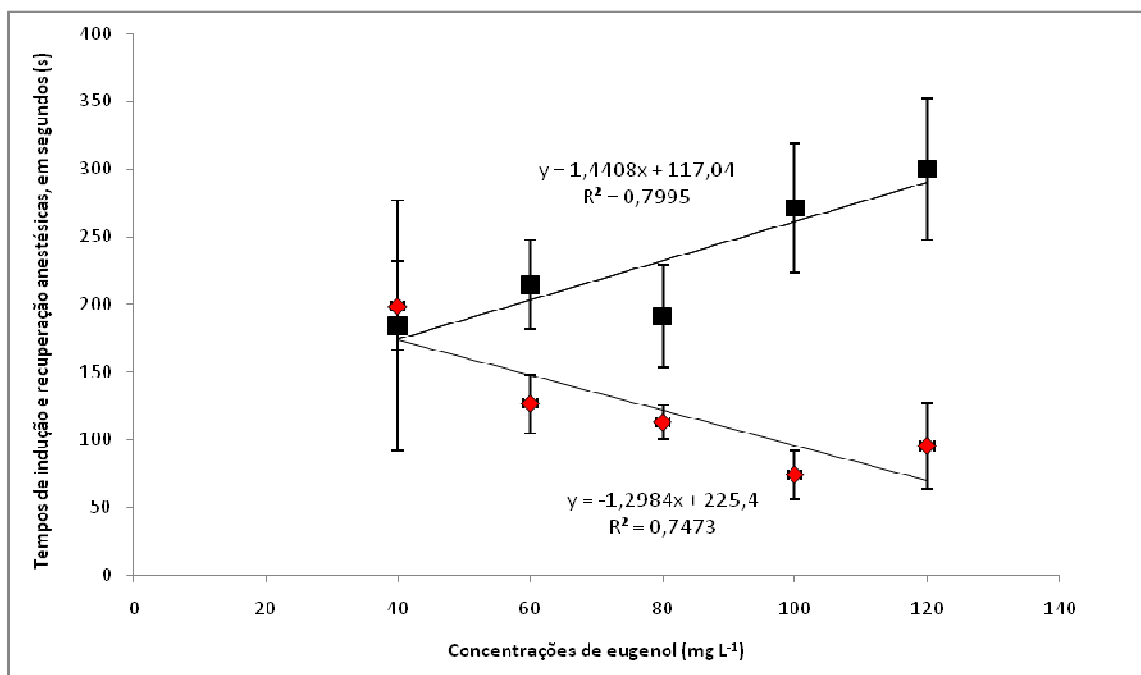


Figura 1 - Curvas de regressões ajustadas para os tempos de indução e recuperação anestésica de tilápia, *Oreochromis niloticus*, submetidas a diferentes concentrações de eugenol.

A curva de regressão ajustada para o tempo de indução à anestesia profunda (Figura 1) indica redução linear no tempo de indução anestésica com a elevação da concentração. Isto também foi confirmado por Soto & Burhanuddin (1995) que, ao induzirem exemplares de rabbitfish (*Siganus lineatus*) à anestesia com óleo de cravo em concentrações de 33, 50, 67 e 100  $\text{mg L}^{-1}$ , relataram que a de 33  $\text{mg L}^{-1}$  correspondeu ao maior tempo de indução (150 a 190 s). Da mesma forma, Cunha & Rosa (2006), estudando a ação do eugenol em diferentes espécies de peixes tropicais marinhos,

também verificaram que a menor concentração testada (20 mg L<sup>-1</sup>) proporcionou o maior tempo de indução (127,33 s).

Além da redução linear no tempo de indução anestésica, pode-se observar elevação do tempo de recuperação com os valores de concentração. De fato, quanto menor o tempo de indução à anestesia, maior é o tempo de recuperação dos peixes (Park *et al.*, 2008).

Walsh e Pease (2002), avaliando a eficácia do óleo de cravo como anestésico em enguias (*Anguilla reinhardtii*), também observaram que, o aumento na concentração do óleo de cravo reduziu o tempo de indução anestésica.

## 2º experimento: Anestesias sucessivas

Com a finalização do experimento anterior e determinação das concentrações de eugenol mais indicadas (60, 80 e 100 mg L<sup>-1</sup>), sendo a concentração ideal a de 100 mg L<sup>-1</sup>, comparou-se a ação destas concentrações anestésicas sob os tempos de sedação, indução e recuperação anestésica em anestésias consecutivas (Tabela 4).

Tabela 4: Tempo, em segundos (s) de sedação, indução e de recuperação anestésica de juvenis de tilapia, submetidos a diferentes concentrações de eugenol, em dias sucessivos.

| Eugenol | Sedação (s) |          | Indução (s) |            | Recuperação (s) |             |
|---------|-------------|----------|-------------|------------|-----------------|-------------|
|         | 1º dia      | 2º dia   | 1º dia      | 2º dia     | 1º dia          | 2º dia      |
| 60      | 38,6±6,6    | 29,8±6,1 | 98,4±33,8   | 126,2±54,7 | 179,8±91,0      | 284,4±112,8 |
| 80      | 25,4±2,3    | 20,6±3,9 | 83,4±11,3   | 145,4±35,9 | 175,2±26,0      | 297,2±29,6  |
| 100     | 20,4±3,9    | 12,8±5,7 | 71,8±13,8   | 114,5±12,5 | 297,0±24,6      | 244,2±45,6  |

NS: não significativo

Neste trabalho, avaliando-se as diferenças nos parâmetros analisados entre os dias sucessivos, pode-se verificar que não ocorreram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) nas concentrações testadas (60, 80 e 100 mg L<sup>-1</sup>). Para Inoue *et al.* (2003) igualmente não verificaram diferenças estatísticas quanto ao tempo de indução para concentrações acima de 40 mg L<sup>-1</sup>, estudando diferentes concentrações de óleo de cravo para juvenis de matrinxã, *Brycon cephalus*. Tort *et al.* (2002), por sua vez, mostraram que o tempo

de indução foi semelhante para as concentrações de óleo de cravo testadas em dourada, *Sparus aurata* e em truta, *Oncorhynchus mykiss*. Quanto ao tempo de recuperação, Delbon (2006), em estudo para avaliar a concentração ideal do óleo de cravo em juvenis de tilápia do Nilo, também não obtiveram diferenças estatísticas entre as concentrações de 40 a 100 mg L<sup>-1</sup>.

Assim, sugere-se que o anestésico eugenol deva ser completamente eliminado do organismo do peixe em um período de até 24 horas, visto que não ocorreu alteração, após anestesia sucessiva, nos tempos de sedação, indução e recuperação anestésica. Estes resultados corroboram com os de Cho & Heath (2000), aonde concluíram que o eugenol é rapidamente metabolizado e excretado, não necessitando do processo de depuração.

## **Conclusão**

Conclui-se que a concentração anestésica que apresentou resultados satisfatórios, com menores tempos de indução e recuperação anestésica, foi a de 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol. E, após as anestésias sucessivas não ocorreram alterações nos tempos de indução e recuperação anestésica.

## Referências bibliográficas

- ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 17, p. 301-307, 1997.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000.
- BOOTH, N. H. Drug and chemical residues in the edible tissues of animals. In: Booth, N. H.; McDonald, L. E. (Eds.). **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 6<sup>th</sup> ed. Iowa State Univ. Press, Iowa, p. 1149-1159, 1988.
- BOWSER, P. R. Anesthetic options for fish. In: *Recent Advances in Veterinary and Analgesia: Companion animals*, Gleed, R. D.; Ludders, J. W (Eds.). **International Veterinary Information Service**, Ithaca, Nova York, EUA, 2001.
- CHANDROO, K.P.; DUNCAN, I.J.H.; MOCCIA, R.D. Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. **Applied Animal Behaviour Science.**, v. 86, p.225-250, 2004.
- CHO, G.K.; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Watbaum). **Aquaculture Research**, v. 31, p. 537-546, 2000.
- COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, J.H. **Anesthetics in aquaculture**. Texas: SRAC, 6p. (SRAC Publications, 3900), 2004.
- CUNHA, F.E.A.; ROSA, I.L. Anesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 1504-1512, 2006.

DELBON, M.C. Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*. 2006. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.

DUNLOP, R.; LAMING, P. Mechanoreceptive and Nociceptive Responses in the Central Nervous System of Goldfish (*Carassius auratus*) and Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of Pain**, v. 6, n. 9, p. 561-568, 2005.

GOMES, L.C.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, p. 426-431, 2001.

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C. S.; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

IWANA, G.; ACKERMAN, A. Anaesthetics. In: Hochachka, P.; Mommsen. **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, v. 3, cap. 1, p. 1-5, 1994.

KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries. **Fisheries**, v. 10, n. 6, p. 2-5, 1985.

MARTINS, M. L. Manejo sanitário na piscicultura. In: Ranzani-Paiva, M. J. T. *et al.* **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela. pt. IV, cap. 15, p. 323-332, 2004.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.231-238, 2003.

MYLONAS, C.C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467-481, 2005.

PARK, M. O.; HUR, W. J.; IM, S. Y.; SEOL, D. W.; LEE, J.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884, 2008.

PEAKE, S. Sodium bicarbonate and clove oil as potencial anesthetics for nonsalmonid fishes. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 18, p. 919-924, 1998.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 240 p., 2008.

SILVA, E. M. P.; OLIVEIRA, R. H. F.; RIBEIRO, M. A. R.; COPPOLA, M. P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1851-1856, 2009.

SNEDDON, L. U. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. **Applied Animal Behaviour Science** , v. 83, p. 153–162, 2003.

SOTO, C.; BURHANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v. 136, p. 149-152, 1995.

STONE, D.; TOSTIN, N. Clove bud oil a big yawn for silver perch. **Fish. NSW Mag. Spring**, v. 19, 1999.

SUMMERFELT, R. C.; SMITH, L. S. Anaesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. **Methods for fish biology**. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, p. 213-272, 1990.

- TORT, L.; PUIGCERVER, M.; CRESPO, S.; PADRÓS, F. Cortisol e haematological response in sea bream and trout subjected to anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 907-910, 2002.
- TYTLER, P.; HAWKINS, A. D. Vivisection, anaesthetics and minor surgery. In: Hawkins, A. D. (Editor). **Aquarium Systems**. Academic Press, New York, NY, p. 247-278, 1981.
- VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; SANTOS NETO, E. B.; DEUS, B. T.; ALBINATI, A. C. L. Influência do peso de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) à ação anestésica do eugenol. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 8, n. 3, p. 212-216, 2007.
- VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; LIRA, A. D.; ALMEIDA, T. R.; SANTOS, G. B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.
- WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, p. 353-366, 2002.
- WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 340-347, 2002.
- WALSH, C.T.; PEASE, B.C. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). **Aquaculture Research**, v. 33, p. 627-635, 2002.
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5 Edition, Prentice Hall, 960 pp., 2009.

## Capítulo II

### Otimização e validação do método para determinação de eugenol em amostras de plasma sanguíneo, fígado e músculo de tilápia, *Oreochromis niloticus*

**Marina Carvalho Delbon<sup>1</sup>**

**Maria José Tavares Ranzani Paiva<sup>2</sup>**

**Flávio Soares<sup>3</sup>**

**Mary Rosa Rodrigues de Marchi<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Estudante de pós-graduação, CAUNESP, Unesp, Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Pesquisadora científica, Instituto de Pesca, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Estudante de pós-graduação, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

<sup>4</sup> Pesquisadora científica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

#### **Resumo**

O eugenol (2-metoxi-4-(2-fenol) propenil) tem sido utilizado por aquicultores para induzir diferentes níveis de anestesia e analgesia. Entretanto, pesquisas sobre as propriedades anestésicas do eugenol em peixes são voltadas principalmente para efeitos comportamentais e fisiológicos sem determinar a sua biodisponibilidade. Objetivou-se desenvolver e validar um método analítico confiável, prático e acessível para identificação do eugenol em amostras de tilápia, *Oreochromis niloticus*. A técnica escolhida foi a cromatografia em fase gasosa (CG) utilizando-se coluna capilar e detector de ionização de chama (DIC). O método analítico apresentou para o analito de interesse, faixa de linearidade de 0,6 a 5 mg L<sup>-1</sup>; limite de detecção de 0,3 mg L<sup>-1</sup>; limite de quantificação de 0,6 mg L<sup>-1</sup>, coeficiente de variação (CV) intra-ensaio (precisão) inferior a 7% e os valores de recuperação de amostras de plasma, fígado e músculo entre 70 e 120%, com CV inferior a 11%. A obtenção de picos cromatográficos com resolução apropriada e ampla faixa de linearidade, que permitiu quantificar com segurança, desde baixas concentrações até níveis elevados de eugenol, revela a utilidade

e confiabilidade desse método CG/DIC na identificação e quantificação do eugenol no plasma sanguíneo, fígado e músculo de tilápia, *O. niloticus*.

**Palavras-chave:** cromatografia gasosa, óleo de cravo, *Oreochromis niloticus*, peixe, resíduo anestésico.

## **Introdução**

Substâncias anestésicas são comumente utilizadas para reduzir a agitação dos peixes, facilitando o trabalho com os animais, além de diminuir o estresse causado pela manipulação dos peixes (Inoue *et al.*, 2003).

As substâncias anestésicas mais utilizadas são triclaína metano sulfonato (MS-222), a quinaldina e o 2-fenoxietanol. No entanto, a utilização destas drogas sintéticas revelaram eficiência anestésica variável e tendem a causar efeitos adversos em peixes, tais como perda de muco, irritação das brânquias e danos na córnea (Marking e Meyer, 1985; Inoue *et al.*, 2003; Pirhonen e Schreck, 2003). A necessidade de descobrir novos anestésicos que apresentam um elevado nível de segurança e melhores resultados têm estimulado a investigação de novos fármacos.

A maioria dos anestésicos usados em peixes é absorvida nos tecidos, via brânquias, levando ao acúmulo de resíduos (Marking e Meyer, 1985). Para eliminar esses resíduos é necessário que o peixe seja submetido ao processo de depuração. O tempo deste processo depende do tipo da droga utilizada, espécie alvo, concentração e da via de administração, que pode ser de algumas horas a várias semanas (Booth, 1988). Mesmo que os resíduos anestésicos presentes nos peixes não sejam prejudiciais ao consumo humano, segundo Stone & Tostin (1999), estes podem afetar o sabor do peixe, quando consumidos.

O único anestésico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) é o MS-222. São necessários 21 dias de depuração para peixes submetidos ao MS-222 e

destinados ao consumo humano (Nochetto *et al.*, 2009). Portanto, a aquicultura demanda a necessidade de um anestésico e/ou sedativo com um reduzido tempo de depuração.

Os primeiros estudos de resíduo anestésico em peixes foram realizados com o MS-222 por métodos colorimétricos (Allen *et al.*, 1970). Estes métodos apresentavam baixa seletividade e não distinguiam os metabólitos da tricafina. Com métodos de extração mais seletivos, resíduos do anestésico MS-222 foram investigados em espécies de peixes, como trutas, *Oncorhynchus mykiss* (Law, 1994), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), striped bass (*Morone saxatilis*), bluegill (*Lepomis macrochirus*), largemouth bass (*Micropterus salmoides*), e mostraram que a quantidade de metabólitos formada é dependente da espécie de peixe estudada (Luhning, 1973). Além disso, o autor mostrou que o ácido 3-aminobenzoico, um dos metabólitos do MS-222, poderia ser formado durante o armazenamento de tecido com resíduos tricafina, mesmo a -12 ° C.

No Brasil, o anestésico mais utilizado é a benzocaína, um composto químico com propriedades físicas semelhantes às da tricafina. Resíduos deste anestésico foram detectados em tecidos e fluídos de bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) em uma concentração de 1-2 ppm (Szoke *et al.*, 1997) e em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a 24 ppb (Meinertz *et al.*, 1999), utilizando cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta (HPLC-UV).

O eugenol, derivado do óleo de cravo (*Eugenia aromatica*), é um anestésico alternativo para peixes bastante divulgado nos últimos tempos por ser um produto natural, apresentando poucos riscos ao ambiente e aos animais (Cho & Heath, 2000; Inoue *et al.*, 2003; Iversen *et al.*, 2003; Tort *et al.*, 2002). Trabalhos com a aplicação do eugenol têm demonstrado sua eficácia como anestésico por apresentar concentrações eficientes e seguras para os peixes e possuir boa capacidade em reduzir respostas

metabólicas do estresse (Munday & Wilson, 1997; Sladky *et al.* 2001; Pirhonen e Schreck, 2003; Small, 2003).

De acordo com Guenete *et al.* (2007), estudando os parâmetros farmacocinéticos do eugenol em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, mostraram que a meia-vida do eugenol é de 12,14 horas. O desempenho anestésico do eugenol é melhor que o de outras substâncias já utilizadas (Wagner *et al.*, 2003) e não demonstra efeitos deletérios aparentes nos peixes após sua utilização (Woody *et al.*, 2002).

A FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) (2007) prescreve como aceitável ingestão diária (IDA) de 2,5 mg eugenol kg<sup>-1</sup> para humanos. Em peixes anestesiados com 450 mg L<sup>-1</sup> de óleo de cravo e depurados por uma semana antes de serem abatidos para consumo, ocorreu retenção em seus tecidos de apenas 0,32 mg kg<sup>-1</sup> de eugenol (Kildea *et al.*, 2004).

Além disso, o eugenol apresenta curto tempo de indução e longo tempo de recuperação anestésica, ideais para procedimentos mais demorados, comparado com o MS-222, nas mesmas concentrações (Keene *et al.*, 1998).

Como a determinação de eugenol é essencial para avaliar o resíduo deste anestésico, o objetivo deste estudo foi otimizar e validar um método analítico rápido e de baixo custo para a determinação de eugenol em amostras (plasma sanguíneo, fígado e músculo) de tilápia, *Oreochromis niloticus* a partir da injeção por *headspace* no sistema cromatográfico gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC).

O *headspace* é uma técnica utilizada para analisar compostos voláteis e semi-voláteis em baixas concentrações (Wasfi, 2004; Ventorin, 2004). Nesta técnica, a principal característica é a possibilidade da determinação de componentes voláteis da amostra a ser estudada de forma direta. Além disso, o *headspace* possibilita a introdução da amostra sem pré-tratamento no cromatógrafo a gás (Gobato & Lanças, 2001).

## **Materiais e métodos**

### **Animais para experimentação**

O estudo foi conduzido no laboratório do Instituto de Química da UNESP, em Araraquara/SP. Foram utilizados 80 tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* revertidos sexualmente, com peso médio de  $58,34 \pm 5,16$  g e  $16,55 \pm 0,67$  cm, mantidas em um tanque circular com volume de 500 litros.

