



ROBSON AUGUSTO PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DE ANESTÉSICOS
RESIDUAIS EM FILÉS DE CACHADIA
(*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius
marmoratus*) E TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

LAVRAS-MG

2013

ROBSON AUGUSTO PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DE ANESTÉSICOS RESIDUAIS EM FILÉS
DE CACHADIA (*Pseudoplatystoma reticulatum x Leiarius marmoratus*) E
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Adelir Aparecida Saczk

Coorientador

Dr. Daniel Okamura

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pereira, Robson Augusto.

Determinação de anestésicos residuais em filés de cachadiah
(*Pseudoplatystoma reticulatum x Leiarius marmoratus*) e tilápia
(*Oreochromis niloticus*) / Robson Augusto Pereira. – Lavras :
UFLA, 2013.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Adelir Aparecida Saczk.

Bibliografia.

1. Anestésicos. 2. Análise residual. 3. Extração em fase sólida. 4.
Filés de peixes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 543.0894

ROBSON AUGUSTO PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DE ANESTÉSICOS RESIDUAIS EM FILÉS
DE CACHADIA (*Pseudoplatystoma reticulatum x Leiarius marmoratus*) E
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em: 28 de fevereiro de 2013

Dra. Priscila Vieira e Rosa UFLA

Dra. Andréia Peraro do Nascimento USP

Dra. Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

Dr. Daniel Okamura
Coorientador

**LAVRAS – MG
2013**

*A Deus, pelo dom da vida e por mais uma etapa alcançada;
Aos meus pais, meus avós e toda minha família, pelo apoio
e compreensão nesses anos todos;
A todas as pessoas que influenciaram direta e indiretamente para
que eu pudesse chegar aonde cheguei;
Aos otimistas e pessimistas e aos que torceram contra e a favor.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, desde 2006 responsável pela minha formação profissional e pessoal;

Ao Departamento de Química onde realizei os experimentos deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica e Agrobioquímica, pela oportunidade de realização deste curso;

À FAPEMIG, pela bolsa de mestrado concedida;

Ao CNPq e ao Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA) pelo apoio financeiro;

À professora Dra. Adelir Saczk, pela confiança e orientação neste trabalho, amizade e ensinamentos ao longo desses seis anos;

Ao Dr. Daniel Okamura, pela orientação e grande ajuda no desenvolvimento do trabalho;

À Dra. Priscila Vieira e Rosa, pela confiança depositada em mim e pela participação em minha banca;

À Dra. Andréia Peraro Nascimento, pelo aceite, compreensão e disponibilidade em participar de minha banca;

À Professora Dra. Maria das Graças Cardoso, por gentilmente ceder espaço no seu laboratório para a realização das análises;

Ao Leandro, pela força e dedicação na realização deste trabalho, e ao Renan que além do projeto contribuiu com visitas ao Melão em Varginha, deu *nóis*;

Ao Wilder, pela amizade, paciência e auxílio com as análises cromatográficas;

Ao Rafael e Thallis, pela colaboração para a realização deste trabalho;

As colegas de laboratório. Bianca e Meryene, pela ajuda e apoio durante todo o tempo e principalmente;

Ao Nathan, pela ajuda importante na reta final e ao Vinicius, pelo auxílio nas extrações e na rotoevaporação;

Aos colegas; João Guilherme, Maria Luíza, Marcus, Leonardo, Rafaela e Karen, pelo auxílio nas análises de extração em fase sólida;

Ao setor de Bioquímica, pela cessão do espaço e equipamentos para as extrações;

À Shirley, pela disponibilidade e auxílio nesses dois anos, e principalmente nas últimas semanas;

Ao Hugo, pela sua amizade, conselhos e auxílio sempre que precisei;

Aos demais professores e colegas do Departamento de Química e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho;

Em especial à Rafaela Bastos, presente de Deus, obrigado por estar comigo.

MUITO OBRIGADO!!!

"Nunca ande por caminhos já traçados,
pois eles conduzem somente até onde os
outros já foram."

Graham Bell

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a quantificação residual dos anestésicos óleo de cravo, benzocaína e tricaína em filés de duas espécies de peixes, uma espécie de couro, cachadia (*Pseudoplatystoma reticulatum x Leiarius marmoratus*), e uma espécie de escama, tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando extração sólido-líquido (SLE) e em fase sólida (SPE), seguidas de análise em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Foram avaliadas anestésias em 5 concentrações, definidas a partir do tempo de indução para cada espécie e 4 tempos de depuração (0 h, 12 h, 24 h e 48 h) em 4 repetições. A variância das médias residuais entre anestésicos, concentrações e espécies de peixes foi comparada. Após a anestesia (0 h), as espécies, tilápia e cachadia, apresentaram resíduos de benzocaína de $1,46 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,6 \mu\text{g g}^{-1}$, tricaína $0,397 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,17 \mu\text{g g}^{-1}$ e eugenol $0,514 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,987 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Peixes que foram depurados por 12 h, 24 h e 48 h apresentaram valores abaixo dos limites de detecção e quantificação. A benzocaína apresentou maior concentração residual média para tilápia e a cachadia ($P < 0,01$) em função de sua baixa solubilidade. A tricaína demonstrou menor quantidade média residual para tilápia e o eugenol para a cachadia. Entre as 5 concentrações aplicadas não houve diferença significativa ($P > 0,01$), com exceção da menor concentração de tricaína em tilápia, a qual resultou em maior concentração residual. Por fim, os valores médios de resíduos em a cachadia foram maiores que na tilápia. Assim, quanto à análise residual, a tricaína e o eugenol são os anestésicos mais indicados para tilápias e cachadia, respectivamente.

Palavras-chave: Anestésicos. Análise residual. Extração em fase sólida. Filés de peixe.

ABSTRACT

In this work the residual quantification of the anesthetics clove oil, benzocaine and tricaine was performed for fillets of two species of fish, one leather species, “cachadia” (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*), and other scale species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through solid-liquid extraction (SLE) and in solid phase (SPE), followed by analysis in high performance liquid chromatography with diode arrays detector (HPLC – DAD). Anesthesia was evaluated in five different contents defined according to the induction time for each species and four depuration times (0 h, 12 h, 24 h and 48 h) in four repetitions. The variance of residual means among anesthetics, contents and fish species was compared. After anesthesia (0 h), the species presented residues of benzocaine corresponding to 1.46 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 2.6 $\mu\text{g g}^{-1}$, tricaine 0.397 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 2.17 $\mu\text{g g}^{-1}$ and eugenol 0.514 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0.987 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. Fishes depurated during 12 h, 24 h and 48 h presented values below detection and quantification limits. Benzocaine presented the highest residual mean contents for tilapia and “cachadia” ($p < 0.01$) in function of its low solubility. Tricaine presented lower residual means for tilapia and eugenol for “cachadia”. There was no difference among the five applied contents ($p > 0.01$), except for the lowest content of tricaine in tilapia, which resulted in higher residual contents. Lastly, mean values of residues in “cachadia” were higher than tilapia. Thereby, regarding the residual analysis, tricaine and eugenol are the most indicated anesthetics for tilapia and “cachadia”, respectively.

Keywords: Anesthetics. Residual analysis. Solid phase extraction. Fish fillets

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Segurança alimentar	15
2.2	Manejo aquícola	17
2.3	Cachadia e Tilápia	20
2.4	Anestésicos	23
2.4.1	Benzocaína e tricaína	25
2.4.2	Óleo de cravo	27
2.5	Estudo da farmacocinética dos anestésicos	29
2.6	Análise Residual	31
3	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	SEGUNDA PARTE	44
	ARTIGO Quantificação de óleo de cravo, benzocaína e tricaína residual em filés de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) e cachadia (<i>Pseudoplatystoma reticulatum x Leiarius marmoratus</i>).....	45
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO	69

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos não devem representar riscos à saúde mediante sua exposição em qualquer quantidade. A alta necessidade de disponibilidade aliada ao desenvolvimento sustentável tem tornado o uso de agentes biológicos, físicos e químicos fatores importantes quanto à inocuidade e segurança durante toda a cadeia de produção do alimento.

Os agentes químicos empregados na cadeia produtiva dos alimentos como, por exemplo, fertilizantes e medicamentos veterinários, podem expor o alimento a uma contaminação tornando necessária sua aplicação de maneira segura e eficiente, garantindo a qualidade e segurança do produto final.

O processo de produção na aquicultura é compreendido por operações como transporte, medicação e vacinação e marcação de matrizes. Esses procedimentos provocam reações adversas aos animais e por esse motivo tem crescido nos últimos anos o uso de anestésicos para reduzir o estresse, facilitar o manuseio e permitir pequenas intervenções cirúrgicas.

Os anestésicos mais comuns utilizados na aquicultura são a triclaína, benzocaína, isoeugenol, metomidato, 2-fenoxietanol e quinaldina. Um anestésico pode ser considerado ideal quando possui tempo de indução a anestesia de aproximadamente 3 minutos e 5 minutos de recuperação. Esses parâmetros são definidos por estudos da eficiência destes compostos em diferentes métodos de aplicação, bem como a determinação de possíveis traços residuais na composição do pescado. Assim é possível definir margens seguras para seu consumo conhecendo o tempo necessário para a eliminação destes anestésicos pelos peixes.

Apesar de sua utilização já estar bem disseminada entre os produtores, o Brasil ainda não possui protocolos bem caracterizados para utilização de anestésicos nas espécies aqui cultivadas e ainda são necessárias informações

acerca da eficiência dos anestésicos disponíveis no mercado nacional, bem como a análise residual destes compostos nos peixes aqui cultivados.

Na aquicultura brasileira, a tilápia possui unidades produtivas distribuídas em quase todo território nacional, sendo a espécie mais produzida do setor aquícola. Outras espécies de destaque são os híbridos, produzidos por cruzamentos de espécies, como por exemplo, a cachadia (cruzamento de cachara com jundiá) e o surubim (cruzamento entre pintado e cachara), estes peixes diferem-se da tilápia por não apresentarem escamas, sendo as espécies com pele de couro mais cultivadas no país, principalmente na região centro-oeste.

O Brasil ocupa a 17^o posição mundial na produção de pescado, um aumento de 13,7% entre 2008 e 2009 e de 40% do setor aquícola no mesmo período, reforçando a necessidade da qualidade e segurança do pescado produzido no país (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2010; 2012).

No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (PNCRB) regulamenta o monitoramento em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, pescado, mel, ovos e avestruz. A Instrução Normativa nº11 (IN11) de 22 de maio de 2012 definiu limites de contaminantes inorgânicos, antimicrobianos, pesticidas, organoclorados, bifenilospoliclorados (PCB's) e corantes em pescado, no entanto ainda são necessários estudos e pesquisas envolvendo o uso de anestésicos no manejo aquícola para que sejam definidos protocolos de aplicação e períodos de depuração de peixes submetidos à anestesia.

Países como os EUA, Canadá e Reino Unido regulamentaram um período de depuração de 21 dias, antes de serem liberadas para o consumo algumas espécies de peixes anestesiadas com triclaína. Na Noruega este período de depuração vale tanto para triclaína quanto para a benzocaína.

Coreia do Sul, Nova Zelândia, Austrália, Costa Rica e Chile possuem regulamentação quanto ao uso de AQUI-S[®] (anestésicos contendo o princípio ativo isoeugenol). Nesses países não é necessário período de depuração desde que sejam respeitados os parâmetros indicados pelos fabricantes.

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho determinar os anestésicos residuais benzocaína, tricaína e óleo de cravo (eugenol) em duas espécies de peixes, cachadiah (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidas à anestesia em diferentes concentrações e tempos de depuração, utilizando metodologias para extração e quantificação via cromatografia líquida de alta eficiência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Segurança alimentar

A oferta de alimentos de forma globalizada, e a evolução da complexidade da cadeia alimentar, tem chamado atenção das autoridades quanto à segurança alimentar. A saúde pública em sua concepção pode ser influenciada por doenças transmitidas por alimentos trazendo ameaças à segurança alimentar, uma vez que constituem uma fonte difusa potencial de contaminação (FAO, 2013).

Agentes biológicos, físicos e químicos representam fatores importantes quanto à inocuidade e segurança durante toda a cadeia de produção do alimento, desde a matéria prima ao produto final na mesa do consumidor (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO-*World Health Organization*) tem como missão ajudar os países que a compõe a adequarem seus programas de segurança dos alimentos, tornando o processo de produção seguro até o consumo final. No ano de 2010 foi aprovada uma resolução pela Assembleia Mundial da Saúde, direcionando estratégias globais da OMS para a Segurança Alimentar (WHO, 2013).

O uso de fertilizantes em plantas, bem como a utilização de medicamentos veterinários, por exemplo, podem expor o alimento a uma contaminação. Os agentes químicos são largamente empregados na cadeia produtiva dos alimentos, desde sua aplicação nas plantas e animais até o processamento do produto final. Assim, a aplicação desses agentes químicos deve ser feita de maneira segura e eficiente, garantindo a qualidade do produto final (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

No Brasil, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) possui normas e regulamentos que funcionam como mecanismos de segurança e qualidade para os alimentos de origem animal, as quais são aplicadas por meio de ações de fiscalização, investigação e auditorias (MAPA, 2013a).

Em 26 de junho de 2009 a Lei nº 11.958 criou o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), por meio da qual as responsabilidades legais na área de sanidade pesqueira e aquícola foram transferidas do MAPA para o MPA (MPA, 2012).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) regulamenta o monitoramento em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, pescado, mel, ovos e avestruz. A Instrução Normativa nº11 (IN11) de 22 de maio de 2012 definiu limites de contaminantes inorgânicos, antimicrobianos, pesticidas, organoclorados, bifenilospoliclorados (PCB's) e corantes em pescado, no entanto ainda são necessários estudos e pesquisas envolvendo o uso de anestésicos no manejo aquícola para que sejam definidos protocolos de aplicação e períodos de depuração de peixes submetidos à anestesia.

O carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) atesta a qualidade sanitária, tecnológica e a adequação quanto à legislação vigente de produtos de origem animal, desde o ano de 1915, quando foi criado. Atualmente está presente em mais de 180 países, tornando o Brasil um dos grandes exportadores de alimentos de origem animal do mundo (MAPA, 2013b).

A contribuição entre diferentes setores é crucial para a proteção da saúde humana, além disso, o papel de destaque do Brasil na produção de alimentos de origem animal torna necessário o controle de diversos parâmetros quanto à segurança alimentar, garantindo a qualidade do nosso produto frente aos demais países.

2.2 Manejo aquícola

A produção mundial de pescado atingiu 146 milhões de toneladas em 2009, sendo 43% (60,5 milhões) provenientes da China e apenas 0,86% do Brasil, que ocupa a 17ª posição mundial de produção de pescado. O Brasil produziu no ano de 2010 1.264.765 toneladas, sendo 479.399 (37,9%) provenientes da produção aquícola nacional dividida entre aquicultura marinha e continental, aumento de 2% no total e 15,3% no setor aquícola em relação ao ano de 2009. A pesca extrativa marinha continua como principal modalidade de produção de pescado no Brasil (MPA, 2010).

A distribuição das unidades produtivas da aquicultura no território brasileiro pode ser visualizada na Figura 1.

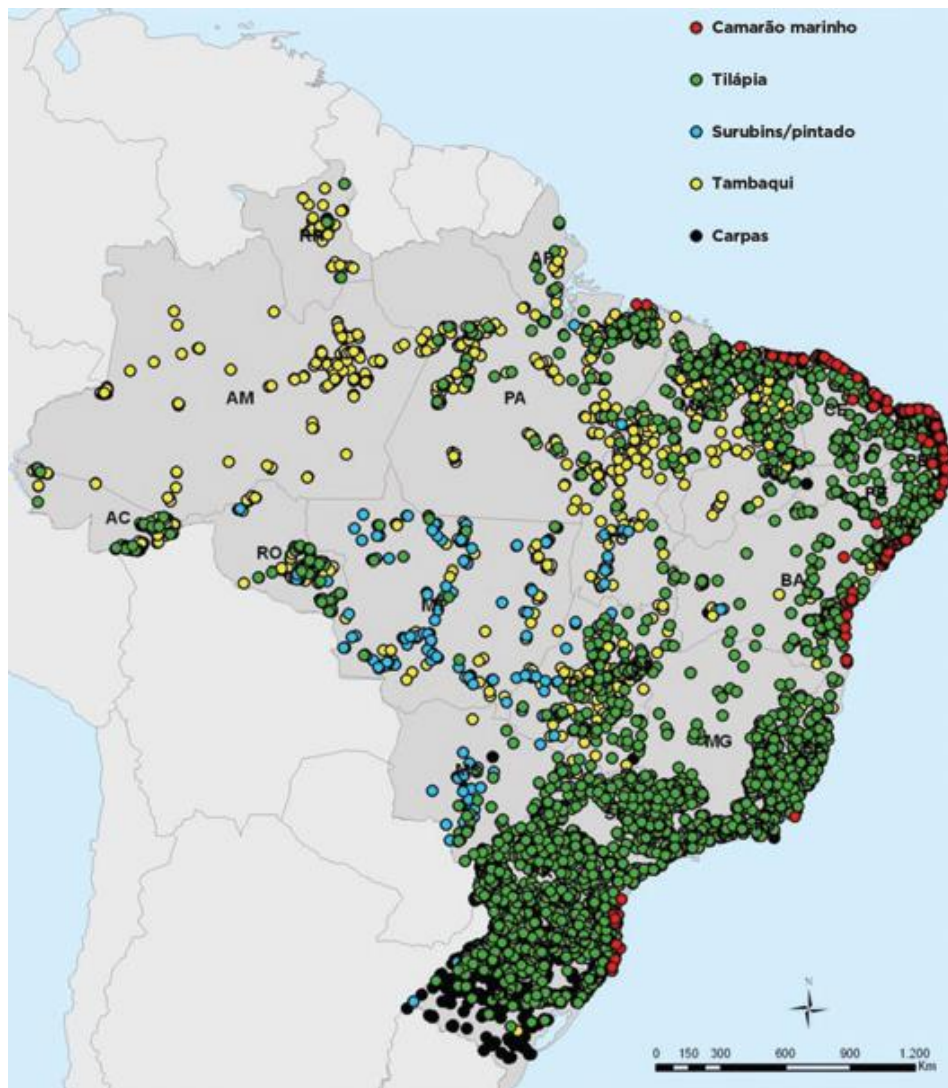


Figura 1 Distribuição das unidades produtivas de pescado na aquicultura no Brasil
 Fonte: Cartilha do Pescador e Aquicultor (MPA, 2013)

A tilápia é a espécie com maior distribuição de unidades produtivas compreendida em quase todo território nacional. Em sequência destaca-se a produção de tambaqui, camarão marinho, surubim/pintado e carpas. Assim, a aquicultura permite a disponibilidade de pescado em regiões onde a pesca

extrativa é inviável (MPA, 2013). Os híbridos surubim/pintado, cachadia, híbrido de cachara e jundiá, são da ordem Siluriformes, os peixes desta ordem não apresentam escamas pelo corpo, sendo revestidos apenas de pele espessa, popularmente chamados peixes de couro, têm apresentado destaque no mercado pelo sabor do filé e elevada produtividade.

A aquicultura difere-se da pesca extrativa, pois é definida como o cultivo de animais aquáticos como peixes, moluscos, crustáceos ou qualquer animal que tenha alguma fase de seu desenvolvimento na água, já a pesca extrativa realiza extrações controladas de pescado sem, no entanto, realizar operações sistemáticas de manejo (MAPA, 2009).

Segundo Vera et al. (2010) durante o processo de produção de pescado, os animais estão sujeitos a diversas fontes de stress e contaminação por agentes químicos (antibióticos, desinfetantes, vacinas e anestésicos).

Operações de manejo e transporte, marcação de matrizes, aplicação de hormônios e vacinas, além de coleta de sangue e de tecidos para análise, imprimem intenso desgaste aos animais (METTAM et al., 2011; SNEDDON, 2009) e neste contexto compostos anestésicos ou analgésicos têm sido empregados para tentar amenizar o efeito negativo destas práticas (ACERETE et al., 2004; FRISCH; ANDERSON, 2000; MYLONAS et al., 2005; RUANE; CARBALLO; KOMEN, 2002; ROSS; ROSS, 2008).