Foram coletadas 100  $\mu$ L de plasma, 5 g de músculo e 5 g de fígado de todos os peixes. Para as amostras do plasma, o sangue foi coletado com auxílio de seringas e agulhas heparinizadas. Uma alíquota do sangue foi centrifugada para obtenção de 100  $\mu$ L plasma. Posteriormente, as tilápias foram sacrificadas por punção cerebral para a retirada de 5 g de músculo (sem a pele) e 5 g de fígado.

### **Padrões e solventes**

Padrões de alta pureza (> 99%) de eugenol e mentol, utilizados como padrão analítico e padrão interno, respectivamente, foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As soluções estoque de eugenol e mentol foram preparadas em metanol na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ . Posteriormente, por diluições sucessivas das soluções estoque foram obtidas as soluções padrão de eugenol de diferentes concentrações e então injetadas no CG/DIC, em triplicata.

Metanol, grau HPLC, foi adquirido da Tedia Company (Fairfield, EUA).

### **Condições cromatográficas**

Foi utilizado equipamento de cromatografia em fase gasosa equipado com detector de ionização de chama (DIC), Varian 3800 (Walnut Creek, EUA) nas seguintes condições: injeção *splitless*; coluna capilar DB-5 – 5% fenil, 95% metilpolisiloxano (J&W Scientific, Folsom, EUA) com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu$ m de espessura do filme. As temperaturas do injetor e detector foram

250 °C e 300 °C, respectivamente; a temperatura do forno foi programada a partir de 80 °C e aquecida a uma razão de 3 °C/min até 140 °C e novamente aquecida a 20 °C/min até 250 °C, permanecendo por 5 minutos nesta última temperatura. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a uma vazão constante de 1 mL/min. As vazões dos gases do detector DIC foram de 40 mL min<sup>-1</sup> para nitrogênio, 25 mL min<sup>-1</sup> para hidrogênio e 325 mL min<sup>-1</sup> para ar sintético.

O equipamento foi operado pelo software Varian, Galaxie, programa responsável pela aquisição e processamento dos dados. As injeções de 100 µL do *headspace* (vapor em equilíbrio com a solução padrão, ou com a amostra), foram feitas manualmente.

#### **Avaliação da linearidade e construção da curva analítica**

Após otimizar as condições cromatográficas, a linearidade foi avaliada pela análise de soluções padrão de eugenol (em metanol) nas concentrações: 0,30; 0,60; 1,00; 1,25; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00 e 5,00 mg L<sup>-1</sup>, adicionadas a 100 mg L<sup>-1</sup> de mentol (padrão interno).

As soluções padrão, totalizando volume de 20 mL, foram adicionadas a vials de 40 mL com tampa de rosca e septo de silicone faceado em Teflon<sup>MR</sup>, próprios para *headspace*. O *headspace* de cada uma das soluções foi analisado em sextuplicata. Essas soluções foram analisadas em ordem crescente de concentração e seguindo as condições preconizadas no item Condições cromatográficas.

Com os resultados obtidos construiu-se o gráfico de linearidade (Área/concentração vs concentração), de acordo com o recomendado por Ribani *et al.* (2004). Os pontos inseridos dentro do intervalo de linearidade foram utilizados para construção da curva analítica (área vs concentração).

## **Precisão**

Para a determinação da precisão foram utilizadas soluções padrão nas concentrações: 1,00; 2,00 e 4,00 mg L<sup>-1</sup> de eugenol em metanol, adicionadas a 100 mg L<sup>-1</sup> de mentol (padrão interno), analisadas em sextuplicada, da mesma maneira descrita para a construção da curva analítica. Estes valores foram selecionados por possuírem concentrações dentro da faixa linear utilizada. A precisão foi estimada através dos coeficientes de variação (CV).

## **Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação do método foram preparadas soluções em triplicata de eugenol nas seguintes concentrações 0,10; 0,20; 0,30; 0,60 e 1,00 mg L<sup>-1</sup> em metanol. As soluções foram injetadas em ordem decrescente de concentração.

Para as determinações de LD e LQ foram calculadas a partir da curva de linearidade, também conhecida como gráficos de resíduos ou Teste de Huber. Neste caso o limite de detecção é o ponto mais próximo ao limite inferior do intervalo linear, e que não pertença à linearidade. Já, o limite de quantificação, é o limite inferior do intervalo de linearidade.

## **Recuperação**

Para a avaliação da recuperação do método foram empregadas amostras de plasma, fígado e músculo de tilápias controle que não foram expostos ao anestésico utilizado no experimento.

As amostras (100 µL de plasma e 5 g de músculo ou fígado) foram transferidas para vials de 40 mL com tampa de rosca e septo de silicone faceado em Teflon<sup>MR</sup>, próprios para *headspace*. Posteriormente, foram adicionadas as soluções padrões em concentrações equivalentes a 3,00; 6,00; 9,00; 12,00 e 15,00 µg g<sup>-1</sup> de músculo e fígado

e 0,60; 0,70; 0,80; 0,90 e 1,00  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de plasma, totalizando volume de 20 mL. Também foi adicionado 100 mg  $\text{L}^{-1}$  de mentol como padrão interno em uma concentração de 25 mg  $\text{L}^{-1}$ . O vial foi vedado e agitado com o auxílio de vortex por 2 minutos para homogeneização da solução.

As amostras fortificadas desta maneira foram mantidas em frascos hermeticamente fechados (40 mL, especial para *headspace*) e deixadas em repouso por: 30, 60, 90 e 120 min, para avaliação do melhor tempo de contato. Após este período, as amostras foram aquecidas a 35°C esta temperatura foi escolhida para evitar que nestas condições não deverá ocorrer deterioração das amostras e eliminar compostos que poderiam interferir na análise. Avaliou-se a recuperação obtida quando empregado o aquecimento por: 15, 30, 45 e 60 min. Os ensaios foram efetuados em sextuplicata seguindo o procedimento descrito para as soluções padrão.

## Resultados e discussão

Após a corrida cromatográfica dos padrões de eugenol e mentol, ambos na concentração de 100 mg  $\text{L}^{-1}$  (Figura 1), os tempos de retenção apresentados foram de 10,73 e 17,52 minutos, respectivamente.

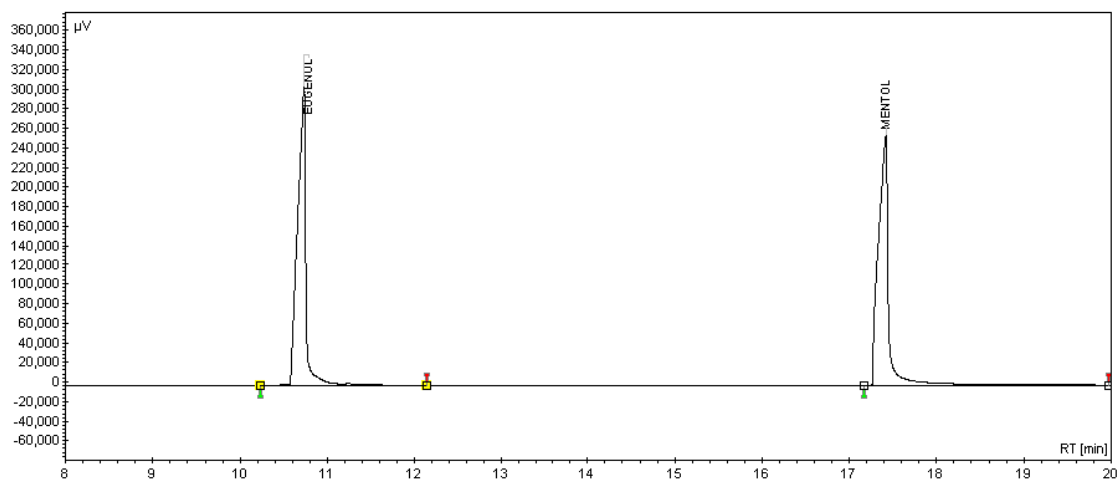


Figura 1: Cromatograma das soluções padrões de eugenol e mentol injetados na concentração de 100 mg  $\text{L}^{-1}$ .

Verifica-se pelo cromatograma que os picos cromatográficos referentes ao eugenol e mentol estão bem definidos e separados.

A partir das concentrações de 0,30 a 5,00 mg L<sup>-1</sup> de eugenol (em metanol), obteve-se o gráfico da linearidade (Figura 2).

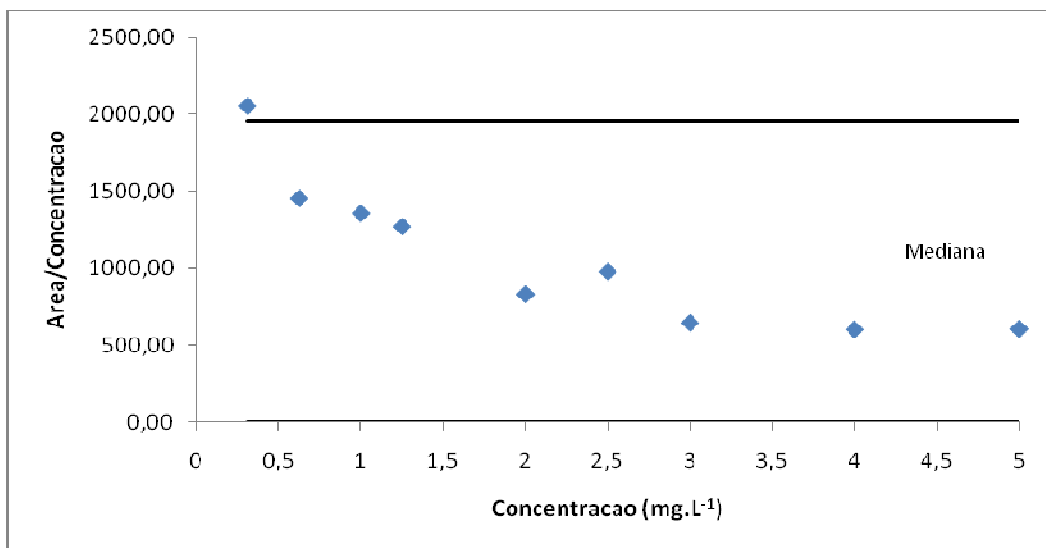


Figura 2: Representação da linearidade correlacionando Área/Concentração vs Concentração.

Valores superiores a 1956,22 e inferiores a 3,04 foram rejeitados a partir do teste de Huber, com  $k=2$ . Ou seja, a concentração de 0,30 mg L<sup>-1</sup> de eugenol foi excluída para a curva de calibração.

A tabela 1 contém os resultados obtidos no cálculo de linearidade para os pontos da curva analítica, a equação da curva utilizada para quantificação do eugenol e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) da curva analítica.

Tabela 1: Resultados referentes ao estudo da linearidade tendo como base a concentração de eugenol e a área média obtida após as injeções no sistema cromatográfico (n =6).

| Concentração (mg mL <sup>-1</sup> ) | Área média | CV (%) |
|-------------------------------------|------------|--------|
| 0,60                                | 1363,80    | 3      |
| 1,00                                | 1433,18    | 7      |
| 1,25                                | 1565,03    | 6      |
| 2,00                                | 1665,10    | 3      |
| 2,50                                | 2046,00    | 9      |
| 3,00                                | 1944,07    | 14     |
| 4,00                                | 2418,13    | 2      |
| 5,00                                | 3043,87    | 10     |

Equação da curva analítica para eugenol:  $y = 362,67x + 1057,70$ ;  
Coeficiente de correlação  $r^2 = 0,95$

A curva de calibração foi linear nas faixas de concentração estudadas para o fármaco analisado: eugenol (0,60 a 5,00 mg L<sup>-1</sup>). A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação foi  $y = 362,67x + 1057,70$ , com  $r^2 = 0,95$ , onde y representa a área do pico produzido pelo analito e x corresponde à concentração do analito. Na figura 3 está representada a curva analítica para o eugenol.

O padrão interno, mentol, foi adicionado à amostra antes do processamento para avaliação da eficiência (recuperação) do método. A área média da recuperação do mentol, para os pontos da curva analítica, foi de  $1331,09 \pm 24,50$ .

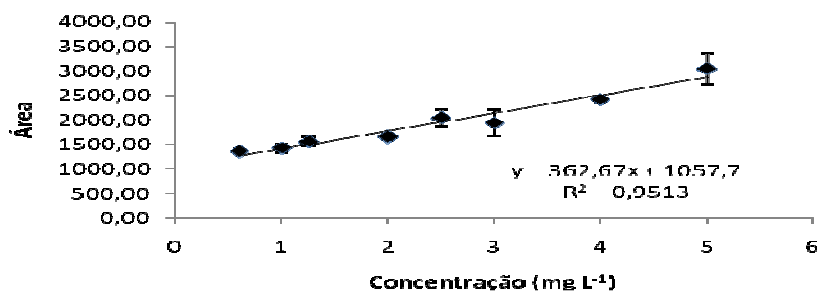


Figura 3: Curva analítica do eugenol na faixa de concentração de 0,60 a 5,00 mg L<sup>-1</sup>.

A curva analítica obtida para o eugenol foi linear, apresentando coeficiente de correlação (r) superior a 0,95 (Tabela 1), sendo que o Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial recomenda um coeficiente de correlação acima de

0,90 (INMETRO, 2003). Este coeficiente de correlação foi satisfatório, o que demonstra que a resposta do detector foi linear no intervalo de concentração empregado nesse estudo (Ribani *et al.*, 2004).

Neste estudo a precisão do método foi avaliada referente ao nível de repetibilidade. A repetibilidade apresenta a concordância entre os resultados de medidas sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições que são chamadas condições de repetibilidade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo equipamento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em curto intervalo de tempo (Ribani *et al.*, 2004).

A International Conference on Harmonization (ICH, 1995) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado no procedimento empregado, três níveis, três repetições para cada um, ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (Ribani *et al.*, 2004).

A precisão do procedimento de preparação de soluções padrão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos (n=6), ao nível de repetitividade, portanto, feita em um curto intervalo de tempo (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados do estudo da precisão do método para determinação do eugenol (n = 6).

| <b>Composto</b> | <b>Concentração adicionada<br/>(mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Concentração média<br/>obtida (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>CV (%)</b> |
|-----------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------|
| Eugenol         | 1,00                                                   | 1,03                                                     | 3             |
|                 | 2,00                                                   | 1,91                                                     | 7             |
|                 | 4,00                                                   | 4,11                                                     | 4             |

Para o estudo da precisão, os intervalos dos coeficientes de variação são considerados aceitáveis, estando dentro do limite aceito para validação de métodos cromatográficos que deve ser menor que 15% (Prestes *et al.*, 2007), dependendo da complexidade da amostra. Para este método, os intervalos dos coeficientes de variação

variaram de 3 a 7% (Tabela 2) e inferiores aos valores obtidos por Ribani *et al.* (2004), sendo, portanto, considerado preciso e dentro da faixa aceitável para a validação dos métodos analíticos. Os resultados deste trabalho corroboram com os apresentados por Meinertz *et al.* (2008), que avaliaram a precisão do método em cromatografia líquida para isoeugenol em dez espécies de peixes de água doce.

O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração do analito detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, ambos sob as condições experimentais previamente estabelecidas (ANVISA, 2003). Os valores dos LOD e LOQ foram 0,30 e 0,60 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Corroborando com os resultados deste estudo, Li *et al.* (2004), durante validação de um método por cromatografia líquida, obtiveram um limite de detecção (LOD) para eugenol de 0,51 mg L<sup>-1</sup>.

Para extrações das amostras de plasma, após a agitação, o tempo de fortificação ideal (com maior recuperação) foi de 90 min, e posteriormente 45 min de aquecimento a 35 °C. As amostras de fígado, após homogeneização, permaneceram 30 min em contato com o anestésico e 45 min na estufa a 35 °C. Em relação às amostras de músculo, o tempo necessário para fortificação foi de 60 min e, em seguida, 45 min de aquecimento a 35 °C.

A exatidão e precisão do procedimento proposto foram avaliadas mediante análises de recuperação com amostras fortificadas.

As porcentagens de recuperações do eugenol em plasma sanguíneo, fígado e músculo de exemplares de tilápia, *Oreochromis niloticus*, para os cinco níveis de

fortificação estudados foram de 0,60; 0,70; 0,80; 0,90 e 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de plasma sanguíneo e 3,00; 6,00; 9,00; 12,00 e 15,00  $\mu\text{g g}^{-1}$  de músculo e fígado (Tabela 3).

Tabela 3: Porcentagens de recuperação de eugenol em amostras de plasma sanguíneo, fígado e músculo de tilápia, *Oreochromis niloticus* (n = 6).

| <b>Amostra</b>                             | <b>Concentração da Fortificação</b> | <b>Concentração encontrada</b> | <b>Recuperação (%)</b> | <b>CV (%)</b> |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------|
| Plasma sanguíneo ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 0,60                                | 0,54                           | 94                     | 4             |
|                                            | 0,70                                | 0,72                           | 103                    | 5             |
|                                            | 0,80                                | 0,76                           | 91                     | 10            |
|                                            | 0,90                                | 0,84                           | 78                     | 5             |
|                                            | 1,00                                | 0,94                           | 71                     | 9             |
| Fígado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )            | 3,00                                | 3,60                           | 120                    | 5             |
|                                            | 6,00                                | 6,78                           | 113                    | 2             |
|                                            | 9,00                                | 9,99                           | 111                    | 4             |
|                                            | 12,00                               | 11,40                          | 95                     | 5             |
|                                            | 15,00                               | 14,10                          | 94                     | 9             |
| Músculo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )           | 3,00                                | 3,33                           | 111                    | 2             |
|                                            | 6,00                                | 6,18                           | 103                    | 1             |
|                                            | 9,00                                | 8,55                           | 95                     | 6             |
|                                            | 12,00                               | 11,52                          | 96                     | 2             |
|                                            | 15,00                               | 11,10                          | 74                     | 3             |

Os valores de recuperação encontram-se entre 70 e 120%, com  $\text{CV} < 11\%$ , o que está de acordo com o aceitável para amostras complexas (ANVISA, 2003; Ribani *et al.*, 2004).

Na comparação entre as amostras (Figura 2), nota-se que, praticamente, as recuperações decrescem com o aumento da concentração adicionada, sendo principalmente significativo este decréscimo para as amostras de músculo e menos significativo para o fígado.