Sneddon (2009; 2012) relata que a relação entre parâmetros neurobiológicos e de comportamento sugerem que os peixes, assim como os seres humanos, sentem dor. Embora não possam comunicar seus sentimentos e apresentarem estrutura neurológica diferente, foram desenvolvidos critérios de avaliação e indicadores específicos e de fácil identificação para o sentimento de dor.

Um agente químico deve ser selecionado para aplicação considerando fatores como a sua disponibilidade no mercado, viabilidade, objetivo, facilidade e segurança do uso (CHO; HEAT, 2000; SOTO; BURHANUDDIN, 1995).

Os fármacos na aquicultura são administrados geralmente via ingestão (alimento), injeção (aplicação direta) ou imersão (soluções). Com exceções das aplicações diretas intramusculares e intraperitoneais, outros métodos de aplicação como o de imersão podem não ser tão eficientes, devido à absorção incompleta por problemas de solubilidade dos fármacos, o que prejudica o objetivo final (SUN et al., 2010).

O primeiro relato do uso de anestésicos em peixe foi a mais de 40 anos, deste então foram desenvolvidos diversos agentes químicos e diferentes procedimentos para a insensibilização de peixes (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004).

Atualmente os anestésicos mais utilizados na aquicultura são: triclaína, benzocaína, óleo de cravo, ou formulações contendo seu ingrediente ativo, o isoeugenol, mentol, quinaldina e metomidato (CCAC, 2011; FDA, 2011; KIESSLING et al., 2009; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

A combinação de diferentes anestésicos e analgésicos tem sido encorajada ultimamente, como forma de diminuir efeitos tóxicos (HUANG et al., 2010; METTAM et al., 2011; ZAHL, et al., 2009).

2.3 Cachadía e Tilápia

Na aquicultura a busca por híbridos por meio do cruzamento de espécies tem aumentado os índices zootécnicos, a produtividade e a facilidade no manejo de espécies. O surubim, cruzamento de pintado e cachara (♂ *Pseudoplatystoma corruscans* x ♀ *Pseudoplatystoma fasciatum*), vêm ganhando espaço na aquicultura nacional devido a sua taxa de sobrevivência e ganho de peso

(BIGNOTTO et al., 2009), assim como o cachadia (Figura 2) é um híbrido da fêmea do cachara com o macho do jundiá do norte ou amazônico (♂ *Pseudoplatystoma reticulatum* x ♀ *Leiarius marmoratus*) (FARIA et al., 2011).



Figura 2 Cachadia (♀ *Pseudoplatystoma reticulatum* x ♂ *Leiarius marmoratus*)

Ambas as espécies deste híbrido são animais da ordem Siluriforme e da família Pimelodidae, porém de gêneros diferentes e apresentam características como a ausência de escamas e pele espessa, sendo os animais deste gênero popularmente denominados de “peixes de couro”, além de possuírem pequena incompatibilidade genética e semelhança numérica e morfológica dos cromossomos (BRITSKI; SILIMON; KEVE, 1999).

O híbrido cachadia surgiu devido à produção de juvenis de cachara ser dificultada nas fases iniciais durante a alimentação dos seus juvenis. O cruzamento produziu juvenis mais vorazes que os de cachara puro e os híbridos intragênero, reduzindo também o problema com canibalismo (CAMPOS, 2010).

Faria et al. (2011) em estudos sobre a produção deste híbrido em sistemas de recirculação, o cachadia atingiu, em média, 1,1 kg de peso vivo em sete meses de cultivo em sistema de recirculação de água, confirmando seu alto potencial para a aquicultura, além de apresentarem alta taxa de sobrevivência.

Poucos estudos envolvendo esta espécie são encontrados na literatura, visto que se trata de um híbrido recente, sendo necessário, portanto, mais estudos que envolvam diversos procedimentos desde os processos de produção até o processamento do produto final. O desenvolvimento da produção nacional de novos híbridos requer um sistema de produção economicamente mais rentável, quando comparada a outras espécies produzidas, além de normas de manejo e processamento do pescado que contribuam para a segurança e qualidade do produto final (OKAMURA, 2009).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 3) pertence à família Cichlidae, originária de rios africanos, Jordânia e Palestina. Embora seja apta a viver e reproduzir em ambiente marinho (HILSDORF, 1995).

A primeira espécie chegou ao Brasil em 1952, mas a produção aquícola só foi introduzida no Brasil pelo Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DENOCS), no Ceará em 1971 (SEBRAE, 2008).



Figura 3 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A produção de tilápia corresponde a 13% de todo o pescado produzido no Brasil, totalizando 165.061 toneladas das quais 94% são provenientes da aquicultura, colocando a tilápia como a espécie de peixe mais produzida no país (MPA, 2010).

A qualidade do filé de tilápia faz com que sua produção aumente sucessivamente a cada ano. Entre 2008 e 2010 a produção de tilápia em aquicultura aumentou em cerca de 40%, indicando um mercado promissor.

As tilápias possuem hábitos lentos e são resistentes a enfermidades, podem tolerar concentrações de oxigênio dissolvido inferiores a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$. Apresentam melhor desempenho produtivo quando são mantidas em entre $26 \text{ }^\circ\text{C}$ e $28 \text{ }^\circ\text{C}$ (CASTAGNOLLI, 1992).

2.4 Anestésicos

Os agentes químicos denominados compostos anestésicos são aqueles que provocam primeiro uma sedação primária e em seguida perda progressiva da mobilidade, do equilíbrio e consciência e finalmente o bloqueio das ações de reflexo em função do aumento de sua concentração ou tempo de exposição (WEBER et al., 2009; 2011).

A anestesia consiste em diminuir a níveis seguros funções biológicas específicas como a dor (anestesia local) e a consciência, ou seja, um sono artificial e relaxamento muscular (anestesia geral). Os primeiros relatos de anestésicos aconteceram no século XIII com a descoberta do éter, por Raimundo Lulio (MASSONE, 2008).

Os anestésicos locais (AL) são os mais utilizados devido seu rápido tempo de ação, baixas taxas de reação alérgica e fácil metabolização. No entanto é preciso conhecer sua farmacocinética e farmacodinâmica, a fim de se estabelecerem parâmetros seguros de aplicação baseados no seu mecanismo, tempo de ação e eliminação do organismo (KIESSLING et al., 2009).

A estrutura química básica de um AL é composta de uma função aromática ou alicíclica, uma cadeia intermediária de éster (Figura 4a) (derivados do ácido p-aminobenzênico, por exemplo) ou amida (Figura 4b) e um

grupamento amina secundário ou terciário (ARAÚJO; DE PAULA; FRACETO, 2008).

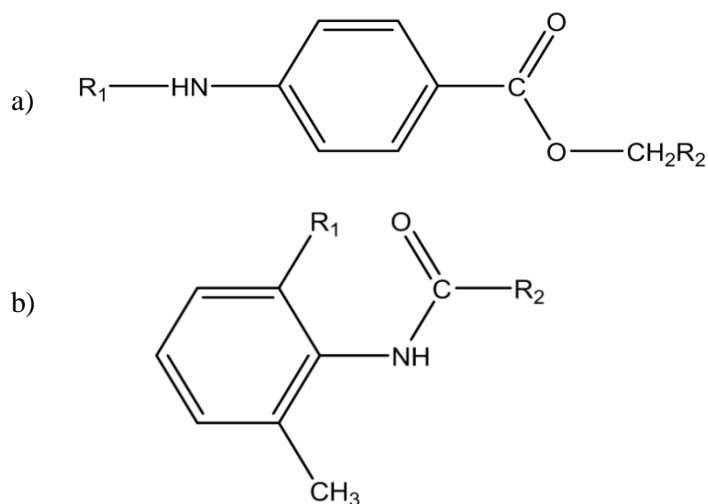


Figura 4 Estrutura química de anestésico local derivado de um éster (a) e amida (b) onde R_1 e R_2 são cadeias alifáticas quaisquer.

A presença de um grupamento amina em R_1 e/ou R_2 é responsável por seu caráter anfifílico, ou seja, mantém-se em equilíbrio na forma carregada ou neutra em função do pH do meio, tornando o composto iônico ou apolar e definindo assim a sua solubilidade.

Uma das hipóteses do mecanismo de ação anestésica dos AL está relacionada ao bloqueio dos canais de sódio nas células nervosas, além de sua distribuição em outras áreas da membrana celular em virtude de sua estrutura química anfifílica. Ao bloquear os canais de sódio e potássio os anestésicos locais impedem o fluxo do impulso nervoso (ARAÚJO; DE PAULA; FRACETO, 2008).

O impedimento do impulso nervoso faz com que o cérebro não reconheça as informações contidas naquele impulso. Muitas pesquisas são realizadas para esclarecer as etapas de ação, dosagem correta e tempo de eliminação de anestésicos aplicados tanto na medicina humana quanto veterinária, definindo assim margens seguras para a aplicação destes compostos.

Segundo Keene et al. (1998), Stehly e Gingerich (1999) e Vera et al. (2010) um anestésico pode ser considerado ideal quando reúne algumas características como:

- atuação rápida (em torno de 3 minutos);
- curto tempo de recuperação (por volta de 5 minutos);
- facilidade na aplicação;
- baixo risco para os animais e para o ser humano;
- dosagens utilizadas e contidas em uma larga margem de segurança;
- não deve deixar efeitos persistentes na fisiologia dos peixes e em seu comportamento quando utilizado de forma contínua;
- deve ser rapidamente metabolizado ou excretado, minimizando ou eliminando resíduos do organismo;
- ação do sedativo deve ser passageira, não deve persistir no metabolismo dos peixes.

2.4.1 Benzocaína e tricafina

A benzocaína (4-aminobenzoato de etila; $165,19 \text{ g mol}^{-1}$) e a tricafina (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222; $261,29 \text{ g mol}^{-1}$) são ésteres derivados do ácido p-aminobenzóico.

O caráter apolar (lipofílico) dos ésteres aminobenzoato de etila podem provocar acúmulo nos tecidos dos peixes destinados ao consumo humano. A

benzocaína é um AL insolúvel o que motivou a síntese de derivados do ácido p-aminobenzóico como a tricaína (Figura 5).

Enquanto a BZ é largamente utilizada no mundo como AL na medicina veterinária e humana (STEHLY et al., 2000), a TR é aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA para uso na aquicultura, porém, apenas em peixes das famílias: Ictaluridae, Salmonidae, Esocidae e Percidae (FDA, 2011).

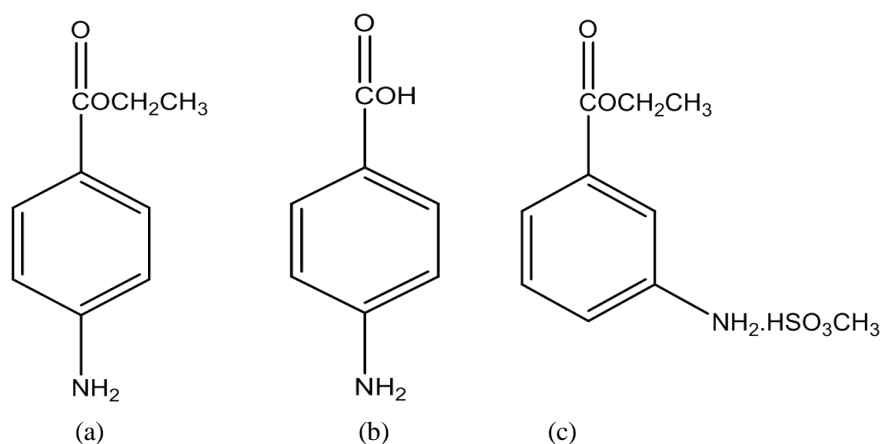


Figura 5 Estrutura química da benzocaína (a), ácido p-aminobenzóico (b) e tricaína (c)

Embora tenha sido aprovada pela FDA (FDA, 2012) em 21 de novembro de 1997, estudos realizados por Davis et al. (2008) comprovaram a toxicidade da tricaína quando aplicada em baixa alcalinidade, provocando danos na pele e córneas dos peixes, sendo necessária a utilização de um tampão.

Esses resultados são condizentes aos obtidos por Ohr (1976), Bernstein, Digre e Creel (1997) e Velisek et al. (2011). No entanto, em um trabalho realizado por Barreto et al. (2007) foi verificado que a tricaína não provoca danos primários ao DNA, tornando o anestésico seguro do ponto de vista genotóxico.

A benzocaína é de fácil acesso e baixo custo, e também satisfaz a maioria das características desejadas em um agente químico ideal (FAÇANHA; GOMES, 2005). Possui resposta de ação para a maioria das espécies e possui uma ampla margem de segurança, tanto para os peixes quanto para os humanos durante sua aplicação (BURKA et al., 1997).

Devido a sua insolubilidade, a benzocaína apresenta um acúmulo maior em peixes de água fria quando comparado com peixes tropicais, pois apresentam um metabolismo menos acelerado e uma proporção maior de gordura (WALSH; PEASE, 2002).

As propriedades químicas da benzocaína e tricaína, bem como as características dos peixes e o clima onde são criados, tornam necessários a definição de parâmetros como tempo de recuperação e eliminação desses agentes químicos pelo organismo do animal tratado.

2.4.2 Óleo de cravo

O óleo de cravo (OC), também presente no louro e canela, é extraído principalmente dos botões das flores, hastes, folhas e brotos da árvore cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) uma espécie de árvore da família Myrtaceae, de origem asiática (CHAIEB et al., 2007; PALIC et al., 2006; SOTO; BURHANUDDIN, 1995).

Comercialmente é obtido pela extração do botão floral maduro, o qual passa primeiramente por um processo de secagem (Figura 6) (OLIVEIRA; OLIVEIRA; SACRAMENTO, 2007).



Figura 6 Botão maduro de cravo-da-índia (a) e cravo-da-índia comercial (b)

Constitui uma mistura de compostos, tendo como seu composto majoritário (78-95%) o eugenol (2-metóxi-4-(2-propenil) fenol; $164,20 \text{ g mol}^{-1}$). Além de outros constituintes, apresenta um isômero, isoeugenol (2-metóxi-4-propenilfenol; $164,20 \text{ g mol}^{-1}$) e em menor quantidade metileugenol (4-alil-1,2-dimetóxi-benzenol; $178,23 \text{ g mol}^{-1}$) (Figura 7) (MELTON, 2007).

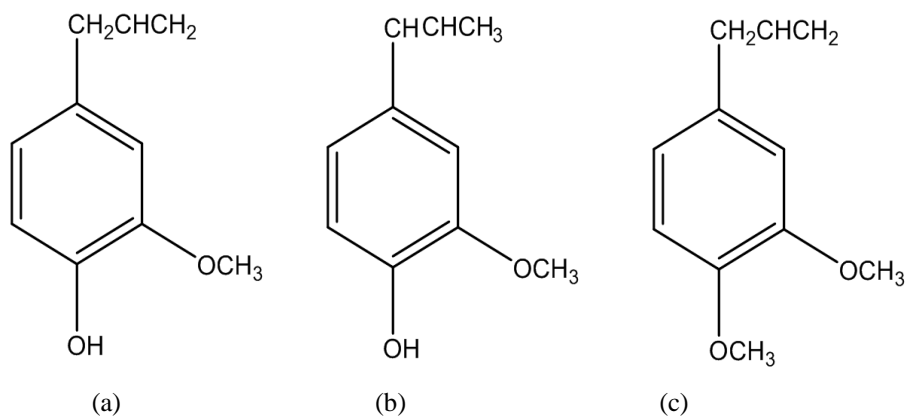


Figura 7 Estrutura química do eugenol (a), isoeugenol (b) e metileugenol (c)

A FDA classifica o óleo de cravo como “Generally Regarded As Safe”, ou seja, geralmente conhecido como seguro, desde que sua concentração nos alimentos não ultrapasse 1500 mg L^{-1} . No entanto, embora apresente parecer

seguro e limite para concentração em alimentos ainda não está listado como anestésico para peixes pela FDA, sendo permitido apenas a sua aplicação em estudos científicos (KILDEA; ALLAN; KEARNY, 2004).

O óleo de cravo pode ser classificado, nas doses utilizadas para peixes, como um anestésico seguro, de baixo custo, grande eficácia, ampla margem de segurança para o peixe e ausência de toxicidade para o operador (KEENE et al., 1998; PALIC et al., 2006).

Comercialmente é possível obter o eugenol 100%, e em alguns países já existem formulações comerciais contendo apenas isoeugenol (AQUI-S[®]) (FDA, 2011). A FAO recomenda limites para a ingestão diária de eugenol em 2,5 mg kg⁻¹ (mg por kg de peso humano) (FAO, 2013).

Devido à grande disponibilidade e baixo custo, o óleo de cravo tem se tornado objeto de estudo na aplicação como anestésico para peixes (SIMÕES et al., 2012). Além disso, o eugenol apresenta curto tempo de indução à anestesia, o que diminui o tempo de exposição ao anestésico, e alto tempo de recuperação anestésica, ideais para procedimentos mais demorados, quando comparado com a triclaína (KENNE et al., 1998).

2.5 Estudo da farmacocinética dos anestésicos

A farmacocinética dos anestésicos no metabolismo dos animais pode ser fortemente influenciada por diversos fatores, como temperatura da água, tamanho do animal, espécie, oxigênio disponível, estado fisiológico e gordura corporal (HANAWA et al., 1998; WOODY; NELSON; RAMSTAD, 2002).

A disponibilidade dos anestésicos muda conforme a região e no Brasil a obtenção de alguns anestésicos pode se tornar inviável, devido a sua produção escassa ou seu preço elevado. Não existem leis que regulamentam o uso de

anestésicos para peixes comerciais no Brasil. Desta forma, procura-se seguir as recomendações de países com regulamentos já definidos.

Países como os EUA, Canadá, Noruega e Reino Unido regulamentaram o uso de triclaína para algumas espécies de peixes e já possuem produtos comerciais. Nesses países, os peixes destinados ao consumo humano que tenham sido anestesiados com triclaína, necessitam passar por um período de depuração de 21 dias antes de serem liberados para o consumo. A benzocaína possui regulamentação idêntica a triclaína na Noruega (CARTER; WOODLEY; BROWN, 2011; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Coreia do Sul, Nova Zelândia, Austrália, Costa Rica e Chile já possuem regulamentação quanto ao uso de anestésicos contendo o princípio ativo isoeugenol (AQUI-S[®]). No entanto, nesses países não é necessário período de depuração desde que sejam respeitados os parâmetros indicados pelos fabricantes (TUCKEY; FORGAN, 2012; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

O tempo gasto para que o peixe anestesiado se livre dos resíduos de anestésico depende de fatores como temperatura, espécie, teor de gordura entre outros (BURKA et al., 1997). Além disso, existem mais de 30.000 espécies de peixes conhecidas, que possuem habitats diversificados e assim estão expostas a propriedades específicas tais como: salinidade, temperatura, profundidade e composição química da água (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Por esse motivo é necessário desenvolver estudos que possibilitem a regulamentação dos anestésicos no Brasil e determinem a eficiência, concentração, farmacocinética e parâmetros de indução à anestesia destes compostos, além de avaliar sua persistência e o tempo de depuração nos tecidos dos peixes, definindo margens seguras para seu consumo pós-manejo.

2.6 Análise Residual

Existem diversos estudos que envolvem a farmacocinética e farmacodinâmica dos anestésicos. Em muitos deles são avaliados desde os parâmetros de aplicação dos anestésicos, em função da temperatura, tempo de anestesia e recuperação, dosagem, período do dia, tamanho do peixe e, devido a diferenças de metabolismo espécies de peixes variadas.

Além disso, outro estudo importante é a depuração e eliminação do anestésico pelo organismo do peixe. Nesses estudos são quantificados resíduos de anestésicos em filés de peixes por meio de procedimentos (preparo das amostras de peixes anestesiados para que possam ser quantificados resíduos de anestésicos) nos quais se busca maior rendimento de recuperação dos analitos de interesse.