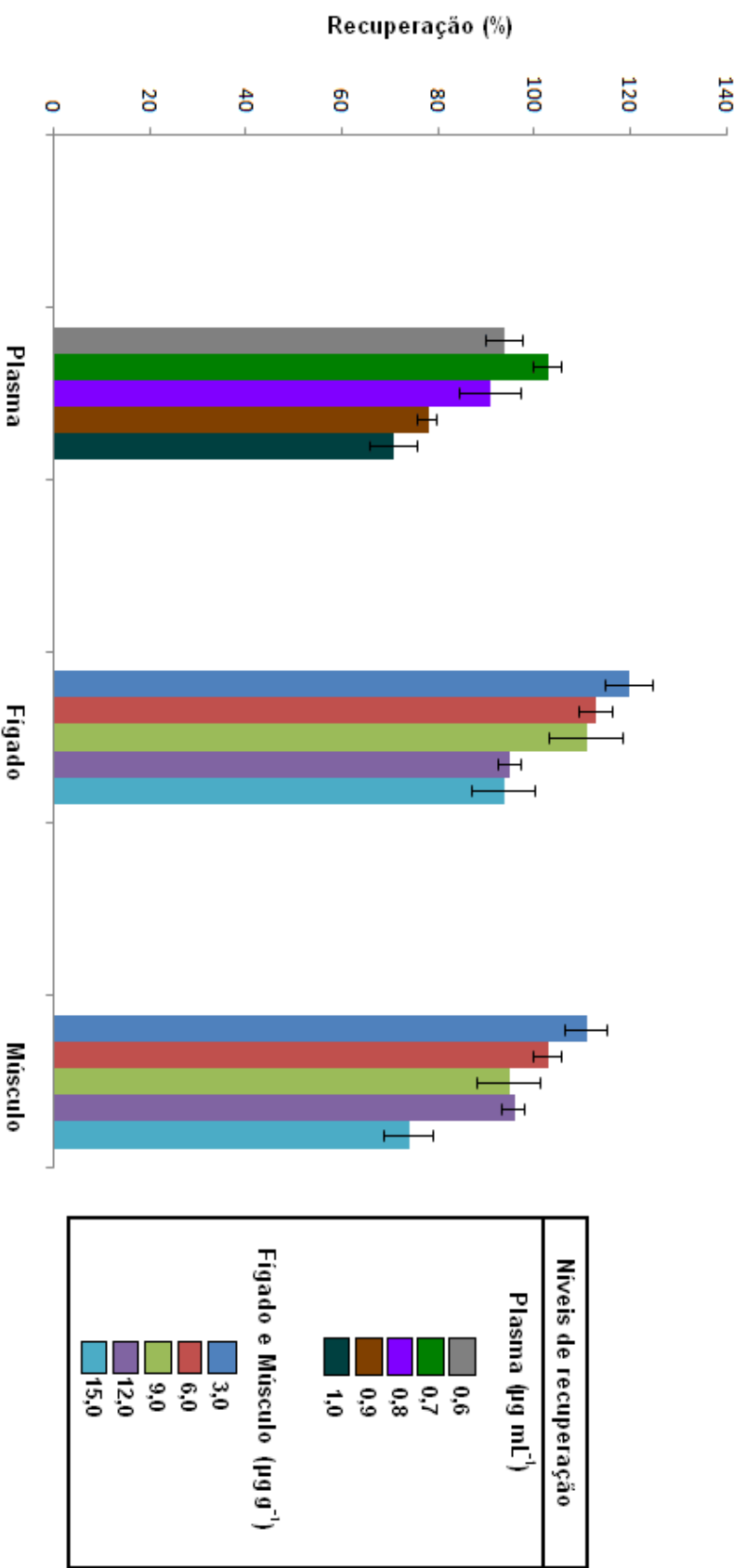


Figura 4: Representação gráfica da porcentagem de recuperação realizada com amostras de tilápia fortificadas com eugenol.

Corroborando com os resultados deste trabalho, Meinertz *et al.* (2006), fortificaram três amostras de músculo (5 g) de trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* com isoeugenol (isômero do eugenol) resultando em uma concentração nominal de 8 µg g<sup>-1</sup>. Os dados das respectivas amostras apresentaram-se entre 86,4 a 96,9%, com precisão de 1,1 a 9,6%.

Meinertz *et al.* (2009), fortificando amostras de músculo de trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* em concentração inferior a apresentada neste estudo (0,02273 µg g<sup>-1</sup> de isoeugenol) obtiveram recuperação semelhante (88,8 a 95,8%, com precisão de 1,2 a 3,8%).

Os valores apresentados neste trabalho foram semelhantes aos mostrados em outros estudos, comprovando a eficácia deste método em experimento futuros.

## **Conclusão**

O método estudado e validado para determinação de eugenol, utilizando-se a análise do *headspace* das amostras de plasma sanguíneo, fígado e músculo de tilápias, *O. niloticus* por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama demonstrou ser prático, rápido e eficiente, podendo ser aplicado ao estudo de resíduos de eugenol.

## **Referências bibliográficas**

ALLEN, J. L.; LUHNING, C. W.; HARMAN, P. D.: Identification of MS-222 residues in selected fish tissues by thin layer chromatography. U.S. Fish Wildl. Serv. **Investment Fish Control**, v. 41, p. 1-7, 1970.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003.

BOOTH, N. H. Drug and chemical residues in the edible tissues of animals. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. (Eds.). **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 6<sup>th</sup> ed. Iowa State Univ. Press, Iowa, p. 1149-1159, 1988.

CHO, G. K.; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Watbaum). **Aquaculture Research**, v. 31, p. 537-546, 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fish Stats Plus**: universal software for fishery statistical time series: version 2.32. Rome, 2007.

GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, F. M. Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xileno (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 176-179, 2001.

GUENETTE, S. A.; UHLAND, F. C.; HELIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 266, p. 262–265, 2007.

ICH: Toxicokinetics – Guidance on the assessment of systemic exposure in toxicity studies. Topic S3A, Step 5, **ICH Harmonized Tripartite Guideline**. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1995

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 1. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, 2003.

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C. S.; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; HEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265-277, 2004.

LAW, F. C. P. **Total Residue Depletion and Metabolic Profile of Selected Drugs in Trout**, Contract Number 223-90-7016, U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC, 1994.

LI, Y. H.; HAO, Z. H.; ZHENG, P. Determination of Vanillin, Eugenol and Isoeugenol by RP-HPLC. **Chromatographia**, v. 60, n. 11/12, p. 709-713, 2004.

LUHNING, C. W. Residues of MS-222, benzocaine, and their metabolites in striped bass following anesthesia. **U.S. Fish and Wildlife Service Investigations in Fish Control**, p. 52., 1973.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries. **Fisheries**, v. 10, n. 6, p. 2-5, 1985.

MEINERTZ, J. R.; STEHLY, G. R.; HUBERT, T. D.; BERNARDY, J. A. Liquid chromatographic determination of benzocaine and *N*-acetylbenzocaine in the edible fillet tissue from rainbow trout. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 255-260, 1999.

MEINERTZ, J. R.; GRESETH, S. L.; SCHREIER, T. M.; BERNARDY, J. A.; GINGERICH, W. H. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S™ at different temperatures, durations, and concentrations. **Aquaculture**, v. 254, p. 347–354, 2006.

MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M.; BERNARDY, J. A. Evaluation of a Method for Determining Concentrations of Isoeugenol, an AQUI-S™ Residue, in Fillet Tissue from Freshwater Fish Species. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 4, p. 884-891, 2008.

MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-S™ exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 296, p. 200–206, 2009.

- MUNDAY, P. L.; WILSON, S. K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. **J. Fish Biol.**, v. 51, p. 931-938, 1997.
- NOCHETTO, C. B.; REIMSCHUESSEL, R.; GIESEKER, C.; CHEELY, C. S.; CARSON, M. C. Determination of Tricaine Residues in Fish by Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 4, 2009.
- PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO<sub>2</sub> on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.224, p. 1-8, 2003.
- PRESTES, O. D., PRESTA, M. A., KOLBERG, I. S., ZANELLA, R. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. **Química Nova**, v.30, n.1, p.18-21, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; LOURENÇO, J. N. P.; FONSECA, F. A. L.; SANTOS, P.J. O.; VAL, A. L. Efficacy of eugenol as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. International Congress on biology of fishes. **Tropical fish: news and news**, p. 93-96, 2001.
- SLADKY, K. K.; SWANSON, C. R.; STOSKOPF, M. K.; LOOMIS, M. R.; LEWBART, G. A. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.

- SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p.177-185, 2003.
- STONE, D.; TOSTIN, N. Clove bud oil a big yawn for silver perch. **Fisheries NSW Magazine Spring**, v. 19, 1999.
- SZOKÉ, A.; HAYTON, W. L.; SCHULTZ, I. R. Quantification of benzocaine and its metabolites in channel catfish tissues and fluids by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 69-75, 1997.
- TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESPO, S.; PADRÓS, F. Cortisol e haematological response in sea bream and trout subjected to anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 907-910, 2002.
- VENTORIN, M. V. P. Relação entre a dosagem de etanol no sangue e na saliva. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
- WAGNER, G. N.; SINGER, T. D.; McKINLEY, R. S. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1139-1146, 2003.
- WASFI, I. A., *et al.* Rapid and sensitive static headspace gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 331–336, 2004.
- WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 340-347, 2002.

### Capítulo III

#### Alterações hematológicas e análises residuais de tilápias, *Oreochromis niloticus*, anestesiadas com eugenol

**Marina Carvalho Delbon<sup>1</sup>**

**Maria José Tavares Ranzani Paiva<sup>2</sup>**

**Mary Rosa Rodrigues de Marchi<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Estudante de pós-graduação, CAUNESP, Unesp, Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Pesquisadora científica, Instituto de Pesca, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Pesquisadora científica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

#### **Resumo**

Os anestésicos são utilizados na aquicultura para auxiliar o manejo, visando amenizar o estresse causado por essa atividade. A partir da concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol para anestésiar tilápia, delineou-se um experimento com o objetivo de analisar os parâmetros hematológicos e resíduos do anestésico eugenol em 100µL de plasma e 5 g de músculo e fígado de tilápias, ao longo de 24 horas de depuração anestésica, por cromatografia gasosa acoplado ao detector de ionização de chama (CG-DIC). Com estas análises, concluiu-se que a concentração de anestésico aplicada não teve interferência sobre os parâmetros hematológicos de tilápia. Avaliando a quantidade de resíduo de eugenol nas matrizes biológicas, por cromatografia gasosa, após 24 horas de depuração anestésica não houve eliminação total do fármaco.

**Palavras-chave:** cromatografia, óleo de cravo, resíduo anestésico, sangue.

## Introdução

Nos sistemas de produções aquícolas os desafios naturais se somam àqueles impostos pela atividade, como práticas de manejo, transporte, tratamentos e altas densidades de estocagem. Desse modo, os peixes precisam encontrar meios de lidar com os desafios para garantir a sobrevivência. O somatório das mudanças fisiológicas desencadeadas quando o peixe reage a desafios químicos, físicos ou biológicos mais a tentativa de compensação é referida como resposta ao estresse (Wedemeyer *et al.*, 1990).

Para auxiliar os manejos, visando amenizar a intensidade do estresse em atividades como transporte, pesagem, marcação, têm-se utilizado anestésicos. O uso de anestésicos auxilia na diminuição do estresse, à medida que reduzem a atividade e o metabolismo dos peixes, reduzindo injúrias físicas, consumo de oxigênio e excreção de metabólicos tóxicos (Iwana & Ackerman, 1994; Pirhonen & Schreck, 2003).

A tricafina metanosulfonato (MS-222) é o único anestésico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA). No Brasil, a aplicação anestésica mais comum é a benzocaína com potencial de ação é semelhante ao MS-222 (Ross & Ross, 2008). No entanto, de acordo com Ross & Ross (2008) são necessários 21 dias de depuração para comercialização dos peixes utilizados para consumo humano, que foram anestesiados com este fármaco. Essa restrição limita aplicações de anestésicos e promove a pesquisa e o desenvolvimento de um alternativo que permita a liberação imediata dos peixes expostos a ele.

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um produto de origem natural, derivado das flores e das folhas do cravo das espécies *Eugenia caryophyllata* e *E. aromatica* (Isaacs, 1983). De acordo com Keene *et al.*, 1998, o eugenol trata-se de um anestésico de grande

eficácia, ampla margem de segurança para o peixe e ausência de toxicidade para o operador, nas doses utilizadas para peixes.

Segundo Yang *et al.* (2003), o eugenol provoca depressão do sistema nervoso central por meio da interação com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, com efeito agonista sobre o ácido gama-amino-butírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato, que atua sobre os receptores N-metil-daspartato (NMDA). De acordo com Wagner *et al.* (2002), este fármaco é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não requerendo tempo de carência.

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros hematológicos e os tempos de eliminação residual do anestésico eugenol nas amostras (plasma, fígado e músculo) de tilápia, *Oreochromis niloticus* ao longo de 24 horas após as induções anestésicas.

## **Materiais e métodos**

### **Animais para experimentação**

O estudo foi conduzido no laboratório do Instituto de Pesca-APTA-SAA, em São Paulo/SP. Foram utilizados 80 tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* revertidos sexualmente, com peso médio de  $53,19 \pm 9,87$  g e  $14,74 \pm 0,89$  cm, mantidas em um tanque circular com volume de 500 litros.

### **Parâmetros físicos e químicos da água**

A água utilizada no experimento foi proveniente do abastecimento urbano. O cloro residual desta fonte foi eliminado por meio do processo de filtragem seguido de forte aeração. Para manutenção dos parâmetros físicos e químicos da água, o tanque foi reabastecido por sistema de circulação de água, dotado de filtro biológico. Os parâmetros monitorados diariamente foram: temperatura (°C), pH, condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) e oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

## **Padrões e solventes**

Padrões de alta pureza ( $> 99\%$ ) de eugenol e mentol, obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha), foram utilizados nas análises cromatográficas e nos experimentos anestésicos com peixes. As soluções estoque de eugenol e mentol foram preparadas em metanol na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

Metanol, grau HPLC, foi adquirido da Tedia Company (Fairfield, EUA).

## **Fase experimental**

As tilápias, *O. niloticus* ( $n=80$ ) foram individualmente expostas às concentrações de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de eugenol. Esses peixes foram anestesiados até atingirem o estágio anestésico profundo, com mínimos movimentos operculares (Woody *et al.*, 2002).

Após as induções anestésicas, dez peixes foram imediatamente retirados do aquário, pesados, medidos e o sangue coletado do vaso caudal, para posterior análises hematológicas. Estes peixes foram amostrados antes da depuração anestésica, ou seja, no tempo de experimentação zero.

Os demais peixes anestesiados foram mantidos em aquários sem anestésicos para recuperação e eliminação residual do fármaco. Os tempos de amostragem foram 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas após as induções anestésicas. Dez peixes de cada tempo foram anestesiados com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de benzocaína (para não interferir nas análises residuais do anestésico eugenol), pesados, medidos e o sangue colhido.

Para a avaliação dos tempos de eliminações residuais do anestésico, três peixes por tempo (0, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas) foram sacrificados por punção cerebral. Plasma sanguíneo ( $100 \mu\text{L}$ ), músculo sem a pele (5 g) e fígado (5 g) foram retirados. Adicionou-se, nestas amostras  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de mentol utilizado como padrão interno. As amostras foram congeladas imediatamente, para posterior análises dos metabólitos.

As amostras de plasma sanguíneo, músculo e fígado foram armazenadas em freezer a -18°C, conforme Kildea *et al.* (2004), no Instituto de Pesca-APTA-SAA – São Paulo/SP para posteriormente serem analisadas por CG-DIC no Instituto de Química da UNESP – Araraquara/SP.

### **Análises hematológicas**

O sangue foi coletado com auxílio de seringas e agulhas heparinizadas. Uma alíquota do sangue foi centrifugada para obtenção do plasma e determinado o resíduo de eugenol.

Determinou-se o número total de células (RBC), em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Hayem como diluente; hematócrito (Ht), pelo método do microhematócrito, segundo Goldenfarb *et al.* (1971); taxa de hemoglobina (Hb), pelo método da cianometahemoglobina, segundo Collier (1944). Com os valores de Hb, RBC e Ht foram calculados os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média).

As extensões sanguíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo Rosenfeld (1947), foram utilizadas para as contagens diferencial e total dos leucócitos e contagem total de trombócitos, sendo as duas últimas pelo método indireto, segundo Hrubé & Smith (1998).

### **Condições cromatográficas**

Foi utilizado equipamento de cromatografia em fase gasosa equipado com detector de ionização de chama (DIC), Varian 3800 (Walnut Creek, EUA) nas seguintes condições: injeção *splitless*; coluna capilar DB-5 – 5% fenil, 95% metilpolissiloxano (J&W Scientific, Folsom, EUA) com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. As temperaturas do injetor e detector foram 250 °C e 300 °C, respectivamente; a temperatura do forno foi

programada a partir de 80 °C e aquecida a uma razão de 3 °C min<sup>-1</sup> até 140 °C e novamente aquecida a 20 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C, permanecendo por 5 minutos nesta última temperatura. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a uma vazão constante de 1 mL min<sup>-1</sup>. As vazões dos gases do detector DIC foram de 40 mL min<sup>-1</sup> para nitrogênio, 25 mL min<sup>-1</sup> para hidrogênio e 325 mL min<sup>-1</sup> para ar sintético.

O equipamento foi operado pelo software Varian, Galaxie, programa responsável pela aquisição e processamento dos dados. As injeções de 100 µL do *headspace* (vapor em equilíbrio com a solução padrão, ou com a amostra), foram feitas manualmente.

### **Análises residuais do anestésico eugenol**

As amostras, com volume de 20 mL, foram adicionadas a vials de 40 mL com tampa de rosca e septo de silicone faceado em Teflon<sup>MR</sup>, próprios para *headspace* (100 µL de plasma sanguíneo, 5 g de músculo e 5 g de fígado). Também foi adicionado 25 mg L<sup>-1</sup> de mentol como padrão interno. O vial foi vedado e agitado por 2 minutos em vortex para homogeneização da solução.

As amostras foram mantidas em frascos hermeticamente fechados (40 mL, especial para *headspace*) e deixadas em repouso por 90 min para o plasma; 30 min para o fígado; e 60 min para o músculo. Após este período, as amostras foram aquecidas a 35°C por 45 minutos. Esta temperatura foi escolhida por acreditar-se que nestas condições não deverá ocorrer deterioração das amostras. Os ensaios foram efetuados em triplicata seguindo o procedimento padrão.

A meia-vida ( $T_{1/2}$ ) foi calculada usando 0.693/kel (Guenette *et al.*, 2007). Para determinação da taxa da constante de eliminação (kel) do anestésico, utilizou-se a média das três menores concentrações de eugenol de plasma mensuráveis.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, ao teste de Tukey para comparação entre as médias aritméticas, adotando-se o nível de significância de 5% (Zar, 2009).

## Resultados e discussão

Os valores médios e erros padrões da temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água dos aquários durante o período experimental foram de  $25,80 \pm 0,70$  °C,  $7,10 \pm 0,30$ ,  $7,08 \pm 0,43$  mg L<sup>-1</sup> e  $125,30 \pm 17,40$  µS cm<sup>-1</sup>, respectivamente, resultados considerados dentro da faixa de conforto recomendada por Martins (2004), para a espécie.