Os estudos sobre parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos são realizados desde a década de 60 (OHR, 1976). No entanto, foi a partir da década de 90 que se iniciaram estudos com o intuito de definir tempo de meia vida de anestésicos no organismo dos peixes, por meio de análises de plasma, tecidos e vísceras (HAYTON et al., 1996).

Trabalhos como o de Stehly, Meinertz e Gingerich (1998; 2000), Stehly et al. (1995) e Meinertz et al. (1999) visaram incluir para lista de fármacos da FDA, a benzocaína como potencial anestésico para peixes, nos quais ela apresentava tempo de eliminação de 12 horas.

Kildea, Allan e Kearny (2004) avaliaram o acúmulo e a depuração dos anestésicos óleo de cravo e AQUI-S[®] (isoeugenol) em filé comestível de “silver perch” (*Bidyanys Bidyanus*). Este trabalho foi realizado na Austrália, onde apenas o AQUI-S[®] havia sido liberado. A extração dos anestésicos foi realizada em um sistema Soxhlet e célula de extração celulose por 8 horas. Em seguida as amostras concentradas por meio de destilação e quantificadas em GC/MS

utilizando uma coluna capilar de HP-35 (29 m x 0,25 mm i.d.; 0,25 μm), gás de arraste He e padrão interno 2,4,6-trimetilpiridina. Os peixes “silver perch” apresentaram capacidade de depuração em sua carne à temperatura mais alta, atingindo concentrações de anestésicos em um patamar abaixo do limite de quantificação de 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ após 48 h de recuperação.

O isoeugenol também foi alvo de pesquisa de Meinertz et al. (2006). Neste trabalho os autores comparam a aplicação do óleo de cravo natural e o AQUI-S[®] em diferentes temperaturas, duração e concentração de anestésico aplicado aos peixes utilizando a técnica de HPLC. As análises foram realizadas utilizando uma coluna C18 (250 x 4,6 mm i.d.; 4 μm) (Phenomenex Sinergy Max-RP) temperatura de 50 °C, fase móvel acetonitrila:água (50:50 v/v) com vazão de 1,5 mL min^{-1} , o detector UV-Vis em 261 nm. As amostras foram trituradas homogeneizadas utilizando gelo seco e submetidas a 4 extrações seguidas com acetonitrila em agitador *wrist-action*. Em seguida os extratos foram agrupados e concentrados por destilação até que seu volume tenha reduzido até 5 mL. Antes de ser analisado por HPLC foi adicionado água e o isoeugenol foi isolado via extração em fase sólida. O procedimento de amostragem obteve uma média de recuperação de 97,1% do anestésico nas amostras de peixe e limites de detecção e quantificação de 0,03 e 0,09 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Com o intuito de caracterizar o perfil dos resíduos totais de isoeugenol, Meinertz e Schreier (2009) avaliaram a depuração de trutas expostas ao isoeugenol com marcadores radioativo ¹⁴C. Os analitos foram quantificados via detector de UV-Vis e logo em seguida sua atividade radioativa foi monitorada por 20 minutos ou até que sua radioatividade tenha atingido patamares abaixo de 2%. As condições cromatográficas e o preparo da amostra foram os mesmos propostos por Meinertz et al. (2006). Neste método a recuperação dos analitos

girou em torno de 88-92,5% com limites de detecção de $0,007 \mu\text{g g}^{-1}$ e quantificação de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$.

Os anestésicos isoeugenol, benzocaína e tricaína foram analisados por Kiessling et al. (2009) em amostras de salmão. A partir da construção de um modelo matemático foi possível avaliar o tempo de meia vida dos anestésicos no corpo do peixe e propor taxas de eliminação de 8 minutos destes compostos no organismo do peixe, que variaram em função da solubilidade do anestésico. As condições cromatográficas para análise do isoeugenol são as mesmas descritas por Meinertz et al. (2006; 2009), com exceção da fase móvel isocrática que utiliza metanol. Para a benzocaína e tricaína, o método de análise foi realizado de acordo com Stehly et al. (2000).

Meinertz et al. (1999) e Stehly, Meinertz e Gingerich (1998; 2000) desenvolveram métodos para determinar benzocaína e N-acetilbenzocaína no tecido de filé de truta. O método envolve a homogeneização da amostra em filé com carbonato de sódio e sulfato de sódio, os quais são macerados até a formação de um pó homogêneo. A extração dos analitos foi realizada com acetonitrila em uma coluna de vidro. Os extratos foram concentrados por meio de destilação em rotoevaporador e hexano foi adicionado para remover gorduras e extrair os analitos para a fase orgânica. Em seguida adicionou-se água e realizou-se o processo de pré-concentração utilizando a técnica de extração em fase sólida. As concentrações dos analitos foram determinadas utilizando sistemas e configurações cromatográficas similares às condições já descritas. A recuperação dos analitos durante o processo de amostragem foi de 95-98% e os limites de detecção e quantificação foram de $0,006$ e $0,022 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente.

Scherpenisse e Bergwerff (2007) determinaram resíduos de tricaína em peixe usando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (LC/MS). Os resíduos foram extraídos utilizando ultrassom e uma mistura de

solução tampão/metanol. Uma alíquota da amostra foi fortificada com padrão interno (benzocaína) e após 15 min colocada em 5 mL de solução tampão:metanol (50:50 v/v) e levada a um agitador. Após ser centrifugado, o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador e ao precipitado novamente adicionado solução tampão repetindo o processo. Após essas duas extrações os dois sobrenadantes foram misturados a 15 mL de solução tampão, filtrados e submetidos à extração em fase sólida. Após a extração a amostra foi fortificada com benzocaína e analisada em um sistema HPLC. As condições cromatográficas foram: coluna Phenomenex Luna C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel metanol:água:ácido acético (65:35:1 v/v/v) e fluxo de 0,6 mL min⁻¹. As recuperações de tricaína foram de 68% para a tilápia, 95% para o salmão e 92% para a truta. Os limites de detecção calculados foram de 0,5, 0,6 e 0,6 µg kg⁻¹ em truta, salmão e tilápia, respectivamente. Não foram encontrados os anestésicos nos peixes analisados.

3 CONCLUSÃO

A segurança alimentar do pescado produzido no Brasil necessita ser introduzida no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Este plano contempla leis e regulamentações quanto a resíduos de agentes químicos utilizados no processamento de vários alimentos. Em pescado já contemplam contaminantes inorgânicos, antimicrobianos, pesticidas, organoclorados, bifenilospoliclorados (PCB's) e corantes. Assim, quanto ao uso de anestésicos é necessário desenvolver estudos nas espécies de peixes de maior produção e diversidade produzidos na aquicultura submetidos a compostos anestésicos durante seu manejo.

O uso de anestésicos na aquicultura é importante, uma vez que reduz o stress do animal associado ao seu manejo, transporte e produção. No entanto, é preciso definir margens seguras, desde o procedimento de aplicação destes compostos até o período de depuração dos animais pós-manejo, garantindo assim que os animais metabolizem os agentes químicos aplicados.

A análise residual de compostos anestésicos em peixes, principalmente na tilápia e cachadã, peixes de maior produtividade e potencial na piscicultura, é uma ferramenta importante para a definição de protocolos que envolvam desde os parâmetros de aplicação de anestésicos em peixes até o período de depuração antes do abate e processamento do pescado, melhorando a qualidade do produto final.

REFERÊNCIAS

- ACERETE, L.; BALASCH, J. C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1/4, p. 167-178, Aug. 2004.
- ARAÚJO, D. R.; DE PAULA, E.; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1775-1783, Aug 2008.
- BARRETO, R. E.; GONTIJO, A. M. M. C.; ALVES-DELIMA, R.O.; RAYMUNDI, V. C.; PINHAL, D.; REYES, V. A.V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. MS222 does not induce primary DNA damage in fish. **Aquaculture International**, London, v. 15, n. 1/2, p. 163-168, Sep 2007.
- BERNSTEIN, P. S.; DIGRE, K. B.; CREEL, D. J. Retinal toxicity associated with occupational exposure to the Fish anaesthetic MS-222. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 124, n. 3, p. 843-844, Mar 1997.
- BIGNOTTO, T. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; MANIGLIA, T. C.; BONI, T. A.; LUCIO, L. C.; GOMES, V. N.; PRIOLI, R. A.; OLIVEIRA, A. V.; JÚLIO-JUNIOR, H. F.; PRIOLI, L. M. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 681-689, June 2009.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, S.; KEVE, S. **Peixes do pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 184 p.
- BURKA, J. F.; HAMMELL, K. L.; HORSBERG, T. E.; JOHNSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARE, D. J. Drugs in salmonid aquaculture--a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 333-49, May 1997.
- CAMPOS, J. L. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829) e outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: BALDISSEROTTO, B. e DE CARVALHO GOMES, L. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**: UFSM, 2010. cap. 12, p. 335-361. ISBN 9788573910643.

CARTER, K. M.; WOODLEY, C. M.; BROWN, R. S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 21, n. 1, p. 51-59, Aug 2011.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p.

CCAC; Canadian Council on Animal Care. **Additional information related to the CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing**. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>. Acesso em: 20 de agosto de 2011.

CHAIIB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, London, v. 506, n. 6, p. 501-506, Dec, 2007.

CHO, G. K.; HEATH, D. D.; Comparison of tricaine methanesulfonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 537-546, Feb 2000.

DAVIS, M. W.; STEPHENSON, J.; NOGA, E. J.; CAROLINA, N.; STREET, H. The Effect of Tricaine on Use of the Fluorescein Test for Detecting Skin and Corneal Ulcers in Fish. **Journal of Aquatic Animal**, Bethesda, v. 20, n. 2, p. 86-95, Aug. 2008.

FAÇANHA M. F.; GOMES L. C.; A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 71-75, Feb 2005.

FAO, Food and Agriculture Organization of United Nations. **Food safety and quality**. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/empres-food-safety/en/>>. Acesso em: 16 de fev. 2013.

FARIA, P.; LUZ, R.; PRADO, S.; JORGE, T.; LANA, A.; TEIXEIRA, E. A. Produção do híbrido “cachadia” em diferentes densidades de estocagem em sistema de recirculação de água. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 5, p. 1208-1214, Oct 2011.

FDA: U.S. Food and Drug Administration. **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. 4th Edition – APRIL 2011**. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/UCM251970.pdf>. Acesso em: 25 Jan. 2012.