Os valores médios e erro padrão dos parâmetros hematológicos para *O. niloticus* estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos de tilápias, amostradas logo após a indução anestésica (tempo 0) e nos diferentes tempos de eliminações residuais de eugenol.

| Tempos (h) | Ht (%)                   | Hb (g dL <sup>-1</sup> ) | RBC (10 <sup>4</sup> µL <sup>-1</sup> ) | VCM (fL)  | CHCM (g dL <sup>-1</sup> ) |
|------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|-----------|----------------------------|
| 0          | 24,80±2,02 <sup>ab</sup> | 6,66±0,28 <sup>NS</sup>  | 179,00±11,23 <sup>b</sup>               | 1,39±0,17 | 270,36 ± 8,55              |
| 0,5        | 24,89±2,23 <sup>ab</sup> | 6,71±0,26 <sup>NS</sup>  | 168,20±17,12 <sup>ab</sup>              | 1,51±0,20 | 270,38 ± 9,41              |
| 1          | 23,40±1,74 <sup>ab</sup> | 6,84±0,17 <sup>NS</sup>  | 151,10±15,59 <sup>ab</sup>              | 1,57±0,22 | 293,95± 8,11               |
| 2          | 20,93±1,99 <sup>a</sup>  | 6,97±0,26 <sup>NS</sup>  | 161,25±23,51 <sup>ab</sup>              | 1,55±0,33 | 336,43 ± 22,33             |
| 4          | 22,50±3,46 <sup>ab</sup> | 6,77±0,35 <sup>NS</sup>  | 144,80±18,87 <sup>a</sup>               | 1,57±0,29 | 309,29 ± 19,36             |
| 8          | 24,95±3,94 <sup>ab</sup> | 6,85±0,29 <sup>NS</sup>  | 154,15±27,15 <sup>ab</sup>              | 1,69±0,52 | 283,21 ± 19,10             |
| 12         | 25,78±2,37 <sup>b</sup>  | 6,68±0,29 <sup>NS</sup>  | 165,55±24,44 <sup>ab</sup>              | 1,59±0,29 | 261,71 ± 10,52             |
| 24         | 23,11±3,55 <sup>ab</sup> | 6,89±0,57 <sup>NS</sup>  | 172,89±19,24 <sup>ab</sup>              | 1,35±0,22 | 307,59 ± 23,16             |

Ht=hematócrito, Hb=taxa de hemoglobina, RBC= número de eritrócitos, VCM=volume corpuscular médio, CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média

NS: não significativo

Médias com letras distintas na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Média ± erro padrão.

Considerando-se os resultados dos parâmetros sanguíneos verificaram-se diferenças estatísticas (p<0,05) entre os tempos de depuração anestésica para o hematócrito (Ht) e para o número total de eritrócitos (RBC).

Em relação aos valores de hematócrito, duas horas após a indução anestésica, o sangue dos peixes anestesiados com eugenol mostrou baixo ( $20,93 \pm 1,99 \%$ ) em relação aqueles submetidos no tratamento de 12 horas ( $25,78 \pm 2,37 \%$ ). Estudos realizados por Davidson *et al.* (2000) e Tort *et al.* (2002), corroboram com o descrito neste trabalho, onde a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* apresentou aumento nos valores de hematócrito quando expostas ao óleo de cravo e seus derivados.

De acordo com Morales *et al.* (2005), o aumento dos valores de hematócrito indicam hemoconcentração ocasionada pelo aumento da demanda de oxigênio, auxiliando o peixe a retornar a situação de estresse. No entanto, não é possível afirmar que ocorreu estresse de manejo nos peixes do tratamento de 12 horas, visto que estes diferiram apenas com os peixes do tratamento de 2 horas.

Observando os valores apresentados pelo número total de eritrócitos, os peixes do tempo zero, ou seja, que não passaram pelo processo de depuração mostraram-se superiores ( $179,00 \pm 11,23 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ) em relação aqueles do tempo 4 horas ( $144,80 \pm 18,87 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ ). Segundo Lowe-Jinde & Niimi (1983), valores elevados do número de eritrócitos pode ser explicado pela redução dos níveis de oxigênio causado pela redução da irrigação branquial.

Assim como neste estudo, em tambaqui a hipóxia promoveu elevação do número de eritrócitos (Affonso *et al.*, 2002), evidenciando a necessidade de oxigênio do peixe. Barcellos *et al.* (2003) e Urbinati *et al.* (2004), para pacu, *Piaractus mesopotamicus* não encontraram alterações no número de eritrócitos durante as amostragens analisadas, assim como em jundiá, *Rhamdia quelen* submetido a estressores agudos e em matrinxã juvenil transportado por 4 horas em sacos plásticos. Entretanto, no presente estudo esta diminuição dos níveis de oxigênio não pode ser confirmada, pois a diferença significativa só ocorreu entre os peixes do tratamento zero e 4 horas.

Os parâmetros hemoglobina e os índices hematimétricos (VCM e CHCM) não diferiram significativamente entre os tratamentos.

Observações microscópicas das lâminas de extensão revelaram a presença de, além dos eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Os valores absolutos destas células sanguíneas analisadas nos peixes tratados encontram-se nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Valores médios e erro padrão do trombograma de *O. niloticus* amostrados logo após a indução anestésica (tempo 0) e nos diferentes tempos de depuração anestésica.

| <b>Tempos (h)</b> | <b>Número de trombócitos/<math>\mu\text{L}</math> de sangue</b> |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>0</b>          | 15926,45 $\pm$ 1732,66                                          |
| <b>0,5</b>        | 13634,33 $\pm$ 1188,54                                          |
| <b>1</b>          | 16288,21 $\pm$ 1823,63                                          |
| <b>2</b>          | 14930,58 $\pm$ 1252,45                                          |
| <b>4</b>          | 14665,87 $\pm$ 1743,17                                          |
| <b>8</b>          | 14336,54 $\pm$ 1382,44                                          |
| <b>12</b>         | 16770,55 $\pm$ 2081,39                                          |
| <b>24</b>         | 14622,31 $\pm$ 1840,66                                          |

NS: não significativo

A variação do número de trombócitos, neste trabalho foi de 13634,33  $\pm$  1188,54 trombócitos  $\mu\text{L}^{-1}$  (T=30 min) a 16288,21  $\pm$  1823,63 trombócitos  $\mu\text{L}^{-1}$  (T=1 hora). E, de acordo com os resultados do teste estatístico aplicado não ocorreu diferença entre os números de trombócitos entre os tratamentos.

Os valores de trombócitos encontrados neste estudo mostraram-se muito inferiores aos apresentados por Tavares-Dias & Moraes (2004), para a mesma espécie, cujos números foram 48902,50  $\pm$  21366,10  $\mu\text{L}^{-1}$  de trombócitos e por Ueda *et al.* (1997), cuja variação de trombócitos totais foi entre 38540,00 e 100800,00  $\mu\text{L}^{-1}$ . Segundo Tavares-Dias & Moraes (2004), além da variação interespecífica, as diferenças nas metodologias empregadas na contagem de trombócitos também são responsáveis pelos dados descritos na literatura.

Autores atribuem funções destas células nos peixes, entre elas, importante papel no processo de coagulação (Casillas & Smith, 1977) e fagocitose, ajudando a manter os peixes livres de patógenos após dano vascular (Hill & Rowley, 1996). Essa grande diversidade de formas reflete tanto sua especificidade quanto os diferentes estágios do desenvolvimento dos peixes (Kalashnikova, 1976).

Os trombócitos dos peixes têm sido descritos como as células sanguíneas mais abundantes, depois dos eritrócitos (Ueda *et al.*, 2001). Entretanto, neste estudo, o número de trombócitos foi menor em relação ao número de leucócitos.

Tabela 3: Valores médios e erro padrão dos diferentes leucócitos analisados em *O. niloticus* após a indução anestésica (tempo 0) e nos diferentes tempos de depuração anestésica.

| Tempos (h) | Leucócitos totais/ $\mu\text{L}$ | Linfócitos/ $\mu\text{L}$ | Neutrófilos/ $\mu\text{L}$ | Monócitos/ $\mu\text{L}$ | Basófilos/ $\mu\text{L}$ |
|------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0          | 17893,50 $\pm$ 1870,08           | 13891,09 $\pm$ 3161,65    | 2479,66 $\pm$ 856,08       | 356,45 $\pm$ 67,10       | 43,55 $\pm$ 21,03        |
| 0,5        | 21245,88 $\pm$ 3421,15           | 18587,75 $\pm$ 2280,23    | 2922,56 $\pm$ 745,33       | 405,64 $\pm$ 154,88      | 34,69 $\pm$ 18,64        |
| 1          | 19583,48 $\pm$ 2403,65           | 15977,44 $\pm$ 2633,41    | 2875,42 $\pm$ 534,49       | 475,05 $\pm$ 140,16      | 37,65 $\pm$ 23,29        |
| 2          | 25977,62 $\pm$ 3912,23           | 20562,33 $\pm$ 3443,12    | 4123,43 $\pm$ 1278,32      | 678,44 $\pm$ 178,56      | 54,88 $\pm$ 23,78        |
| 4          | 22815,68 $\pm$ 3236,82           | 18430,88 $\pm$ 2636,34    | 2976,21 $\pm$ 655,44       | 435,78 $\pm$ 189,66      | 38,67 $\pm$ 19,52        |
| 8          | 23186,13 $\pm$ 2690,66           | 18765,66 $\pm$ 2135,78    | 2998,33 $\pm$ 845,78       | 613,11 $\pm$ 134,98      | 32,02 $\pm$ 22,49        |
| 12         | 22345,45 $\pm$ 21350,66          | 19322,56 $\pm$ 2987,78    | 2567,88 $\pm$ 644,77       | 588,98 $\pm$ 145,76      | 44,67 $\pm$ 27,46        |
| 24         | 23178,67 $\pm$ 20890,45          | 18764,31 $\pm$ 2398,07    | 3565,88 $\pm$ 678,66       | 622,43 $\pm$ 129,75      | 38,09 $\pm$ 25,61        |

NS: não significativo

Na tabela 3 encontram-se as médias dos valores dos leucócitos totais encontrados em peixes submetidos a anestesia com 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol nos tempos de depuração analisados, não ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos.

Nas extensões sanguíneas foram observados linfócitos, neutrófilos, monócitos e basófilos corroborando as análises descritas por Ueda *et al.* (1997; 2001), em *Oreochromis niloticus*.

Ranzani-Paiva *et al.* (2005) reportaram a presença de eosinófilos em extensões sanguíneas de tilápia, *Oreochromis niloticus*, célula do sistema leucocitário. Assim como

nesse estudo, este tipo de célula tem sido relatada estar ausente em *O. mossambicus* por Tavares-Dias & Faustino (1998).

Os valores médios dos tipos celulares de leucócitos encontrados nos exemplares de juvenis de tilápia estão de acordo com os apresentados por Ranzani-Paiva *et al.* (2005), Ishikawa *et al.* (2008) e Barros *et al.* (2009).

Os tipos celulares de leucócitos mais abundantes encontrados nos exemplares de *O. niloticus*, neste trabalho, foram linfócitos e neutrófilos na contagem diferencial de leucócitos, semelhante ao observado por Tavares-Dias e Faustino (1998), Tavares-Dias *et al.* (2000b), Tavares-Dias & Moraes (2004) e Azevedo *et al.* (2005). Contrariamente, Ueda *et al.* (1997) e Tavares-Dias *et al.* (2000a) verificaram predominância de neutrófilos na contagem diferencial.

O método analítico do instrumento apresentou para o analito de interesse, faixa de linearidade de 0,6 a 5 mg L<sup>-1</sup>; limite de detecção de 0,3 mg L<sup>-1</sup>; limite de quantificação de 0,6 mg L<sup>-1</sup>, coeficientes de variação (CV) intra ensaio (precisão) inferior a 7% e as recuperações de amostras de plasma, fígado e músculo apresentaram-se entre 70 e 120%, com CV inferior a 11%.

Nos ensaios de acumulação de eugenol no plasma sanguíneo, fígado e músculo de tilápia, *O. niloticus* foram detectados resíduos do anestésico em estudo nos tempos analisados (Figuras 1, 2 e 3).

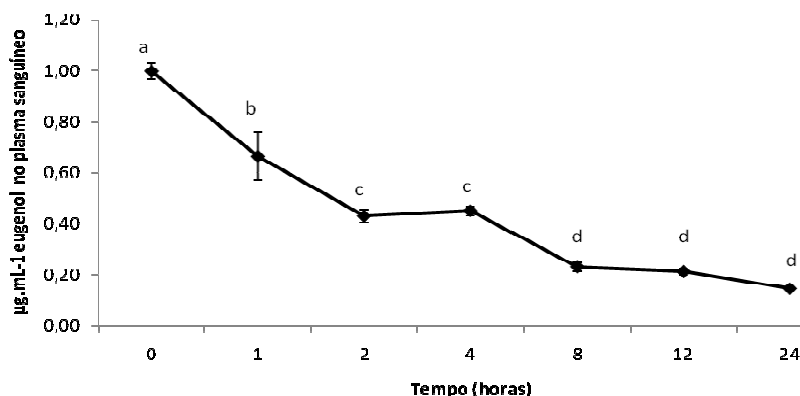


Figura 1: Médias dos valores de resíduos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de eugenol no plasma sanguíneo de *O. niloticus*.

As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes mostram as diferenças significativas entre as médias ( $p < 0,05$ ).

A concentração de eugenol no plasma sanguíneo (Figura 1), após a indução anestésica dos peixes ( $t=0$ ), apresentou-se em torno de  $1,00 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida, os peixes foram amostrados no tempo de 1 hora e ocorreu redução significativa em relação a primeira análise.

Após duas horas ( $t=2$  horas) a concentração de eugenol no plasma sanguíneo destes peixes diminuiu 57 % em relação ao tempo 0, apresentando-se em torno de  $0,43 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Assim como nesse estudo, Guenette *et al.* (2007), observaram, em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, rápida redução na concentração de eugenol no plasma sanguíneo no início da depuração, mas depois essa diminuição ocorreu lentamente. No tempo de análise de 4 horas não ocorreu diferença significativa em relação à amostragem anterior.

A redução na concentração do anestésico foi contínua até oito horas, não ocorrendo diferenças significativas nos valores de resíduo de eugenol no plasma sanguíneo até o final do experimento ( $t=24$  horas).

A partir do valor de  $k_{el}$ , foi possível mensurar a meia-vida do eugenol no plasma sanguíneo de tilápias, *O. niloticus*, em torno de 4,88 horas. Este valor corrobora com o apresentado por Guenette *et al.* (2006), analisando o tempo de meia-vida de sapos anestesiados por eugenol. Guenette *et al.* (2007), calculando a meia-vida do mesmo anestésico em trutas arco-íris obtiveram o tempo de 12,14 horas.

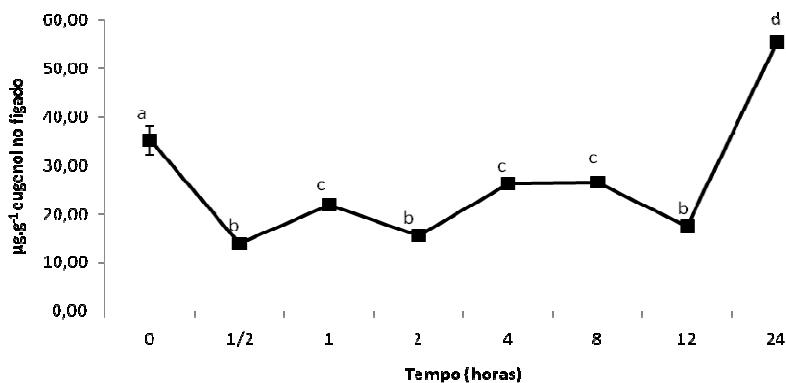


Figura 2: Médias dos valores de resíduos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de eugenol em amostras de fígado de *O. niloticus*.

As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes mostram as diferenças significativas entre as médias ( $P < 0,05$ ).

De acordo com o World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO, 2006), o eugenol é rapidamente absorvido no trato digestivo e metabolizado no fígado.

Na primeira coleta de amostras de fígado (Figura 2), antes do início da eliminação do resíduo anestésico, a concentração de eugenol foi  $35,23 \pm 3,00 \mu\text{g g}^{-1}$ . Esta concentração, após 30 minutos de depuração, reduziu significativamente para  $13,86 \pm 0,22 \mu\text{g g}^{-1}$ . Entretanto, no tempo de 1 hora, ocorreu aumento significativo da concentração de eugenol para  $21,79 \pm 0,95 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Os valores de resíduo de eugenol em fígado, após 1 hora de anestesia, foram de 20 a  $30 \mu\text{g g}^{-1}$  até 12 horas e, após um dia ( $t=24$  horas) a concentração aumentou drasticamente, atingindo o valor de  $55,48 \pm 0,35 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Comparando-se os resíduo de eugenol no fígado antes e 24 horas após a anestesia pode-se verificar o aumento de 57 % da concentração do fármaco nesse órgão.

Estas variações bruscas das concentrações de eugenol em fígado podem estar relacionadas com o trajeto que o anestésico percorre no organismo do animal durante a indução anestésica.

Como pode-se observar na figura 1, até 24 horas após indução anestésica, foi notado uma pequena concentração de eugenol no plasma sanguíneo. Como o fígado tem papel na eliminação do eugenol, acredita-se que sua redução só ocorrerá quando não houver concentração de eugenol mensurável em outros órgãos ou no plasma sanguíneo.

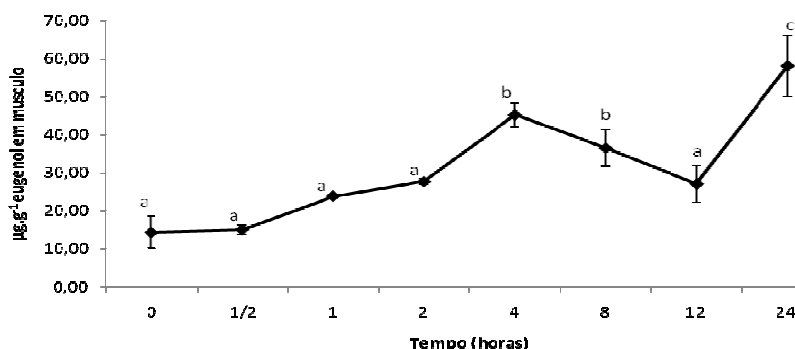


Figura 3: Médias dos valores de resíduos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de eugenol em amostras de músculo de *O. niloticus*.

As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes mostram as diferenças significativas entre as médias ( $P < 0,05$ ).