FDA: U.S. Food and Drug Administration. **ANADA 200-226 Tricaine-S - original approval – May 2012**. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProductA/FOIADrugSummaries/ucm132992.htm>. Acesso em: 21 Ago. 2012.

FRISCH, A. J.; ANDERSON, T. A. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. **Fish physiology and biochemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 23-34, July 2000.

HANAWA, M.; HARRIS, L.; GRAHAM, M.; FARRELL, A. P.; BENDELL-YOUNG, L. I. Effects of cyanide exposure on *Dascyllus aruanus*, a tropical marine fish species: lethality, anaesthesia and physiological effects. **Aquarium Sciences and Conservation**, v. 2, n. 4, p. 21-34, Nov 1998.

HAYTON, W.; SZOKE, A.; KEMMENOE, B.; VICK, A. Disposition of benzocaine in channel catfish. **Aquatic toxicology**, Amsterdam, v. 36, n. 1/2, p.90-113, Apr 1996.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 73-84, Feb 1995.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, n. 4, p. 1136–1142, Aug 2004.

HUANG, W. C.; HSIEH, Y. S.; CHEN, I. H.; WANG, C. H.; CHANG, H. W.; YANG, C. C.; KU, T. H.; YEH, S. R.; CHUANG, Y. Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. **Zebrafish**, v. 7, n. 3, p. 297-304, Mar 2010.

KEENE, J. I.; NOAKES, D. I. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 89-101, Feb. 1998.

KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated atlantic salmon

(*Salmosalar*) following bath administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 286, n. 3/4, p. 301-308, Jan. 2009.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1/2, p. 265–277, June 2004.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal – Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009. 441 p.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Qualidade dos Alimentos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos>>. Acesso em: 16 de fev. 2013a.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produto Final**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produto-final>>. Acesso em: 16 de fev. 2013b.

MASSONE, F. Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas: texto e atlas colorido. 5. ed. ampl. e atual. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, xx, 2008. 571 p.

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**, Amsterdam, v. 855, n. 1/2, p. 255–260, May 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**, Amsterdam, v. 254, n. 1-4, p. 347-354, Feb 2006.

MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-S™ exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 296, n. 3-4, p. 200-206, Apr 2009.

MELTON, S. Guidance for Industry Concerns Related to the use of Clove Oil as an Anesthetic for Fish. **Food and Drug Administration**, p. 1-3, 2007.

METTAM, J. J.; OULTON, L. J.; MCCROHAN, C. R.; SNEDDON, L. U. The efficacy of three types of analgesic drugs in reducing pain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 133, n. 3-4, p. 265-274, July 2011.

MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>>. Acesso em: 17 de dez. 2012.

MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Acordo de Cooperação Técnica MPA-MAPA 2012**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/monitoramento-e-controlempa/sanidade-pesqueira/acordo-de-cooperacao-tecnica-mpa-mapa>>. Acesso em: 26 de dez. 2012.

MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Cartilha do Pescador e Aquicultor 2013**. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Outros/Cartilha_pescador_aqui\(final\)SEp.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Outros/Cartilha_pescador_aqui(final)SEp.pdf)>. Acesso em: 16 de fev. 2013.

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**, Amsterdam, v. 246, n. 1/4, p. 467-481, May 2005.

OHR, E. A. Tricaine methanesulphonate--I .Ph and its effects on anesthetic potency *. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 54C, n. 1, p. 1-5, Nov 1976.

OKAMURA, D. **Influência do amido de milho no metabolismo energético de surubim *Pseudoplatystoma spp.*** 2009. 83 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

OLIVEIRA, R. A. DE; OLIVEIRA, F. F. DE; SACRAMENTO, C. K. Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 8, n. 1, p. 46-48, Mar 2007.

PALIĆ, D.; HEROLT, D. M.; ANDREASEN, C. B.; MENZEL, B. W.; ROTH, J. A. Anesthetic efficacy of tricaine methane sulfonate, metomidate and eugenol:

Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephalespromelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 254, n. 1/2, p. 675–685, Aug 2006.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative Techniques for Aquatic Animals**. 3 ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 236 p.

RUANE, N. M.; CARBALLO, E.C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 10, p. 777-784, Aug. 2002.

SCHERPENISSE, P.; BERGWERFF, A. A. Determination of residues of tricaine in fish using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 586, n. 1/2, p. 407-410, Nov 2007.

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Aquicultura e pesca: tilápias**. Estudos de Mercado Sebrae/ESPM. Setembro, 2008 161p.

SIMÕES, L. N.; GOMIDE, A. T. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; GOMES, L. D. C. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 175-181, Apr-June 2012.

SNEDDON, L. U. Pain perception in fish: indicators and endpoints. **ILAR journal**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 338-42, Sep 2009.

SNEDDON, L. U. Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 32-43, Jan 2012.

SOTO, C. G.; BURHANUDDIN. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbit fish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 136, n. 1/2, p. 149-152, Feb 1995.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, Nov 2009.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. P.; GINGERICH, W. H.; MAZIK, P. M.; GAIKOWSKI, M. P. Effects of temperature on the loss of benzocaine and

acetylated benzocaine residues from edible tissues of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Final FDA Report. Contract 224-92-7036. Study CAP-94-00078-01**, 1995 15 p.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposures. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 121–127, Dec 1998.

STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Evaluation of aqua-s (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic/sedative. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 365-372, Apr 1999.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effects of temperature on the elimination of benzocaine and acetylated benzocaine residues from the edible fillet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 5, p. 387-392, Apr 2000.

SUN, Y. X.; ZHAO, H. Y.; SHAN, Q.; ZHU, S.; ZENG, D. P.; LIU, Z. C. Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single dose intramuscular or oral administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 309, n. 1-4, p. 82-85, Sep 2010.

TUCKEY, N. P. L.; FORGAN, L. G. A rapid and simple fluorometric method for quantifying isoeugenol in seawater and in plasma and white muscle from Australasian snapper (*Pagrus auratus*). **Food Chemistry**, London, v. 133, n. 4, p. 1664-1670, Feb 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Biblioteca da UFLA. **Manual de Normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos: TCC, monografias, dissertações e teses**. Lavras, 2010. Disponível em: <<http://www.biblioteca.ufla.br/site/index.php>> Acesso em: 29/01/2012.

VELISEK, J.; STARA, A.; LI, Z. H.; SILOVSKA, S.; TUREK, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 310, n. 3-4, p. 369-375, Jan 2011.

VERA, L. M.; ROS-SÁNCHEZ, G.; GARCÍA-MATEOS, G.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. MS-222 toxicity in juvenile sea bream correlates with diurnal activity, as measured by a novel video-tracking method. **Aquaculture**, v. 307, n. 1-2, p. 29-34, 2010.

WALSH, C.T.; PEASE, B.C.; The use of clove oil as an anaesthetic for the long finned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 627-635, Apr 2002.

WEBER, R. A.; PELETEIRO, J. B.; GARCÍA-MARTÍN, L.; ALDEGUNDE, M.. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 288, n. 2, p. 147–150, Mar 2009.

WEBER, R. A.; PÉREZ-MACEIRA, J. J.; PELETEIRO, J. B.; GARCÍA-MARTÍN, L.; ALDEGUNDE, M. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 321, n. 1-2, p. 108-112, Apr 2011.

WHO, World Health Organization. **Food Safety**. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/en/>>. Acesso em: 16 de fev. 2013.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K.; Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 5, p. 340-347, Dec 2002.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; HANSEN, M. K. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 295, n. 1-2, p. 52-59, Jan 2009.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish physiology and biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 201-18, May 2012.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO**Quantificação de óleo de cravo, benzocaína e tricaína residual em filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e cachadiah (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*)**

Robson Augusto Pereira^a, Adelir Aparecida Saczk^a, Priscila Vieira e Rosa^b, Daniel Okamura^b, Maria das Graças Cardoso^c, Leandro Santos Costa^b, Wilder Douglas Santiago^c, Rafael Machado Felix de Lima^a, Thallis Martins de Souza^a

a Laboratório de Analítica e Eletroanalítica

Departamento de Química - Bloco C3

Universidade Federal de Lavras - Campus Universitário

Caixa Postal 3037 37200-000 - Lavras - MG - Brasil

b Laboratório de Metabolismo de Peixes

Departamento de Zootecnia – Setor de Piscicultura

Universidade Federal de Lavras - Campus Universitário

Caixa Postal 3037 37200-000 - Lavras - MG - Brasil

c Laboratório de Análise e Qualidade de Aguardentes

Departamento de Química - Bloco C2

Universidade Federal de Lavras - Campus Universitário

Caixa Postal 3037 37200-000 - Lavras - MG - Brasil

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a quantificação residual dos anestésicos óleo de cravo (eugenol, isoeugenol e metileugenol), benzocaína e tricaína em filés de duas espécies de peixes tilápiado Nilo (*Oreochromis niloticus*) e cachadia (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*). Foram avaliadas anestésias em 5 concentrações, definidas a partir do tempo de indução para cada espécie e 4 tempos de depuração (0 h, 12 h, 24 h e 48 h) em 4 repetições. Diferentes metodologias foram testadas e selecionadas, de acordo com a melhor recuperação, a quantificação residual dos anestésicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). A variância das médias residuais entre anestésicos, concentrações e espécies de peixes foi comparada. Após a anestesia (0 h), as duas espécies, tilápia e cachadia, apresentaram resíduos de benzocaína de 1,46 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 2,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, tricaína 0,397 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 2,17 $\mu\text{g g}^{-1}$ e eugenol 0,514 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,987 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. Peixes que foram depurados por 12 h, 24 h e 48 h não apresentaram valores detectáveis, ou seja, abaixo dos limites de detecção e quantificação. A benzocaína foi o anestésico que apresentou maior concentração residual média para tilápia e cachadia ($P < 0,01$), enquanto a tricaína demonstrou menores quantidades residuais para tilápia e o eugenol para o cachadia, estes fatos estão associados à composição da carcaça de cada espécie. Entre as 5 concentrações aplicadas não houve diferença significativa ($P > 0,01$), com exceção da menor concentração de tricaína em tilápia, o que aumentou o tempo de indução, conseqüentemente o de permanência do peixe imerso em anestesia resultando em maior concentração residual. Por fim, os valores médios de resíduos em cachadia foram maiores que na tilápia. Assim, quanto à análise residual, a tricaína e o eugenol são os anestésicos mais indicados para tilápias e cachadia respectivamente.

Palavras-chave: Anestésicos. Análise residual. Filé de tilápia. Filé de cachadia.

1 INTRODUÇÃO

Na aquicultura operações de manejo e transporte, marcação de matrizes, aplicação de hormônios e vacinas imprimem intenso desgaste aos animais (FRISCH; ANDERSON, 2000; ROSS; ROSS, 2008) e neste contexto compostos anestésicos ou analgésicos têm sido empregados para tentar amenizar o efeito negativo destas práticas (ACERETE et al., 2004; METTAM et al., 2011; MYLONAS et al., 2005; RUANE; CARBALLO; KOMEN, 2002; SNEDDON, 2009).

Atualmente os anestésicos mais utilizados na aquicultura são: triclaína, benzocaína, óleo de cravo, ou formulações contendo seu ingrediente ativo, o isoeugenol, mentol, quinaldina e metomidato (CCAC, 2011; FDA, 2011; KIESSLING et al., 2009).

No Brasil, onde se destaca a produção de tilápia e peixes de “couro” como o pintado, cachara, jundiá e híbridos dessas espécies, estes anestésicos ainda não se encontram listados no Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (PNCRB) regulamenta o monitoramento em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, pescado, mel, ovos e avestruz.

A Instrução Normativa nº11 (IN11) de 22 de maio de 2012 definiu limites de contaminantes inorgânicos, antimicrobianos, pesticidas, organoclorados, bifenilospoliclorados (PCB's) e corantes em pescado, bem como parâmetros de validação de metodologias para análise de contaminantes, no entanto ainda são necessários estudos e pesquisas envolvendo o uso de anestésicos no manejo aquícola para que sejam definidos protocolos de aplicação e períodos de depuração de peixes submetidos à anestesia, definindo assim limites destes compostos, adicionando os anestésicos aos contaminantes em pescado.

Países como os EUA, Canadá, Noruega e Reino Unido regulamentaram o uso de tricaína para algumas espécies de peixes e já possuem produtos comerciais (Tricaine-S, Finquel[®], MS-222). Nesses países, os peixes destinados ao consumo humano que tenham sido anestesiados com tricaína, necessitam passar por um período de depuração de 21 dias antes de serem liberados para o consumo. A benzocaína possui regulamentação idêntica a tricaína na Noruega (CARTER; WOODLEY; BROWN, 2011; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Coreia do Sul, Nova Zelândia, Austrália, Costa Rica e Chile já possuem regulamentação quanto ao uso de anestésicos contendo o princípio ativo isoeugenol (AQUI-S[®]). No entanto, nesses países não é necessário período de depuração desde que sejam respeitados os parâmetros indicados pelos fabricantes (TUCKEY; FORGAN, 2012; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

O tempo gasto para que o peixe anestesiado se livre dos resíduos de anestésico depende de fatores como temperatura, espécie, teor de gordura entre outros (BURKA et al., 1997). Além disso, existem mais de 30.000 espécies de peixes conhecidas que vivem em habitats diversificados e assim estão expostas a propriedades específicas tais como: salinidade, temperatura, profundidade e composição química da água (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

A quantificação residual de compostos anestésicos em filés de peixe iniciou-se na década de 90 (BURKA et al., 1997; HAYTON et al., 1996; STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 1995; STEHLY et al., 1998; 2000; SZOKE; HAYTON; SCHULTZ, 1997), por meio de técnicas de homogeneização, extração e quantificação de amostras de filé de peixes via HPLC (MEINERTZ et al., 1999; 2006; MEINERTZ; SCHREIER, 2009).

O preparo da amostra geralmente demanda 75% do tempo de uma análise e consiste em um importante passo para o desenvolvimento de métodos

analíticos, em cromatografia líquida e gasosa, que consigam isolar os analitos de interesse melhorando a seletividade, detectabilidade, confiabilidade, precisão e repetibilidade das análises. A complexidade da matriz envolvida na análise residual de anestésicos em peixes torna necessária a combinação de procedimentos de extração com procedimentos de purificação e pré-concentração como a extração em fase sólida (*SPE- Solid-Phase Extraction*) que, juntamente com a extração líquido-líquido são as mais importantes na determinação de anestésicos em amostras biológicas (BANICERU; MANDA; POPESCU, 2011).

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho determinar os anestésicos residuais benzocaína, tricaína e óleo de cravo em duas espécies de peixes, em filés de duas espécies de peixes tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e cachadia (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*), submetidas à anestesia em diferentes concentrações e tempos de depuração, utilizando metodologias para extração e quantificação via HPLC-DAD.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os solventes metanol e acetonitrila grau HPLC foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os padrões de isoeugenol 98% (2-metóxi-4-propenilfenol), metileugenol 99% (4-alil-1,2-dimetóxi-benzenol), benzocaína $\geq 99\%$ (4-aminobenzoato de etila) e tricaína 98% (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e eugenol PESTANAL[®] (2-metóxi-4-(2-propenilfenol)) proveniente da Fluka. Ácido acético grau ACS $\geq 99,7\%$, ácido cítrico monoidratado $\geq 99,5\%$, fosfato dissódico dibásico diidratado \geq

98,5% obtidos da Sigma-Aldrich. Água tipo 1 (resistência > 18,2M Ω) obtida de um sistema de purificação Sinergy® Milli-Q (Millipore).

2.2 Amostras

Para a análise residual dos anestésicos óleo de cravo (OC), benzocaína (BZ) e tricaína (TR) foram utilizados tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie mais produzida na aquicultura brasileira, e o cachadã (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*), híbrido de cachara e jundiá, espécie que não apresenta escamas pelo corpo, apenas pele espessa popularmente chamados peixes de couro. Os peixes foram fornecidos pelo Laboratório de Metabolismo de Peixes, Departamento de Zootecnia - Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras, responsável pelo procedimento de anestesia aos peixes.

As 5 concentrações dos anestésicos (Tabela 1) foram aplicadas em 4 grupos compostos de 4 peixes em cada uma das espécies. Cada grupo foi coletado após um período (0, 12, 24 e 48 h) de depuração após a anestesia, os peixes foram abatidos e os filés congelados (-20 °C) até o procedimento de preparo da amostra.

Tabela 1 Concentrações (mg L⁻¹) dos anestésicos utilizados nos peixes

Concentrações	Tilápia			Cachadã		
	OC	BZ	TR	OC	BZ	TR
[1]	70	60	140	30	60	90
[2]	100	100	170	60	110	110
[3]	130	140	200	90	160	130
[4]	160	180	230	120	210	150
[5]	190	220	260	150	260	170

OC: óleo de cravo BZ: benzocaína TR: tricaína

2.3 Extração

Os filés de cada amostra analisada foram descongelados e macerados para a completa homogeneização.

Para a BZ e TR foi utilizado um método adaptado de Scherpenisse e Bergwerff (2007). 5 g do filé foram colocados em um recipiente (200 mL) e com o auxílio de um agitador mecânico (Quimis - 2501) equipado com pás (4 cm diâmetro) utilizando 5 mL de solução extratora (50:50 v/v metanol:tampão McIlvaine pH 4,4 preparado utilizando 11,823 g de ácido cítrico monoidratado e 16,4312 g de fosfato dissódico dibásico diidratado em 1 litro de água tipo 1) foram agitados por 10 minutos, em seguida centrifugados a 3.400 rpm por 5 min.

O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi submetido novamente ao processo descrito anteriormente por mais 3 vezes, a pá e o recipiente de vidro foram lavados com 5 mL de solução extratora. As alíquotas foram agrupadas e submetidas à rotoevaporação a 50 °C (-600 mmHg) até metade do volume (~12,5 mL). O volume das amostras foi ajustado a 25 mL com água tipo 1 e em seguida realizou-se o procedimento de extração em fase sólida.

Para a extração das amostras contendo OC foi realizado um procedimento adaptado de Meinertz et al. (2006; 2009). 5 g de filés macerados foram colocados em tubos de ensaio de plástico (50 mL) com fundo cônico e tampa rosqueado e acrescentado 5 mL de acetonitrila. Em seguida foram agitados em um Vortex Mixer (Vixar[®]) por 5 minutos e o extrato foi centrifugado a 3.400 rpm por 5 min.

O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi submetido a 3 extrações sucessivas conforme descrito inicialmente. As alíquotas de 5 mL foram agrupadas e rotoevaporadas a 50 °C (-600 mmHg) até metade do volume

(~10 mL). O volume das amostras foi ajustado a 25 mL com água tipo 1 e em seguida foi realizado o procedimento de extração em fase sólida.

2.3.1 Extração em fase sólida

O procedimento de extração em fase sólida foi realizado em Manifold Vac Elut 12 (Agilent®) acoplado a uma bomba a vácuo (Primatec) utilizando cartuchos SPE Discovery® DSC-18 (3 mL; 500 mg). Os cartuchos foram previamente condicionados com 6 mL de metanol para as amostras de OC e com 3 mL de metanol seguidos de 3 mL de tampão McIlvaine para amostras contendo BZ e TR.

Após o condicionamento as amostras foram submetidas à extração sob um fluxo de 2 gotas por segundo. Os analitos foram eluídos dos cartuchos adicionando 1 mL de ácido acético (1%) seguido de 1 mL de metanol. As alíquotas (2,5 mL) foram filtradas em membrana PTFE (13 mm d; 0,45 µm; Millex, Millipore).

2.4 Análises cromatográficas

Alíquotas de 20 µL foram injetadas com o auxílio de um injetor automático com autoamostrador (SIL-10AF) em um sistema HPLC (Shimadzu) e interface CBM-20A, equipado com duas bombas de alta pressão (LC-6AD) em um fluxo 0,8 mL min⁻¹ de metanol:ácido acético 1% (60:40 v/v). O detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A) foi configurado na faixa de 200-700 nm. As separações foram realizadas em coluna Ascentis® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm, Supelco), pré-coluna Ascentis® C18 Supelguard™ C18 (25 x 4,6 mm; 5 µm). O sistema HPLC-DAD foi controlado usando software ChemStation.