Os valores de resíduo de eugenol no tecido muscular de *O. niloticus* (Figura 3), logo após anestesia com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de eugenol foi de  $14,21 \pm 4,19 \mu\text{g g}^{-1}$ . Após esta análise, os peixes ficaram em aquários para eliminação do fármaco e, de acordo com análises cromatográficas, não ocorreram diferenças significativas nas concentrações de eugenol no músculo até o tempo de 4 horas após anestesia, cujo valor atingiu  $45,15 \pm 3,10 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Após 4 horas de anestesia, a redução da concentração do anestésico no tecido muscular destes peixes foram observadas no tempo de 12 horas, com concentrações de  $26,96 \pm 4,93 \mu\text{g g}^{-1}$ . Entretanto, esta tendência de redução não foi verificada na última análise, no tempo de 24 horas após anestesia, visto que atingiram a maior dose de eugenol,  $58,08 \pm 7,97 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Em relação as concentrações de eugenol no músculo, nota-se que ocorreu aumento superior a 300%, quando comparadas a quantidade de resíduo de eugenol no músculo antes e 24 horas após a depuração anestésica.

Os resultados deste trabalho contradizem com aqueles apresentados por Meinertz *et al.* (2006), testando o resíduo anestésico de isoeugenol em músculo de trutas arco-íris após anestesia com 34 mg L<sup>-1</sup> de AQUI-S por 10 minutos em diferentes temperaturas, obtiveram os resultados: 30,90 µg g<sup>-1</sup> a 7 °C, 40,10 µg g<sup>-1</sup> a 12 °C, e 48,60 µg g<sup>-1</sup> a 17 °C.

Meinertz & Schreier (2009), anestesiando trutas arco-íris em uma baixa concentração de 17,70 mg L<sup>-1</sup> de AQUI-S por 60 minutos, determinaram, por cromatografia líquida, concentrações de eugenol nas amostras de tecido muscular nos tempos 0 e 4 horas. As concentrações de isoeugenol variaram entre 45,00 a 69,90 µg g<sup>-1</sup> no tempo 0 e 2,80 a 6,70 µg g<sup>-1</sup> no tempo 4 horas.

Kildea *et al.* (2004), avaliando concentrações de óleo de cravo em trutas arco-íris, após uma semana de depuração, observaram 0,32 µg g<sup>-1</sup> de eugenol em seus tecidos musculares. Segundo os autores, isto indica que sucessivas doses deste anestésico podem levar a uma diminuição na capacidade de eliminação do resíduo anestésico do tecido.

As não reduções das concentrações de eugenol nos órgãos de tilápia podem estar relacionadas com a alta quantidade de gordura desses peixes. Segundo Hamelink & Spacie (1999), o conteúdo lipídico do animal é fator determinante da bioconcentração.

O eugenol é um líquido volátil em temperatura ambiente e tem solubilidade moderada em água (2,463 mg L<sup>-1</sup> a 25 °C). O coeficiente de partição octanol-água, K<sub>ow</sub>, para eugenol é 186 (HSDB, 2006), indicando baixa solubilidade em água em relação aos solventes orgânicos e baixo a moderado potencial de bioacumulação, com um fator de bioconcentração estimado de 31.

As moléculas orgânicas apolares (hidrofóbicas), como o eugenol, possuem grande afinidade pelo conteúdo lipídico.

Segundo Orne & Kegley (2008), a bioconcentração de xenobióticos hidrofóbicos pode mudar em função de características inter e intra-espécies. Essa premissa pode explicar a grande diferença entre os valores de bioconcentração determinados em nosso trabalho e nos valores reportados na literatura.

O comitê da FAO / WHO (Expert Committee on Food Additives, dos EUA) prescreve como ingestão diária aceitável (IDA) de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> de eugenol, de peso corporal em humanos. Neste trabalho, os peixes anestesiados com 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol, apresentaram, após 24 horas de depuração anestésica, concentração no tecido muscular de 58,08±7,97 µg g<sup>-1</sup>.

Dado que o limite aceitável de consumo de eugenol por seres humanos é de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> por peso corporal, pessoas em uma faixa de peso de 70 kg podem consumir, com segurança, 175 mg de eugenol. Por conseguinte, uma pessoa que pesa 70 kg teria que comer mais de 3 kg de filé de tilápia, *O. niloticus*, na maior concentração apresentada neste estudo, para ultrapassar o limite aceitação de eugenol, determinada pela WHO (2006).

Apesar de não ocorrer eliminação da concentração de eugenol no tecido muscular de tilápia, *O. niloticus*, as concentrações determinadas nos tempos após anestesia não apresentam risco para o consumidor se estes se alimentarem de até 3 kg de filé de pescado por dia.

## **Conclusão**

É possível concluir que a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol não alterou os parâmetros hematológicos de tilápia. Em relação ao resíduo anestésico, após 24 horas de anestesia, não ocorreu eliminação total do fármaco.

## Referências bibliográficas

- AFFONSO, E. G. ; POLEZ, V. L. ; CORRÊA, C. F. ; MAZON, A. F. ; ARAÚJO, M. R. ; MORAES, G. ; RANTIN, F. T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 133, p. 375-382, 2002.
- AZEVEDO, T. M. P.; MARTINS, M. L.; YAMASHITA, M. M.; FRANCISCO, C. J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 2005.
- BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B. FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1465-1469, 2003.
- BARROS, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PEZZATO, L. E.; FALCON, D. R.; GUIMARÃES, I. G. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 895-903, 2009.
- CASILLAS, E. & SMITH, L. S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, v.10, n.5, p. 481-491, 1977.
- COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550- 552, 1944.
- DAVIDSON, G. W.; DAVIL, P. S.; YOUNG, G.; FOWLER, R. T. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUIS. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 31, p. 105-114, 2000.

- GUENETTE, S. A.; BEAUDRY, F.; MARIER, J. F.; VACHON, P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 265–270, 2006.
- GUENETTE, S. A.; UHLAND, F. C.; HELIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 266, p. 262–265, 2007.
- GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROUSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 50-59, 1971.
- HAYTON, W. L.; BARON, M. G. Rate limiting barriers to xenobiotic uptake by the gill. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 8, 151 p., 1990.
- HILL, D. J.; ROWLEY, A. F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **British Journal of Haematology**, v. 92, p. 200-211, 1996.
- HRUBE, T. C.; SMITH, S. Hematology of fish. In: **Schalm`s Veterinary Hematology**, 5<sup>a</sup> ed. p. 1120-1125, 1998.
- HSDB. National Library of Medicine, TOXNET. **Eugenol**. Hazardous Substances Data Bank. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov>, 2006.
- HUNN, J. B.; ALLEN, J. L. Movement of drugs across the gills of fishes. **Annual Review of Pharmacology**, v. 14, p. 47–55, 1974.
- ISAACS, G. Permanent local anaesthesia and anhidrosis after clove oil spillage. **Lancet**, Oxford, v.321, p.882, 1983.
- ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. Metodologia de quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 54-63, 2008.

IWANA, G.; ACKERMAN, A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). **Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, v. 3, cap. 1, p. 1-5, 1994.

KALASHNIKOVA, Z. M. On the classification of morphological elements in the blood of fish. **Journal of Ichthyology**, v. 3, n. 16, p. 459-472, 1976.

KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; HEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265-277, 2004.

KUBITZA, F. Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: **Gráfica e Editora Degaspari**, 287 p., 2000.

LOWE-JINDE, L.; NIIMI, A. J. Influence of sampling on the interpretation of haematological measurements of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p. 396-402, 1983.

MARTINS, M. L. Manejo sanitário na piscicultura. In: Ranzani-Paiva, M. J. T. *et al.* **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela. pt. IV, cap. 15, p. 323-332, 2004.

MEINERTZ, J. R.; GRESETH, S. L.; SCHREIER, T. M.; BERNARDY, J. A.; GINGERICH, W. H. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S™ at different temperatures, durations, and concentrations. **Aquaculture**, v. 254, p. 347-354, 2006.

- MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-S™ exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 296, p. 200–206, 2009.
- MORALES, A. E.; CARDENETE, G.; ABELLÁN, E.; GARCÍA-REJÓN, L. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). **Aquacult. Res.**, v. 36, p. 33-40, 2005.
- ORNE, S.; KEGLEY, S. **Pesticide database**. San Francisco, CA. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>>, 2008.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; LUQUE, J. L. Parasitological and hematological analysis in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757, from Guarapiranga Reservoir São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 3, p. 231-237, 2005.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 20, p. 315-328, 1947.
- PIRHONEN, J.; SCHRECK, C.B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO2 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p. 507-514, 2003.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 240 p.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., 2000, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Panorama da Aquicultura Magazine, p. 533-541, 2000a.

- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 16, p. 76-82, 2000b.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Haematological characteristics of Brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, p. 109-115, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 14, p. 254-263, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R., **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: M., TAVARES-DIAS, 2004.
- TORT, L.; PUIGCERVER, M.; CRESPO, S.; PADRÓS, F. Cortisol e haematological response in sea bream and trout subjected to anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 907-910, 2002.
- UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 270-275, 1997.
- UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Part II. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, 2001.
- URBINATI, E.C.; SAMPAIO, J.A.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINES, M.A. Loading

and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389-400, 2004.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, p. 353-366, 2002.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B.; Mc LEAY, D. Stress and acclimation. In: Schreck C, Moyle P. (Ed.). **Methods for fish biology**. Bethesda, MD: American Fisheries Society, p. 451-489, 1990.

WHO. Eugenol and Related Hydroxyallylbenzene Derivatives. **JECFA Monograph 530: WHO Food Additives Series 1138**. World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponivel em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je09.pdf>, 2006.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 340-347, 2002.

YANG, B.H. et al. Activation of vanilloid receptor 1(VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.82, p.781-785, 2003.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5 Edition, Prentice Hall, 960 pp., 2009.

## **Capítulo IV**

### **Alterações hematológicas e resíduos de eugenol em tilápia, *Oreochromis niloticus* submetidas ao transporte**

**Marina Carvalho Delbon<sup>1</sup>**

**Maria José Tavares Ranzani Paiva<sup>2</sup>**

**Mary Rosa Rodrigues de Marchi<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Estudante de pós-graduação, CAUNESP, Unesp, Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Pesquisadora científica, Instituto de Pesca, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Pesquisadora científica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

#### **Resumo**

O transporte, na piscicultura, é um procedimento que consiste de uma sucessão de estímulos adversos, podendo causar alterações nos parâmetros hematológicos dos peixes. Para minimizar esses efeitos, pode ser aplicado anestésico diluído na água de transporte. Objetivou-se testar a eficiência do eugenol como mitigador dos parâmetros sanguíneos durante o transporte e avaliar as concentrações residuais desse anestésico nas amostras das tilápias, *O. niloticus*. O transporte foi realizado por cinco horas em caixas de plástico de 100 L estocadas com 200 juvenis em cada caixa. Foram testadas duas concentrações de eugenol (5 e 10 mg L<sup>-1</sup>), além do grupo controle (sem anestésico). Os parâmetros hematológicos e análises residuais do plasma, fígado e músculo dos peixes foram avaliados antes do transporte (AT) e nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas após o transporte. Notou-se que os peixes amostrados antes do transporte apresentaram diferenças significativas nos índices (RBC, VCM e HCM), em relação ao grupo controle 12 horas após o transporte. Os peixes do grupo controle, no tempo 0, apresentaram valores superiores de RBC em relação aos transportados na maior concentração anestésica. Os valores de trombócitos e tipos celulares de leucócitos não

ocorreram diferença significativa entre os tratamentos. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (CG-DIC). Após o período de 24 horas de depuração anestésica ocorreu redução significativa nos valores residuais de eugenol, nas três amostras analisadas e nas duas concentrações aplicadas. Portanto, as concentrações de eugenol aplicadas podem ser utilizadas para o transporte de juvenis de tilápia, sem causarem alterações nos parâmetros hematológicos. Entretanto, o período de 24 horas de depuração anestésica não é suficiente para eliminar o resíduo de eugenol nas amostras testadas em tilápia.

**Palavras-chave:** CG-DIC, eugenol, *Oreochromis niloticus*, parâmetros hematológicos, resíduo anestésico, transporte anestésico.

## **Introdução**

Dentre as espécies de tilápias, a que mais tem se destacado na piscicultura mundial é a *Oreochromis niloticus* (FAO, 2007), isto por apresentar: boa rusticidade, alto ganho em peso, facilidade de reprodução, excelentes características do sabor da carne e atingem o tamanho comercial rapidamente (Kubitza, 2000).

No Brasil, os produtores de tilápias utilizam diferentes sistemas de produção, sendo os semi-intensivos, intensivos em viveiros escavados em terra, os super-intensivos em tanques-rede e *race-way*. A criação em tanques-rede atinge cerca de 10% da produção mundial da aquicultura, nos quais a tilápia é o peixe de maior contribuição na produção do pescado (Silva & Siqueira, 1997).

No processo da criação, o transporte de alevinos e juvenis é uma das etapas no manejo da produção e comercialização de peixes. No entanto, este procedimento leva a

uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas que alteram o equilíbrio homeostático e o balanço energético (Rocha *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2005).

Na tentativa de ajustar-se a estas condições adversas, os peixes respondem com uma série de respostas primárias e secundárias, como aumento das catecolaminas e cortisol, o que estimula a mobilização de reservas energéticas, alteração dos parâmetros sanguíneos e cardiorrespiratórios com o aumento do número de eritrócitos, da concentração das taxas de hemoglobina e hematócrito, aumento dos batimentos operculares levando a mudanças na capacidade de trocas iônicas, além de uma pronunciada excreção nitrogenada plasmática (Iwama *et al.*, 1997; Mommsem *et al.*, 1999; Urbinati & Carneiro, 2001).

Segundo Grottum *et al.* (1997), o principal fator de sucesso do transporte é manter a maior densidade de peixes no menor volume de água possível, sem que haja mortalidade, deterioração da qualidade da água e estresse.

Além do controle da densidade de estocagem de peixes, produtos condicionadores são utilizados para minimizar as agressões causadas durante o transporte. O sal marinho e anestésicos como, benzocaína e eugenol são exemplos que visam minimizar o impacto do transporte de peixes e diminuir as respostas ao estresse (Carneiro & Urbinati, 2001; Inoue *et al.*, 2005). Entretanto, a escolha desses produtos fica a critério dos criadores, levando-se em conta o custo-benefício e sua disponibilidade no mercado (Inoue *et al.*, 2003).

O modo de atuação dos anestésicos, segundo Silva (2002), dá-se em três fases que atuam sobre: 1) córtex cerebral (estado analgésico); 2) gânglios basais e cerebelo (estado de delírio) e 3) medula espinhal (estado de anestesia cirúrgica). Para o transporte de peixes, recomenda-se que o anestésico atinja apenas a primeira fase.

De acordo com Gomes *et al.* (2001), o anestésico que vem sendo mais utilizado no Brasil é a benzocaína. Trata-se de um anestésico local, cujo potencial de ação é semelhante ao MS-222 (Mattson & Ripple, 1989; Burka *et al.*, 1997; Ross & Ross, 2008). Os autores sugeriram que a benzocaína atende a maioria dos critérios estabelecidos por Ross & Ross (2008), como anestésico ideal para peixes.

Carneiro *et al.* (2002), transportando matrinxãs, *Brycon cephalus*, verificaram que o uso da benzocaína apresentou efeitos negativos em duas concentrações (10 e 20 mg L<sup>-1</sup>) nos parâmetros hematológicos.

O chamado “óleo-de-cravo” é um composto fenólico resultado da destilação das folhas, flores (incluindo talos) das árvores de cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*), sendo a substância ativa o eugenol, com concentração que varia de 70 a 95% da composição total do óleo essencial do cravo (Mazzafera, 2003). Ele vem sendo utilizado nos peixes, com vantagens econômicas e sem propriedades tóxicas aparentes (Soto & Burhanuddin, 1995; Munday & Wilson, 1997; Sladky *et al.*, 2001; Woody *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2003; Cunha, 2007). Outra vantagem deste fármaco é ser metabolizado e excretado rapidamente pelo organismo do animal, não requerendo tempo de carência (Wagner *et al.*, 2002).

Os estudos sobre a utilização do eugenol, como anestésico na piscicultura, surgiram da necessidade de se encontrar novas substâncias eficazes, seguras e de baixo custo (Roubach *et al.*, 2005).

Existe assim, grande demanda de alevinos e juvenis da espécie tanto para o povoamento de açudes, como à produção de engorda em tanques, viveiros e tanques-rede, pois, a tilapicultura vem se intensificando, particularmente, no nordeste e sudeste do país. Entretanto, problemas relacionados à qualidade e sobrevivência dos peixes

durante o transporte ainda é motivo de preocupação dos produtores, distribuidores e compradores de alevinos e juvenis.

Além disso, têm-se preocupações com os resíduos anestésicos possivelmente presentes na carne, podendo resultar na rejeição pelos consumidores (Olsen *et al.*, 2006; Ribas *et al.*, 2007).

Desta forma, objetivou-se testar a eficiência do eugenol como mitigador dos parâmetros hematológicos durante o transporte de tilápia, *O. niloticus* e avaliar o resíduo desse produto, ao longo de 24 horas, no plasma, fígado e músculo.

## **Materiais e métodos**

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da APTA – Pariquera-Açu/SP. Foram utilizados 1200 juvenis de tilápia ( $23,45 \pm 2,67$  g e  $12,38 \pm 1,44$  cm), revertidos, alimentados até 48 horas antes do experimento com ração extrusada com 28% de proteína bruta. Os peixes foram mantidos em 6 tanques de 500 L para aclimação por um período de sete dias.

Durante o período de aclimação, 6 peixes, sendo um peixe por tanque, foram amostrados para avaliações hematológicas antes do transporte (AT).

O transporte foi realizado entre Pariquera-Açu/SP e São Paulo/SP (220 Km) com duração de cinco horas. O delineamento do experimento foi inteiramente ao acaso com três tratamentos: 0 (controle), 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol e 4 tempos (T) de amostragem: 0 (0 T); 6 (6 T), 12 (12 T) e 24 horas depois do transporte (24 T). Foram utilizadas seis réplicas por tratamento.

Os peixes foram transportados em sistema fechado, em seis caixas de 100 L cada, com uma densidade média de 80 g de peixe vivo por litro de água, conforme sugerido por Urbinati *et al.* (2004).

Após o transporte, os peixes de cada tratamento foram colocados, separadamente, em tanques de 500 L de água livre de anestésico e com aeração constante.

### **Parâmetros físicos e químicos da água**

A água do transporte foi coletada antes e após o transporte, sendo os parâmetros analisados: pH, temperatura (°C), oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e amônia total ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

### 1º experimento: Avaliações comportamentais e análises hematológicas dos peixes submetidos ao transporte

O grau de interferência do anestésico eugenol sob o comportamento dos peixes foi registrado segundo Woody *et al.* (2002) (Tabela 1).

Tabela 1 – Sinais clínicos de peixes expostos à anestésicos, adaptada por Woody *et al.* (2002).

| <b>Estágios de anestesia</b>  | <b>Descrição dos sinais clínicos</b>                                             |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(1) sedação leve</b>       | Diminuição visível dos movimentos operculares                                    |
| <b>(2) anestesia leve</b>     | Perda parcial de equilíbrio e dificuldade em manter posição normal de nado       |
| <b>(3) anestesia profunda</b> | Perda total de equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição vertical de nado |

Para avaliações hematológicas, foram amostrados três peixes de cada caixa de transporte por cada tempo de amostragem, totalizando 72 peixes. Para as avaliações, os animais foram anestesiados com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de benzocaína para não interferir nas análises residuais do anestésico eugenol.

O sangue foi coletado por punção caudal com auxílio de seringas descartáveis, heparinizadas para as determinações dos: número total de células (RBC), contado em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Hayem como diluente; hematócrito (Ht), pelo método do microhematócrito; taxa de hemoglobina (Hb), pelo método da cianometahemoglobina. Com os resultados dos valores de Hb, RBC e Ht foram calculados

os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) e HCM (hemoglobina corpuscular média).

As extensões sanguíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo Rosenfeld (1947), foram utilizadas para as contagens diferencial e total dos leucócitos e contagem de trombócitos, sendo as duas últimas pelo método indireto, segundo Hrubé & Smith (1998).

## 2º experimento: Análises residuais das matrizes biológicas de *Oreochromis niloticus*

### **Condições cromatográficas**

Foi utilizado o equipamento de cromatografia em fase gasosa equipado com detector de ionização de chama (DIC), Varian 3800 (Walnut Creek, EUA) nas seguintes condições: injeção *splitless*; coluna capilar DB-5 – 5% fenil, 95% metilpolisiloxano (J&W Scientific, Folsom, EUA) com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. As temperaturas do injetor e detector foram 250 °C e 300 °C, respectivamente; a temperatura do forno foi programada a partir de 80 °C e aquecida a uma razão de 3 °C/min até 140 °C e novamente aquecida a 20 °C/min até 250 °C, permanecendo por 5 minutos nesta última temperatura. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a uma vazão constante de 1 mL/min. As vazões dos gases do detector DIC foram de 40 mL min<sup>-1</sup> para nitrogênio, 25 mL min<sup>-1</sup> para hidrogênio e 325 mL min<sup>-1</sup> para ar sintético.

O equipamento foi operado pelo software Varian, Galaxie, programa responsável pela aquisição e processamento dos dados. As injeções de 100 µL do *headspace* (vapor em equilíbrio com a solução padrão, ou com a amostra), foram feitas manualmente.

### **Análises residuais do anestésico eugenol**

As amostras biológicas (100 µL de plasma, 5 g de músculo e 5 g de fígado) foram transferidas a vials de 40 mL com tampa de rosca e septo de silicone faceado em Teflon<sup>MR</sup>, próprios para *headspace*. Também foi adicionado 25 mg L<sup>-1</sup> de mentol como padrão interno. O vial foi vedado e agitado com auxílio de vortex por 2 minutos para homogeneização da solução.

Os vials foram mantidos em repouso por 90 min para o plasma; 30 min para o fígado; e 60 min para o músculo. Após este período, as amostras foram aquecidas a 35°C por 45 minutos. Esta temperatura foi escolhida para evitar que nestas condições não deverá ocorrer deterioração das amostras e eliminar compostos que poderiam interferir na análise. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata seguindo o procedimento padrão.

### **Padrões e solventes**

Padrões de alta pureza (> 99%) de eugenol e mentol, utilizados como padrão analítico e padrão interno (empregado para avaliação da recuperação), respectivamente, foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). As soluções estoque de eugenol e mentol foram preparadas em metanol na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e armazenadas a -20 °C.

Metanol, grau HPLC, foi adquirido da Tedia Company (Fairfield, EUA).

### **Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, ao teste de Tukey para comparação entre as médias aritméticas, adotando-se o nível de significância de 5% (Zar, 2009).

## Resultados e discussão

Foram observadas 100% de sobrevivência das tilápias durante o trabalho.

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da qualidade água monitorados nos tanques de aclimação e de transporte foram, respectivamente: pH  $6,2 \pm 0,5$  e  $6,5 \pm 0,3$ ; temperatura  $26,2 \pm 0,4$  °C e  $26,8 \pm 0,6$  °C; amônia total  $0,50 \pm 0,08$  e  $2,50 \pm 0,15$  mg L<sup>-1</sup> e oxigênio dissolvido  $6,1 \pm 0,2$  mg L<sup>-1</sup> e  $5,6 \pm 0,8$  mg L<sup>-1</sup>.

Para a qualidade de água, a média de temperatura e o pH da água dos tanques de aclimação e transporte estão dentro da zona de conforto térmico para a espécie estudada, *Oreochromis niloticus* (Martins, 2004).

A amônia é o principal composto nitrogenado excretado por animais aquáticos (Colt & Armstrong, 1981) e pode ser por meio da difusão branquial durante transporte ativo com sódio e uréia (Arana, 2004). Os compostos nitrogenados elevados correspondem à fração de amônia letal e quando associada ao pH mais elevado pode potencializar seu efeito.

O aumento dos valores de amônia registrado na água dos tanques de transporte deve-se principalmente a excreção de metabólitos dos juvenis confinados em ambientes fechados. De acordo com Benli *et al.* (2008), juvenis de tilápia suportam altas concentrações de amônia na água, desta forma, este parâmetro não afetou a sobrevivência dos peixes.

Neste experimento foi observada 100% de sobrevivência de tilápias durante o processo anestésico até o final da observação, ou seja, 48 horas após o transporte. Assim, constatou-se que a qualidade da água nos tanques de transporte não influenciou a sobrevivência dos juvenis de tilápia.

Os peixes transportados nas dosagens de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol, após 10 minutos de exposição, atingiram o 1º estágio anestésico (Tabela 1), com redução da

natação, mas capazes de manter parcialmente o equilíbrio, a capacidade de natação, evitando prejuízos causados por colisão com as paredes do tanque. Segundo Piper *et al.* (1982), baixas concentrações anestésicas permitem que os peixes mantenham o equilíbrio, a atividade de natação e a respiração, sendo eficazes para mitigar o estresse associado com a manipulação e transporte de peixes. Este fato pode ser confirmado pelas tilápias que não receberam anestesia (controle) e não atingiram o 1º estágio anestésico (Tabela 2), ou seja, não reduziram a atividade de natação.

De acordo com Cooke *et al.* (2004), os estágios de anestesia desejados durante o transporte são perda de reação a estímulos e perda parcial de equilíbrio. Corroborando com este estudo, os autores, avaliando diferentes concentrações de óleo de cravo em largemouth bass, *Micropterus salmoides* descreveram que concentrações entre 5 e 8,5 mg L<sup>-1</sup> são ideais no transporte destes peixes.

No final do transporte, os juvenis expostos ao eugenol, após serem capturados e armazenados nos tanques com água sem anestésico, recuperaram, rapidamente, a natação normal.

Na tabela 2 encontram-se os parâmetros hematológicos avaliados nos peixes amostrados antes (AT) e depois do transporte, nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas de depuração anestésica, em ambas concentrações (5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol).

Tabela 2: Valores médios e erro padrão dos parâmetros do eritrograma de *O. niloticus* antes de depois do transporte, nos três tratamentos anestésicos e nos quatro tempos de amostragem.

| Tratamentos | Ht (%)       | Hb (g dL <sup>-1</sup> ) | RBC (10 <sup>4</sup> µL <sup>-1</sup> ) | VCM(fL)                      | HCM (pg)                   | CHCM (g dL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|--------------|--------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AT          | 31,67 ± 1,19 | 8,30 ± 0,49              | 217,67 ± 3,95 <sup>ac</sup>             | 143,43 ± 5,90 <sup>a</sup>   | 38,26 ± 2,65 <sup>a</sup>  | 26,83 ± 1,86               |
| T = 0 [0]   | 36,08 ± 1,42 | 9,44 ± 0,21              | 229,00 ± 5,32 <sup>a</sup>              | 158,19 ± 8,16 <sup>ab</sup>  | 41,29 ± 0,96 <sup>ab</sup> | 26,38 ± 1,28               |
| T = 0 [5]   | 33,67 ± 2,27 | 9,08 ± 0,56              | 218,17 ± 5,41 <sup>ac</sup>             | 155,49 ± 13,30 <sup>ab</sup> | 41,78 ± 2,98 <sup>ab</sup> | 27,25 ± 1,62               |
| T = 0 [10]  | 32,83 ± 1,14 | 8,39 ± 0,36              | 172,67 ± 9,14 <sup>bc</sup>             | 193,97 ± 11,93 <sup>ab</sup> | 49,67 ± 3,55 <sup>ab</sup> | 25,75 ± 1,53               |
| T = 6 [0]   | 34,67 ± 0,84 | 8,60 ± 0,23              | 208,92 ± 15,04 <sup>ac</sup>            | 169,73 ± 11,05 <sup>ab</sup> | 42,06 ± 2,67 <sup>ab</sup> | 24,83 ± 0,48               |
| T = 6 [5]   | 33,33 ± 2,04 | 9,18 ± 0,22              | 208,42 ± 16,59 <sup>ab</sup>            | 166,11 ± 19,13 <sup>ab</sup> | 45,66 ± 4,29 <sup>ab</sup> | 28,00 ± 1,60               |
| T = 6 [10]  | 32,58 ± 1,16 | 8,66 ± 0,08              | 191,50 ± 8,68 <sup>ab</sup>             | 172,33 ± 11,93 <sup>ab</sup> | 45,67 ± 2,01 <sup>ab</sup> | 26,74 ± 0,95               |
| T = 12 [0]  | 33,42 ± 0,94 | 8,84 ± 0,14              | 154,83 ± 6,87 <sup>b</sup>              | 218,57 ± 13,92 <sup>b</sup>  | 57,49 ± 2,08 <sup>b</sup>  | 26,52 ± 0,75               |
| T = 12 [5]  | 33,00 ± 1,37 | 8,57 ± 0,14              | 171,67 ± 9,14 <sup>bc</sup>             | 194,05 ± 9,74 <sup>ab</sup>  | 50,68 ± 2,83 <sup>ab</sup> | 26,20 ± 1,12               |
| T = 12 [10] | 32,50 ± 0,32 | 8,96 ± 0,22              | 200,75 ± 4,79 <sup>ab</sup>             | 162,41 ± 4,58 <sup>ab</sup>  | 44,78 ± 1,57 <sup>ab</sup> | 27,57 ± 0,60               |
| T = 24 [0]  | 32,42 ± 1,52 | 8,64 ± 0,33              | 209,92 ± 5,89 <sup>ac</sup>             | 154,38 ± 5,05 <sup>ab</sup>  | 41,21 ± 1,46 <sup>ab</sup> | 26,76 ± 0,88               |
| T = 24 [5]  | 30,08 ± 1,02 | 8,39 ± 0,39              | 166,92 ± 20,76 <sup>bc</sup>            | 197,58 ± 29,20 <sup>ab</sup> | 55,08 ± 8,30 <sup>ab</sup> | 27,84 ± 0,51               |
| T = 24 [10] | 34,17 ± 1,01 | 9,02 ± 0,27              | 193,17 ± 14,97 <sup>ab</sup>            | 184,33 ± 20,35 <sup>ab</sup> | 48,11 ± 4,06 <sup>ab</sup> | 26,50 ± 0,93               |

AT=antes do transporte, T=após o transporte, Ht=hematócrito, Hb=taxa de hemoglobina, RBC= número de eritrócitos, VCM=volume corpuscular médio, CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média

Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,5).

Apesar da anestesia minimizar o impacto dos agentes estressores, é importante a determinação de concentrações ótimas de fármacos com características anestésicas para se evitar os efeitos negativos na prática, pois a utilização de quantidades excessivas de anestésicos podem promover alterações metabólicas detectadas posteriormente, somente horas após a exposição (Park *et al.*, 2008).

Nesse estudo, observou-se que as análises dos valores de hematócrito, hemoblogina e CHCM não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, inclusive em relação aos peixes amostrados antes do início do transporte.

Segundo Tavares-Dias & Faustino (1998), o hematócrito é o índice do eritrograma que apresenta o menor coeficiente de variação em peixes, sugerindo ser um bom indicador dos efeitos dos fatores ambientais a que os mesmos estão sujeitos. De acordo com Morales *et al.* (2005), o estresse provoca hemoconcentração em peixes de água doce, o que pode ser detectado pela elevação do hematócrito.

A média geral do percentual de hematócrito dos tratamentos mostrou uniformidade e dentro da normalidade, sendo semelhante aos dados de Shiau & Lung (1993), Tavares-Dias e Faustino (1998), Yildiz e Pulatsü (1999), Tavares-Dias *et al.* (2000 a,b), Tavares-Dias e Moraes (2004), Benli e Yildis (2004), Azevedo *et al.* (2005).

Esse parâmetro pode, em parte, revelar o nível de estresse a que os peixes estão submetidos, embora na presença de agentes estressantes como, peixes expostos a estímulos únicos e consecutivos de estresse, possam variar (Martins *et al.*, 2002). No presente trabalho, como não ocorreram diferenças significativas em relação ao hematócrito pode-se sugerir que, apesar de haver um tratamento sem anestésico, o estresse não foi fator condicionante.

Em relação aos valores de RBC, VCM e HCM, notam-se que os peixes amostrados antes do transporte (AT) apresentaram diferenças significativas em relação àqueles transportados sem anestésico, no tempo de 12 horas de depuração (T=12 [0]).

Nos peixes transportados sem anestésico, logo na chegada do transporte (T=0 [0]), apresentaram valores superiores do RBC em relação aos animais tratados na maior concentração de eugenol (T=0 [10]). Essas diferenças significativas também foram registradas nos peixes sem anestésico do tempo 12 horas (T=12 [0]).

Os altos valores do número de eritrócitos nos peixes tratados sem anestésico, logo no tempo zero do transporte, podem ser explicados pela redução dos níveis de oxigênio, causado pela redução da irrigação branquial (Lowe-Jinde & Niimi, 1983) dos peixes transportados sem anestésico. Além disso, este aumento do número de eritrócitos também é marcado pela diminuição do volume celular (VCM).

Os valores de VCM expressam o volume médio dos eritrócitos de tilápias, *O. niloticus*. De acordo com Baldisseroto (2009), estas alterações do volume das hemácias também contribuem para reduzir a afinidade da hemoglobina, prejudicando o transporte

de oxigênio no sangue. Isso também pode ser explicado pelo fato de estar ocorrendo uma liberação de eritrócitos na corrente sangüínea pelo estímulo estressor (McDonald & Milligan, 1997), visto que neste grupo os animais foram transportados sem anestésico.

As médias dos valores apresentados do eritrograma corroboram com os apresentados por Ranzani-Paiva *et al.* (2005), França *et al.* (2007), Ishikawa *et al.* (2007), Barros *et al.* (2009) para os parâmetros hematológicos de *Oreochromis niloticus*.

Observações microscópicas das lâminas de extensão sanguíneas revelaram a presença de eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Os valores absolutos destas células sanguíneas analisadas nos peixes tratados encontram-se nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Valores médios e erro padrão do trombograma de *O. niloticus* antes de depois do transporte anestésico, nos três tratamentos e nos quatro tempos de amostragem.

| Tratamentos | Número de trombócitos/ $\mu\text{L}$ de sangue |
|-------------|------------------------------------------------|
| AT          | 13296,24 $\pm$ 2731,70                         |
| T = 0 [0]   | 15383,14 $\pm$ 1618,22                         |
| T = 0 [5]   | 14834,34 $\pm$ 2008,26                         |
| T = 0 [10]  | 12893,45 $\pm$ 3450,64                         |
| T = 6 [0]   | 16460,60 $\pm$ 1820,18                         |
| T = 6 [5]   | 13463,66 $\pm$ 2342,90                         |
| T = 6 [10]  | 12970,52 $\pm$ 2590,40                         |
| T = 12 [0]  | 14560,88 $\pm$ 1980,67                         |
| T = 12 [5]  | 15810,98 $\pm$ 2235,56                         |
| T = 12 [10] | 13895,68 $\pm$ 2109,45                         |
| T = 24 [0]  | 12640,55 $\pm$ 3290,20                         |
| T = 24 [5]  | 14280,90 $\pm$ 2183,44                         |
| T = 24 [10] | 13562,35 $\pm$ 1895,28                         |

AT=antes do transporte, T=após o transporte

NS: não significativo

A variação do número de trombócitos, neste trabalho foi de 12640,55  $\pm$  3290,20 trombócitos  $\mu\text{L}^{-1}$  (T=24 [0]) a 16460,60  $\pm$  1820,18 trombócitos  $\mu\text{L}^{-1}$  (T=6 [0]). E, de acordo com os resultados do teste estatístico aplicado, não ocorreram diferenças entre os os tratamentos.

Os valores de trombócitos encontrados, neste estudo, mostraram-se inferiores aos apresentados por Tavares-Dias e Moraes (2004), para a mesma espécie, cujos números foram  $48902,50 \pm 21366,10 \mu\text{L}^{-1}$  de trombócitos e por Ueda *et al.* (1997), cuja variação de trombócitos totais foi entre 38540,00 e 100800,00  $\mu\text{L}^{-1}$ . Segundo Tavares-Dias & Moraes (2004), além da variação interespecífica, as diferenças nas metodologias empregadas na contagem de trombócitos também podem ser responsáveis pela grande variação dos dados descritos na literatura.

Outros autores atribuem as funções dos trombócitos nos peixes, entre elas, sugerem-se que têm importante papel no processo de coagulação (Matushima & Mariano, 1996; Hrube & Smith, 1998) e realizam fagocitose, ajudando a manter os peixes livres de patógenos após dano vascular (Hill & Rowley, 1996).

Os trombócitos, embora não sejam de linhagem leucocitária, são considerados como células sangüíneas de defesa, predominante em espécies de peixes de água doce (Tavares-Dias *et al.*, 2000b; Tavares-Dias *et al.* (2007). No entanto, Hrube & Smith (1998) recomendam a contagem de leucócitos totais pela metodologia indireta, com o objetivo de diferenciar os trombócitos dos leucócitos. De acordo com os pesquisadores, a diferenciação das células de trombócitos e linfócitos apresentam maior confiabilidade por meio da contagem em extensões sangüíneas.

Tabela 4: Valores totais dos diferentes leucócitos observados nas extensões sanguíneas de *O. niloticus* antes de depois do transporte anestésico, nos três tratamentos e nos quatro tempos de amostragem.

| Tratamentos        | Leucócitos totais/ $\mu\text{L}$ | Linfócitos/ $\mu\text{L}$ | Neutrófilos/ $\mu\text{L}$ | Monócitos/ $\mu\text{L}$ | Basófilos/ $\mu\text{L}$ |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>AT</b>          | 18795,56 $\pm$ 2098,45           | 14907,37 $\pm$ 2335,68    | 3366,68 $\pm$ 563,98       | 471,51 $\pm$ 180,44      | 26,09 $\pm$ 12,02        |
| <b>T = 0 [0]</b>   | 19856,45 $\pm$ 1895,65           | 1562,90 $\pm$ 2174,55     | 3168,11 $\pm$ 452,85       | 403,04 $\pm$ 104,42      | 23,11 $\pm$ 15,11        |
| <b>T = 0 [5]</b>   | 21455,90 $\pm$ 3240,87           | 17334,35 $\pm$ 2674,30    | 3210,78 $\pm$ 592,78       | 673,36 $\pm$ 235,67      | 43,25 $\pm$ 21,09        |
| <b>T = 0 [10]</b>  | 20564,33 $\pm$ 1980,43           | 1590,95 $\pm$ 2048,34     | 3298,66 $\pm$ 603,45       | 502,54 $\pm$ 139,38      | 38,32 $\pm$ 17,15        |
| <b>T = 6 [0]</b>   | 19987,60 $\pm$ 1865,70           | 15797,66 $\pm$ 1952,37    | 3618,90 $\pm$ 723,89       | 467,67 $\pm$ 128,56      | 44,09 $\pm$ 25,09        |
| <b>T = 6 [5]</b>   | 19790,86 $\pm$ 1790,88           | 15920,74 $\pm$ 2126,13    | 3417,45 $\pm$ 598,57       | 573,87 $\pm$ 201,66      | 37,21 $\pm$ 23,13        |
| <b>T = 6 [10]</b>  | 20676,45 $\pm$ 1894,33           | 1640,94 $\pm$ 3235,78     | 3296,23 $\pm$ 643,41       | 426,07 $\pm$ 178,85      | 28,23 $\pm$ 16,12        |
| <b>T = 12 [0]</b>  | 19259,66 $\pm$ 2230,88           | 15654,84 $\pm$ 2867,55    | 3187,39 $\pm$ 561,73       | 606,15 $\pm$ 213,77      | 47,20 $\pm$ 22,14        |
| <b>T = 12 [5]</b>  | 18695,60 $\pm$ 2087,80           | 14694,88 $\pm$ 2389,48    | 2794,56 $\pm$ 532,55       | 466,51 $\pm$ 175,42      | 38,20 $\pm$ 25,10        |
| <b>T = 12 [10]</b> | 21340,32 $\pm$ 21345,55          | 16827,25 $\pm$ 2454,89    | 3485,89 $\pm$ 702,48       | 551,59 $\pm$ 189,36      | 25,13 $\pm$ 16,09        |
| <b>T = 24 [0]</b>  | 19764,30 $\pm$ 1830,50           | 15957,45 $\pm$ 3138,45    | 3152,73 $\pm$ 671,58       | 412,09 $\pm$ 167,55      | 42,10 $\pm$ 28,10        |
| <b>T = 24 [5]</b>  | 21660,54 $\pm$ 19873,40          | 17143,88 $\pm$ 2658,55    | 3672,44 $\pm$ 752,11       | 563,61 $\pm$ 213,87      | 43,17 $\pm$ 21,09        |
| <b>T = 24 [10]</b> | 20243,15 $\pm$ 2088,45           | 16160,15 $\pm$ 2783,80    | 3416,98 $\pm$ 652,08       | 537,66 $\pm$ 198,43      | 37,21 $\pm$ 19,12        |

AT=antes do transporte, T=após o transporte

NS: não significativo

O número de leucócitos totais variou de 18695,60 $\pm$ 2087,80  $\mu\text{L}^{-1}$  (T=12 [5]) a 21455,90 $\pm$ 3240,87  $\mu\text{L}^{-1}$  (T=0 [5]). E, de acordo com os resultados do teste estatístico aplicado, não ocorreram diferenças entre os números de leucócitos entre os tratamentos.

A fisiologia e mecanismos de controle do funcionamento do sistema leucocitário dos peixes são semelhantes aos dos vertebrados superiores (Volkov, 1978), uma vez que também, desempenham papel na atividade dos processos inflamatório e imunológicos nos tecidos de peixes (Silva *et al.*, 1998; Ranzani-Paiva *et al.*, 2004; Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Em relação aos leucócitos foram visualizados linfócitos, neutrófilos, monócitos e basófilos, corroborando as análises descritas por Ueda *et al.* (1997; 2001), em *Oreochromis niloticus*. O critério utilizado para definir a nomenclatura destas células foi baseado nos aspectos morfológicos do núcleo e a distribuição padrão dos grânulos citoplasmáticos.

Os tipos celulares de leucócitos mais abundantes encontrados nos exemplares de *O. niloticus*, neste trabalho, foram linfócitos e neutrófilos na contagem diferencial de leucócitos semelhantes aos observados por Tavares-Dias e Moraes (2004), Azevedo *et*

*al.* (2005) e Ranzani-Paiva *et al.* (2005). Contrariamente, Ueda *et al.* (1997) e Tavares-Dias *et al.* (2000a) verificaram predominância de neutrófilos na contagem diferencial.

Carneiro *et al.* (2002) estudaram o transporte de matrinxã, *Brycon cephalus* e registraram efeitos negativos dos valores de concentrações altas de benzocaína (10 e 20 mgL<sup>-1</sup>), concluindo que essa substância não reduziu o estresse causado pelo transporte. Estudos hematológicos mostraram variações de leucopenia e leucocitose após a aplicação de estresse em peixes (Pickford *et al.*, 1971). Após 24 horas de injeção de cortisol carpas apresentaram leucocitose (Wojtaszek *et al.*, 2002). A leucopenia foi constatada após 30 minutos de aplicação do estressor por Benfey & Biron (2000) e Pickford *et al.* (1971) fizeram as mesmas observações após 3 e 30 minutos, fato não verificado neste experimento.

O método analítico do instrumento apresentou para o analito de interesse, faixa de linearidade de 0,6 a 5 mg L<sup>-1</sup>; limite de detecção de 0,3 mg L<sup>-1</sup>; limites de quantificação de 0,6 mg L<sup>-1</sup>, coeficientes de variação (CV) intra ensaio (precisão) inferior a 7% e os valores de recuperação obtidos com amostras de plasma, fígado e músculo fortificados com eugenol apresentaram-se entre 70 e 120%, com CV inferior a 11%. A recuperação do mentol (padrão interno) foi de 81,55±4,35%.

Os peixes transportados do grupo controle, ou seja, sem anestésico, não apresentaram resíduos desse fármaco detectáveis no método CG-DIC.

Em relação aos demais tratamentos (5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol), após análises cromatográficas dos plasma sanguíneo, fígado e músculo, resíduos de eugenol foram detectados nos tempos amostrados (Figuras 1 e 2).

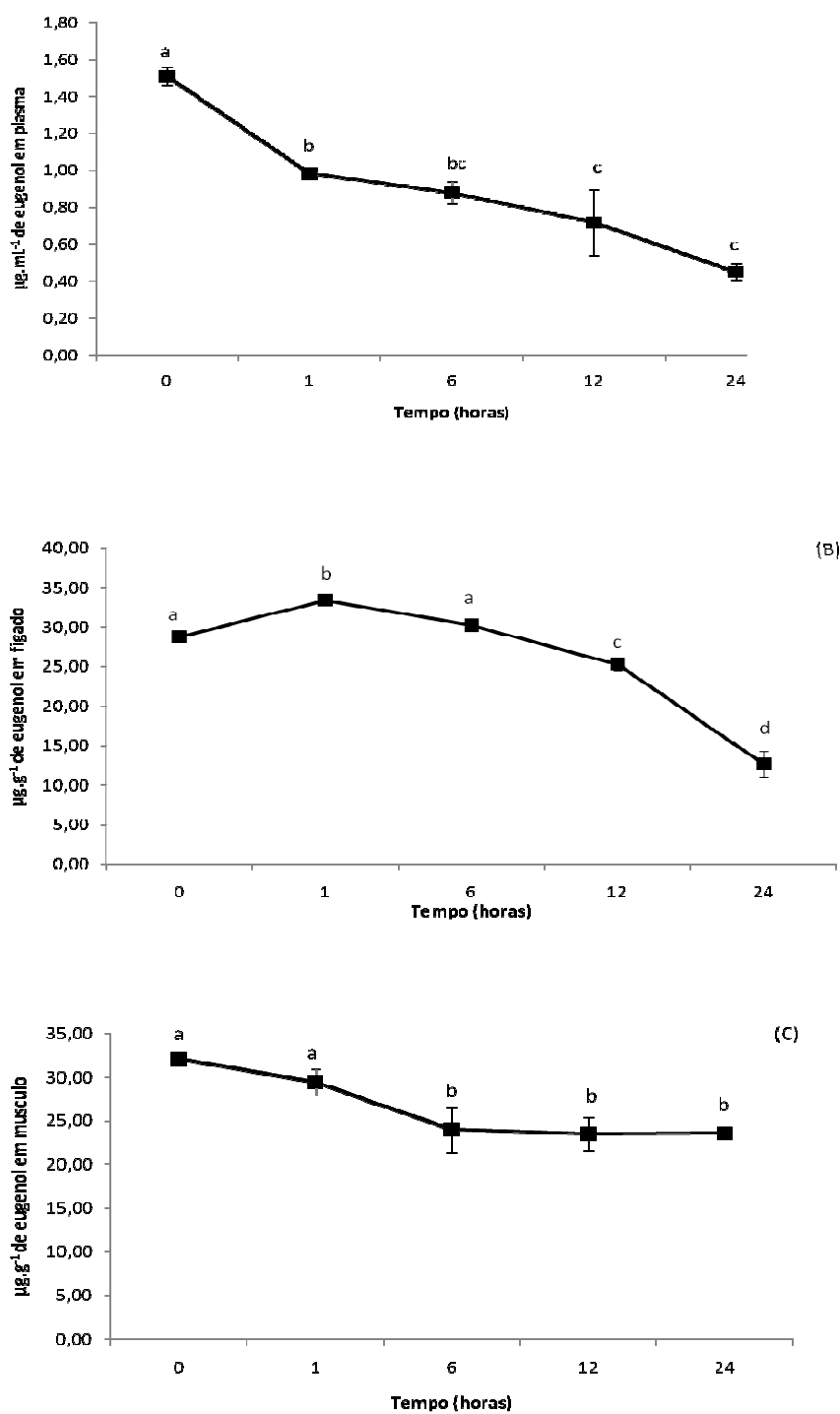


Figura 1: Médias dos valores de resíduos de eugenol em amostras de plasma sanguíneo (A), fígado (B) e músculo (C) de tilápias, *O. niloticus* transportados com 5 mg L<sup>-1</sup> do fármaco.

As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes mostram as diferenças significativas entre as médias (P<0,05).

A concentração dos valores de eugenol no plasma sanguíneo após transporte com 5 mg L<sup>-1</sup> de eugenol (t=0) foi de 1,51 ± 0,05 µg mL<sup>-1</sup>. Em seguida, os peixes foram alocados em aquários para depuração anestésica. Ocorreu redução contínua da concentração de eugenol no plasma de tilápia até atingirem a menor dose de 0,45 ± 0,05 µg mL<sup>-1</sup>, 24 horas após o transporte. Entretanto, este valor não diferiu significativamente com o apresentado por 12 horas de depuração anestésica, que foi de 0,72 ± 0,18 µg mL<sup>-1</sup>.

Na primeira coleta de amostras do fígado (T=0) , a concentração de eugenol foi 28,70 ± 0,56 µg g<sup>-1</sup>. Esta concentração só reduziu após 12 horas de depuração, atingindo valores de 25,28 ± 0,78 µg g<sup>-1</sup>. Após 24 horas de transporte, a dose de eugenol em fígado mostrou-se significativamente mais baixa, com taxa de 12,62 ± 1,63 µg g<sup>-1</sup>.

A concentração de eugenol no tecido muscular de *O. niloticus*, logo após o transporte anestésico com 5 mg L<sup>-1</sup> do produto foi de 32,15 ± 0,07 µg g<sup>-1</sup>. Após esta verificação, os peixes ficaram em aquários de depuração e, de acordo com análises cromatográficas, houve redução significativa na concentração de eugenol no músculo após 6 horas de depuração, cujos valores atingiram 24,04 ± 2,55 µg g<sup>-1</sup>, não diferindo dos outros tempos de amostragens.

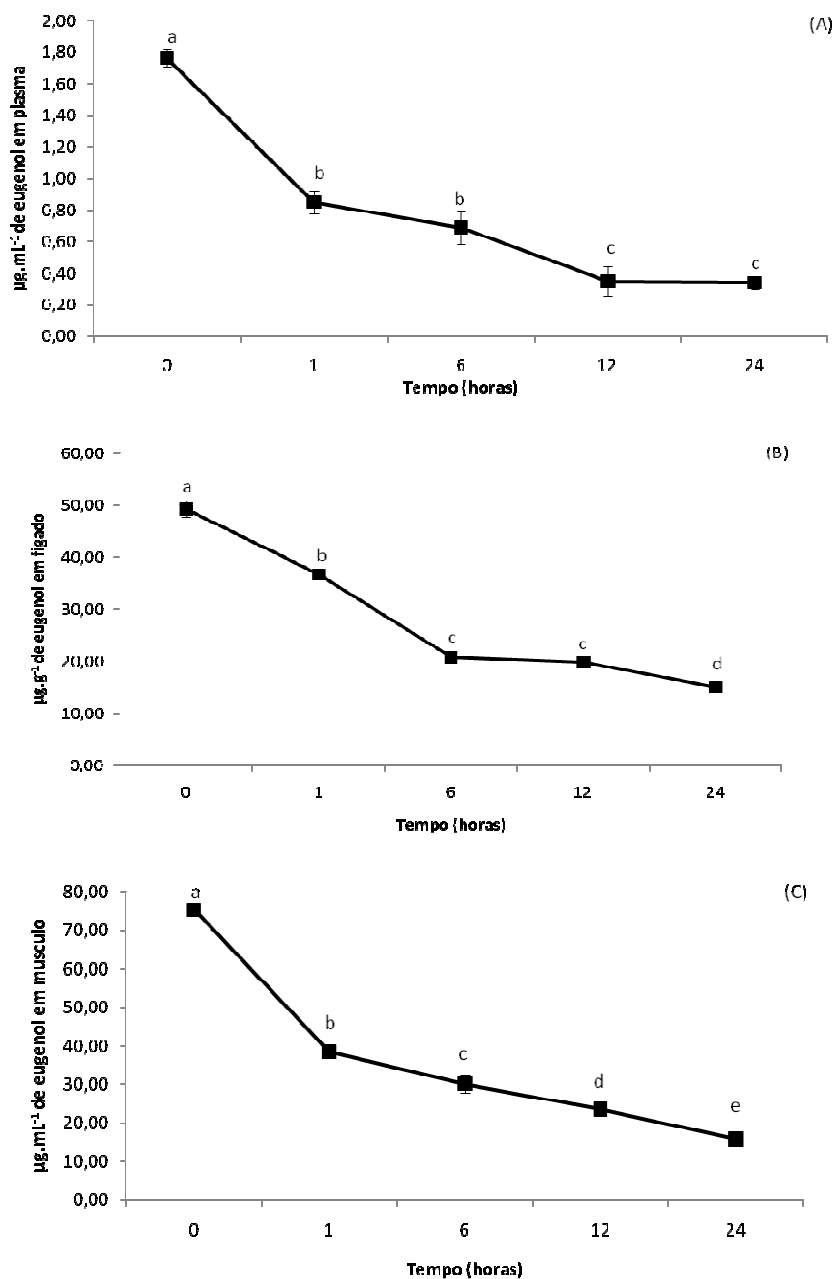


Figura 2: Médias dos valores de resíduos de eugenol em amostras de plasma sanguíneo (A), fígado (B) e músculo (C) de tilápias, *O. niloticus* transportados com 10 mg L<sup>-1</sup> do fármaco.

As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes mostram as diferenças significativas entre as médias (P<0,05).

Nos peixes transportados na dose de 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol, no tempo zero, os resíduos de eugenol no plasma sanguíneo foram de  $1,76 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nas amostras dos demais tempos, nota-se a redução nas concentrações do produto até o tempo de 12

horas, cujos valores foram de  $0,35 \pm 0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estes valores não diferiram significativamente com o apresentado por 24 horas de depuração anestésica, que foram de  $0,34 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Em relação às amostras do fígado, no tempo zero, a concentração de eugenol foi de  $49,17 \pm 1,55 \mu\text{g g}^{-1}$ . A diminuição dos valores da concentração foram até o tempo de 6 horas ( $20,74 \pm 0,35 \mu\text{g g}^{-1}$ ) não diferindo significativamente dos valores dos outros tempos de amostragem.

Os valores de concentração de eugenol no músculo de tilápias, *O. niloticus*, logo após o transporte anestésico com  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de eugenol foi de  $75,31 \pm 0,87 \mu\text{g g}^{-1}$ . Ocorreu redução contínua na concentração do anestésico nesse órgão, até o tempo de 24 horas de depuração anestésica, sendo o valor de  $15,72 \pm 0,30 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Segundo Gomes *et al.* (2001), não há legislação no Brasil quanto à utilização de anestésicos em peixes para consumo humano. Porém, países desenvolvidos como, Estados Unidos e Nova Zelândia possuem regulamentação quanto ao uso do MS-222, benzocaína e Aqui-S<sup>TM</sup>.

Nos EUA, os animais anestesiados com MS-222 e benzocaína devem ser depurados por 21 dias; na Nova Zelândia, para o MS-222 são necessários 10 dias de depuração entretanto, não existe período específico para a benzocaína. Os peixes anestesiados com Aqui-S<sup>TM</sup>, cujo princípio ativo é o eugenol, não necessitam de depuração (Ross & Ross, 2008).

A depuração é utilizada para reduzir ou eliminar esses resíduos e garantir que não ocorram concentrações ilegais. A duração da depuração depende do tipo de droga, as espécies-alvo, a concentração e via de administração, podendo variar horas a vários dias ou semanas (Booth, 1988).

Nesse estudo, nas duas doses de eugenol testadas para transporte, as concentrações do produto no plasma sanguíneo de *O. niloticus* diminuíram continuamente, até 24 horas de depuração anestésica. Esse dado corrobora com os de Guenette *et al.* (2007), estudando resíduos anestésicos em trutas arco-íris, também observaram rápida redução da concentração de eugenol no plasma sanguíneo.

Além das amostragens de fluídos corpóreos, outros órgãos foram utilizados para determinação de resíduos de eugenol, como o fígado e músculo. De acordo com o World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, o eugenol é rapidamente absorvido no trato digestivo e, a seguir, metabolizado no fígado.

Segundo Wagner *et al.* (2002), o eugenol é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não necessitando tempo de carência. Contradizendo os autores, nesse estudo, ao longo de 24 horas de depuração anestésica, houve redução significativa do fármaco nas amostras testadas, entretanto, não ocorreu eliminação total do produto.

Guenette *et al.* (2006), registraram recirculação enterohepática após administração de eugenol em ratos. Esta recirculação é uma característica de compostos fenólicos submetidos à conjugação (Marier *et al.*, 2002), o que pode contribuir com o longo tempo de eliminação do eugenol em órgãos de peixe, como por exemplo, o fígado.

Meinertz *et al.* (2009), anestesiando trutas arco-íris na concentração de 17,70 mg L<sup>-1</sup> de AQUI-S por 60 minutos, determinaram, por cromatografia líquida, concentrações de eugenol nas amostras do tecido muscular nos tempos de 0 e 4 horas. As concentrações de isoeugenol variaram entre 45,00 a 69,90 µg g<sup>-1</sup> no tempo 0 e 2,80 a 6,70 µg g<sup>-1</sup> no tempo 4 horas.

Na figura 3 encontram-se os dados comparando os resíduos do plasma sanguíneo, fígado e músculo de tilápias, *O. niloticus* nos tempo zero (antes da depuração) e no último tempo de amostragem (24 horas de depuração).

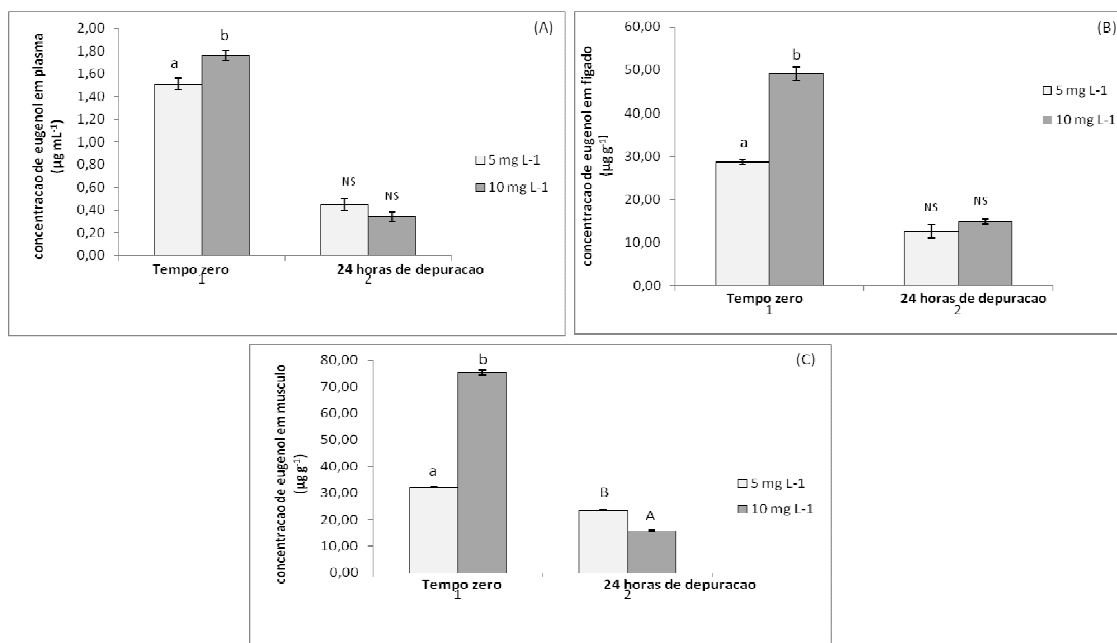


Figura 3 : Médias dos valores de resíduos de eugenol em amostras do plasma sanguíneo (A), fígado (B) e músculo (C) de tilápias, *O. niloticus*, nos tempos 0 e 24 horas após 5 horas de transporte anestésico nas concentrações de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol.

As barras verticais indicam o erro padrão e letras diferentes mostram as diferenças significativas entre as médias ( $P < 0,05$ ).

NS: não significativo.

Na figura 3 é possível visualizar que o plasma sanguíneo, fígado e músculo de tilápias transportadas nas menores concentrações de eugenol (5 mg L<sup>-1</sup>) absorveram significativamente menores quantidades do anestésico, quando comparados com os peixes tratados na maior concentração (10 mg L<sup>-1</sup>). Este resultado contradiz aquele apresentado por Meinertz *et al.* (2006). Os autores descreveram que as menores concentrações de isoeugenol (isômero do eugenol) no tecido muscular de trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* obtiveram valores significativamente superiores comparados com as maiores concentrações, independentes da temperatura da água.

Após 24 horas de depuração anestésica, as amostras do plasma sanguíneo e fígado não diferiram significativamente nas quantidades de resíduo de eugenol, em relação às concentrações de eugenol para o transporte anestésico. Em amostras do músculo de tilápias, os peixes amostrados nas maiores concentrações de eugenol (10 mg L<sup>-1</sup>) apresentaram, significativamente, menores concentrações de resíduos desse fármaco em relação aos transportados com 5 mg L<sup>-1</sup>.

Além da recirculação do eugenol no organismo dos peixes, as altas concentrações de eugenol nos órgãos dos juvenis de tilápia, mesmo após 24 horas de depuração anestésica, podem estar relacionada com a alta quantidade de gordura desses peixes. Segundo Hamelink & Spacie. (1999), o conteúdo lipídico desses animais são fatores determinantes das bioconcentrações.

A bioconcentração é o processo de acumulação de xenobióticos presentes na água pelos peixes e outros organismos aquáticos através de rotas não alimentares (Barron, 1990).

Neste estudo evidenciaram-se, nas concentrações aplicadas de eugenol, os peixes não apresentaram sinais de estresse, visto que, não ocorreram diferenças significativas no número médio de células do sistema leucocitário. Os dados apresentados estão de acordo com os de Oliveira *et al.* (2009), que aplicaram óleo de cravo na água de transporte de *O. niloticus*, por Cooke *et al.* (2004), Inoue *et al.* (2005), Iversen & Eliassen (2009) que utilizaram o produto para anestésiar diferentes espécies de peixes dulcícolas.

As concentrações de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol podem ser utilizadas para o transporte de tilápias sem causarem alterações nos parâmetros hematológicos. Esses dados corroboram com os apresentados por Iversen *et al.* (2003) e Cooke *et al.* (2004).

O comitê da FAO / WHO (Expert Committee on Food Additives, dos EUA) prescreve como ingestão diária aceitável (IDA) de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de eugenol, de peso corporal. Neste trabalho, os peixes que obtiveram as maiores concentrações do anestésico, após 24 horas de depuração anestésica, foram aqueles transportados a  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , com  $23,59 \pm 0,12 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de eugenol no tecido muscular.

Dado que o limite aceitável de consumo de eugenol por seres humanos é de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  por peso corporal, pessoas em uma faixa de peso de 70 kg podem ingerir, com segurança, 175 mg de eugenol. Por conseguinte, uma pessoa que pesa 70 kg teria que consumir mais de 7 kg de juvenis de *O. niloticus*, na maior concentração, para ultrapassar o limite aceitação de eugenol, determinada pela WHO (2006).

Apesar de não ocorrer eliminação das concentrações de eugenol no tecido muscular de tilápias, *O. niloticus*, as concentrações determinadas nos tempos de depuração anestésica não apresentam risco para o consumidor se estes se alimentarem de até 7 kg de filé de pescado por dia.

## **Conclusão**

Os valores de concentrações de 5 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de eugenol foram consideradas ideais para o transporte de tilápias, visto que, não ocorreram alterações nos parâmetros hematológicos dos peixes testados. O período de 24 horas de depuração não foi suficiente para eliminar o eugenol das amostras de plasma sanguíneo, fígado e músculo de tilápias, *O. niloticus*.

## Referências bibliográficas

- ARANA, L. V. **Princípios químicos de qualidade de da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianopolis: Editora da UFSC, 231 p., 2004.
- AZEVEDO, T. M. P. *et al.* Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instuto de Pesca**, São Paulo, 2005.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 2.ed. Santa Maria: UFSM, 352 p., 2009.
- BARRON, M. G. Bioconcentration: will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals? **Environental Science & Technology**, v. 24 (11), p.1612-1618, 1990.
- BARROS, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PEZZATO, L. E.; FALCON, D. R.; GUIMARÃES, I. G. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 895-903, 2009.
- BENFEY, T., BIRON, M., Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Aquaculture**, v. 184, p. 167-176, 2000.
- BENLI, A. C. K.; KÖKSAL, G.; ÖZKUL, A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. **Chemosphere**, v. 72, p. 1355–1358, 2008.
- BENLI, A.C.K.; YILDIS, H.Y. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infecte with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 1388-1390, 2004.

BOOTH, N. H. Drug and chemical residues in the edible tissues of animals. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. (Eds.). **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 6<sup>th</sup> ed. Iowa State Univ. Press, Iowa, p. 1149-1159, 1988.

BURKA, J. F.; HAMMEL, K. I.; HORSBERG, T. E.; JOHNSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARS, D. J. Drugs in salmonid aquaculture - a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, p. 333-349, 1997.

CARNEIRO, P. C. F.; MARTINS, M. L.; URBINATI, E. C. *et al.* Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, v.24, n.2, p.555-560, 2002.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 298-307, 2001.

COLT, J. E.; ARMSTRONG, D. A. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, molluscs, **Bioengineering Symposium for Fish Culture**, v. 1, p. 34-47, 1981.

COOKE, S. J.; SUSKI, C. D.; OSTRAND, K. G.; TUFTS, B. L.; WAHL, D. H. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 239, p. 509-529, 2004.

CUNHA, M. A. Anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas. 2007. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fish Stats Plus**: universal software for fishery statistical time series: version 2.32. Rome, 2007.

- FRANÇA, J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V., CARVALHO, S.; SERIANI, R. Toxicidade crônica do cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) associado ao selênio, através do estudo hematológico em tilápia *Oreochromis niloticus*. **Bioikos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 11-19, 2007.
- GOMES, L. C.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 32, p. 426-431, 2001.
- GROTTUM, J. A.; STAURNES, M.; SIGHOLT, T. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 159-164, 1997.
- GUENETTE, S. A.; BEAUDRY, F.; MARIER, J. F.; VACHON, P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 265–270, 2006.
- GUENETTE, S. A.; UHLAND, F. C.; HELIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 266, p. 262–265, 2007.
- HAMELINK, J. L.; SPACIE, A. Fish and chemicals: The process of accumulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**., v.17, p.167- 177, 1999.
- HILL, D. J.; ROWLEY, A. F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **British Journal of Haematology**, v. 92, p. 200-211, 1996.
- HRUBE, T. C.; SMITH, S. Hematology of fish. In: **Schalm`s Veterinary Hematology**, 5<sup>a</sup>. ed. p. 1120-1125, 1998.
- INOUE, L. A. K. A. *et al.* Effects of clove oil on the stress response of matrinxá (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v. 35 (2), p. 289-295, 2005.

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C. S.; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V.; FERREIRA, C. M. Hematological challenge with Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal mercury concentrations. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 4, p. 619-626, 2007.

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R. A. The Effect of AQUI-S\_ Sedation on Primary, Secondary, and Tertiary Stress Responses during Salmon Smolt, *Salmo salar* L., Transport and Transfer to Sea. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 2, p. 216-225, 2009.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; McKINLEY, R. S.; ELIASSEN, R. A. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potencial stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566, 2003.

IWAMA, G., PICKERING, A.D., SUMPTER, P.J., SCHRECK, C.B. **Fish stress and Health in Aquaculture**. Cambrigde University Press, 432p., 1997.

LOWE-JINDE, L.; NIIMI, A. J. Influence of sampling on the interpretation of haematological measurements of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p. 396-402, 1983.

MARIER, J. F.; VACHON, P.; GRITSAS, A.; ZHANG, J.; MOREAU, J. P.; DUCHARME, M. P. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, p. 369–373, 2002.

- MARTINS, M. L. Manejo sanitário na piscicultura. In: Ranzani-Paiva, M. J. T. *et al.* **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela. pt. IV, cap. 15, p. 323-332, 2004.
- MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; NOMURA, D. T.; FENERICK, J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples e consecutivos de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, p. 195-204, 2002.
- MATTSON, N. S.; RIPPLE, T. H. Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and phenoxyethanol. **Aquaculture**, v. 83, p. 89-94, 1989.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal Veterinary and Animal Science**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p.231-238, 2003.
- McDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWANA, G. W.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p. 119-144, 1997.
- MEINERTZ, J. R.; GRESETH, S. L.; SCHREIER, T. M.; BERNARDY, J. A.; GINGERICH, W. H. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S™ at different temperatures, durations, and concentrations. **Aquaculture**, v. 254, p. 347–354, 2006.
- MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-S™ exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 296, p. 200–206, 2009.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211–268, 1999.

MORALES, A. E.; CARDENETE, G.; ABELLÁN, E.; GARCÍA-REJÓN, L. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 33-40, 2005.

MUNDAY, P. L.; WILSON, S. K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. **Journal of Fish Biology**, v. 51, p. 931-938, 1997.

OLIVEIRA, J. R.; CARMO, J. L.; OLIVEIRA, K. C.; SOARES, M. C. F. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1163-1169, 2009.

OLSEN, D. H.; SORENSENA, N. K.; STORMOA, S. K.; ELVEVOLLA, E. O. Effect of slaughter methods on blood spotting and residual blood in fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 258, p. 462–469, 2006.

PARK, M. O.; HUR, W. J.; IM, S. Y.; SEOL, D. W.; LEE, J.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 8, p. 877-884, 2008.

PICKFORD, G. E., SRIVASTAVA, A. K., SLICHER, A. M., PANG, P. K. T. The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Journal Experimental Zoology**, v. 177, p. 89-96, 1971.

PIPER, R. G.; McELVAIN, I. B.; ORME, E.; McCRAREN, J. P.; FOWLER, L. G.; LEONARD, J. **Fish Hatchery Management**. US Fish and Wildlife Service, Washington, D. C., 1982.

- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; LUQUE, J. L. Parasitological and hematological analysis in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757, from Guarapiranga Reservoir São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 3, p. 231-237, 2005.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; EIRAS, A. C.; SILVEIRA, V. R. Effects of an experimental challenge with *mycobacterium marinum* on the blood parameters of nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 945-953, 2004.
- RIBAS, L.; FLOS, R.; REIG, L.; MACKENZIE, S.; BARTON, B. A.; TORT, L. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**, v. 269, p. 250–258, 2007.
- ROCHA, R. M. ; CARVALHO, E. G. ; URBINATI, E. C. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 245-249, 2004.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memorial do Instituto Butantã**, v. 20, p. 315-328, 1947.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 240 p., 2008.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, F. A. L.; VAL, A. L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.

- SHIAU, S. Y.; LUNG, C. Q. No dietary vitamin B12 required for juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 105 A, p. 147-150, 1993.
- SILVA, A. L. N.; SIQUEIRA, A. T. **Piscicultura em tanques-rede: princípios básicos**. Convenio Recife: SUDENE/FADURPE – Departamento de Pesca/UFRPE. Imprensa Universitária, 72 p., 1997.
- SILVA, J. R. M. C., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J., BARBIERI, R. L. Induced inflammatory response in the Antarctic fish *Notothenia neglecta* **Polar Biology**, v. 20, p. 206-212, 1998.
- SILVA, R. **Anestesia em peixes**, Apontamento das aulas práticas da cadeira de Tecnologias em Aquacultura. [S.L.]: ALGARVE: Universidade do Algarve, 2002.
- SLADKY, K. K.; SWANSON, C. R.; STOSKOPF, M. K.; LOOMIS, M. R.; LEWBART, G. A. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachipomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.
- SOTO, C.; BURHANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v. 136, p. 149-152, 1995.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., 2000, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Panorama da Aquicultura Magazine, p. 533-541, 2000a.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 16, p. 76-82, 2000b.

TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 14, p. 254-263, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R., **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 144p., 2004.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**. n. 23, p. 709-712, 2007.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 270-275, 1997.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Part II. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 273-277, 2001.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 16, n. 1, p. 75-85, 2001.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; LANDINES, M. A. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389-400, 2004.

VOLKOV, I. V. On the physiology of the leukocyte system of *Vimba vimba* from Neman river. **Journal of Ichthyology**, v. 18, n. 1, p. 148-153, 1978.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, p. 353-366, 2002.

WHO. Eugenol and Related Hydroxyallylbenzene Derivatives. **JECFA Monograph 530: WHO Food Additives Series 1138**. World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponivel em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je09.pdf>, 2006.

WOJTASZEK, J., DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D., LOZINSKA-GABSKA, M., ADAMOWICZ, A., DZUGAJ, A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Ciprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, p. 176-183, 2002.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 340-347, 2002.

YILDIZ, H.Y.; PULATSÜ, S. Evaluation of the secondary stress response in healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) after treatment with a mixture of formalin, malachite green and methylen blue. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 30, p. 379-383, 1999.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5 Edition, Prentice Hall, 960 pp., 2009.

## 5. Conclusões gerais

Pode-se concluir que, para tilápias do Nilo, *O. niloticus*:

- Os valores de concentrações testadas foram capazes de induzir os peixes aos estágios de anestesia e apresentaram relação inversa entre os tempos de indução e o aumento das concentrações. A concentração ideal de eugenol, considerada mínima necessária para produzir anestesia profunda, foi de 100 mg L<sup>-1</sup>;

- O método estudado e validado para determinação de eugenol, por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama, utilizando a análise do *headspace* das amostras de tilápia, mostrou ser prático, rápido e eficiente, podendo ser aplicado ao estudo de resíduos de eugenol, empregado como anestésico, no plasma sanguíneo, fígado e músculo;

- A concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> do anestésico eugenol não interferiu nos parâmetros hematológicos. Avaliando-se a eliminação do resíduo anestésico, por cromatografia gasosa, após 24 horas de depuração anestésica, não ocorreram eliminação total do fármaco nas amostras testadas (plasma sanguíneo, fígado e músculo).

- As concentrações 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol testadas para o transporte anestésico não alteraram os parâmetros hematológicos dos peixes testados, sendo consideradas ideais para o transporte de exemplares de tilápia.

- Nas concentrações anestésicas aplicadas (5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de eugenol), o período de 24 horas de depuração anestésica não foi suficiente para a eliminação total do eugenol das amostras de exemplares de tilápia.