2.5 Seletividade e linearidade

A seletividade do método foi avaliada por meio da análise de uma amostra isenta dos analitos de interesse e fortificada com os padrões (0,13 mg L⁻¹) (RIBANI et al., 2004).

Os comprimentos de onda selecionados para a análise foram: BZ 280 nm, TR 315 nm, isoeugenol (ISO) 261 nm e eugenol (EUG) e metileugenol (MET) em 275 nm. A curva analítica foi preparada a partir de diluições da solução estoque (1 g L⁻¹) em metanol.

2.6 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos compostos foram obtidos a partir dos parâmetros da curva analítica e das equações (1) e (2). O software MicrocalOrigin 7.0[®] foi utilizado para estimar os parâmetros da curva analítica.

$$LD = 3,3 \times (s/S) \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times (s/S) \quad (2)$$

onde, s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

2.7 Exatidão e recuperação

A exatidão do método foi determinada por meio de testes de recuperação nos quais amostras aleatórias dos analitos foram fortificadas com 3

concentrações diferentes dos compostos (10, 100 e 500 μL de padrão $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). A recuperação (R) foi calculada de acordo com a equação (3):

$$R (\%) = (\text{resposta obtida}) / (\text{resposta esperada}) * 100 \quad (3)$$

2.8 Análise estatística

As médias residuais obtidas nas repetições de cada tratamento foram submetidas à análise de variância com auxílio do software SISVAR versão 5.1 (Build 72).

As diferenças significativas das análises de variância das concentrações médias residuais entre os 3 anestésicos, as 5 concentrações aplicadas e as 2 espécies de peixes foram avaliadas pelo teste de Student-Newman-Keuls SNK (Student-Newman-Keuls) com 1% de probabilidade ($P < 0,01$) (FERREIRA, 2011; SPIEGEL, 1993).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a quantificação residual dos anestésicos em filés de peixes, foram avaliadas diferentes metodologias para a extração e purificação dos compostos, quanto à recuperação dos analitos.

As metodologias propostas por Scherpenisse e Bergwerff (2007) e Meinertz et al. (2006; 2009) envolvem a homogeneização dos filés utilizando um moedor e gelo seco, respectivamente. Neste trabalho foram adaptadas estas metodologias realizando a homogeneização da amostra por maceração, a qual resultou em uma diminuição do custo com reagentes e equipamentos, além do tempo gasto por análise, totalizando 30 amostras por dia frente às 17 realizadas por Meinertz et al. (1999).

Segundo Baniceru, Manda e Popescu (2011) o procedimento de preparo da amostra demanda 75% do tempo total da análise, tornando a maceração viável em uma rotina de análises.

Outras metodologias como as de Kildea, Allan e Kearny (2004) e Meinertz et al. (1999) foram avaliadas, no entanto estes procedimentos apresentaram baixas recuperações dos compostos estudados.

As soluções extratoras (metanol:tampão McIlvaine 50:50 v/v e acetonitrila) foram avaliadas para todos os anestésicos nas duas metodologias adaptadas, sendo que para a BZ e TR a solução contendo tampão foi mais eficiente, assim como para o OC a acetonitrila. Por esse motivo foi aplicada nas amostras que continham BZ e TR a metodologia adaptada de Scherpenisse e para as amostras contendo OC a metodologia adaptada de Meinertz.

O procedimento de extração em fase sólida (SPE) foi otimizado para as condições e volume dos extratos. A adição da água aos extratos evaporados favoreceu a retenção dos analitos nos cartuchos, já a solução tampão McIlvaine (pH 4,4) adicionada durante o condicionamento contribuiu para a extração dos analitos BZ e TR.

A Figura 1 apresenta o cromatograma da seletividade do método proposto para quantificação residual dos anestésicos BZ, TR e OC em peixes. Para a análise de OC foram injetados padrões de eugenol (EUG), isoeugenol (ISO) e metileugenol (MET).

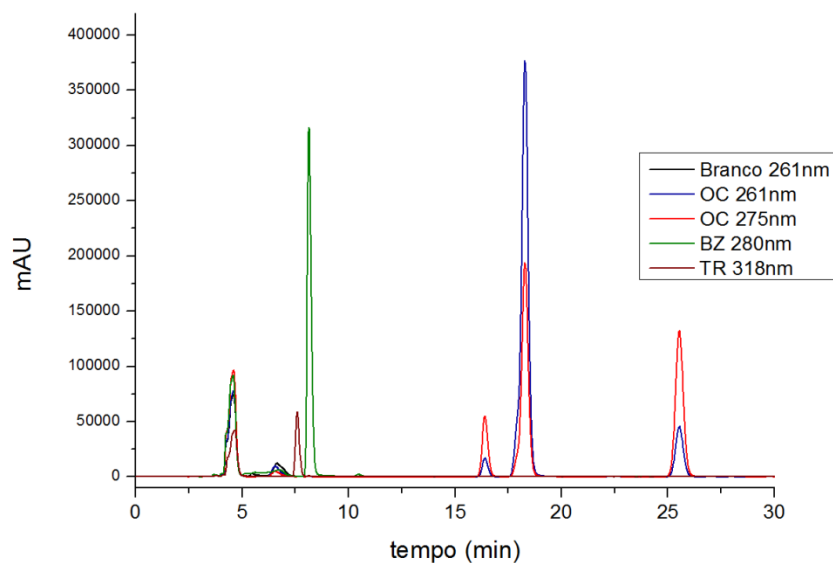


Figura 1 Cromatograma de uma amostra peixe isenta dos compostos (0) e fortificada com solução padrão $0,13 \text{ mg L}^{-1}$ de: 1 - tricaína ($t_R=7,53 \text{ min}$), 2 - benzocaína ($t_R=8,12 \text{ min}$), 3 - eugenol ($t_R=16,34 \text{ min}$), 4 - isoeugenol ($t_R=18,22 \text{ min}$), 5 - metileugenol ($t_R=25,55 \text{ min}$)

O OC possui dois cromatogramas, pois seus constituintes absorvem em comprimentos de onda diferentes. A diferença entre os tempos de retenção favoreceu a separação dos compostos, sem a necessidade de uma fase móvel com gradiente. A TR e seu isômero BZ demonstraram boa separação mesmo em uma fase móvel isocrática, devido à diferença de solubilidade entre os dois compostos.

A combinação de diferentes anestésicos e analgésicos tem sido encorajada ultimamente, como forma de diminuir efeitos tóxicos, e a

seletividade deste método permite sua aplicação em análises residuais nas quais foram empregadas combinações dos anestésicos estudados (METTAM et al., 2011; HUANG et al., 2010; ZAHL et al., 2009).

A curva analítica foi construída a partir da diluição de uma solução estoque (1 g L^{-1}) em metanol, e os parâmetros analíticos obtidos para o método proposto estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 Parâmetros analíticos para a quantificação dos anestésicos

Anestésicos	Linearidade mg L^{-1}	R	LD $\mu\text{g g}^{-1}$	LQ $\mu\text{g g}^{-1}$	Rec. (%)	
					C	T
BZ	0,013-13,21	0,99997	0,06	0,1819	94,02	90,66
TR	0,013-13,21	0,99998	0,0446	0,1352	95,58	92,91
ISO	0,013-0,33	0,99987	0,0146	0,0441	94,68	96,72
EUG	0,013-13,33	0,99999	0,0414	0,1255	90,84	92,86
MET	0,014-14,26	0,99987	0,1515	0,4590	85,61	83,46

BZ: benzocaína TR: tricaína ISO: isoeugenol EUG: eugenol MET: metileugenol
LD: limite de detecção LQ: limite de quantificação C: cachadia T: tilápia

A linearidade corresponde à faixa de concentração aplicada para a quantificação das amostras e o R indica o coeficiente de correlação linear. Os valores de R para o isoeugenol e metileugenol foram inferiores aos demais em função da absorvidade molar de cada um deles.

A recuperação das amostras foi de 94,02% e 90,66% para BZ e 95,58% e 92,91% para TR, em cachadia e tilápia respectivamente. A metodologia adaptada aplicada a esses compostos apresentou recuperação 23% maior do que o trabalho de Scherpenisse e Bergwerff (2007) e similar a recuperação encontrada por Meinertz et al. (1999; 2009).

Para o ISO a recuperação foi de 94,68% em cachadia e 96,72% em tilápia, valores próximos de Meinertz e Schreier (2009) (88,8-95,8%) para truta arco-íris.

Os valores de recuperação encontrados para a tilápia e cachadia foram próximos aos encontrados por Meinertz et al. (2006), porém neste trabalho é possível realizar uma análise residual em uma faixa mais baixa de concentração para esse analito, uma vez que os LD e LQ são inferiores aos de Meinertz.

Ao considerar a matriz e os compostos analisados, bem como a metodologia de extração e purificação empregada, a recuperação obteve um valor significativo dentro das margens esperadas pra esse tipo de procedimento (BANICERU; MANDA; POPESCU, 2011).

A quantificação dos anestésicos foi realizada comparando o tempo de retenção dos compostos na amostra fortificada com os valores obtidos nas amostras de peixes anestesiados. As concentrações residuais médias encontradas nos filés de cachadia e tilápia estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3 Valores obtidos a partir da análise residual dos peixes (em $\mu\text{g g}^{-1}$)

Tempo de depuração	Dosagem	TILÁPIA					CACHADIA				
		BZ	TR	ISO	EUG	MET	BZ	TR	ISO	EUG	MET
0 h	[1]	1,9979	0,9884a	ND	0,5512	ND	3,5107	2,9155	ND	1,2298	ND
	[2]	1,4102	0,1985b	<LQ	0,4310	ND	2,2712	1,6383	ND	0,7210	ND
	[3]	2,1334	0,2479b	ND	0,5194	ND	1,9682	2,7520	<LQ	0,8032	ND
	[4]	1,0179	0,2328b	ND	0,5121	ND	2,3067	1,7324	<LQ	1,4743	ND
	[5]	0,7425	0,3201b	ND	0,5543	ND	2,9486	1,8295	ND	0,7075	ND
	Média	1,4604A	0,3975B	-	0,5136B	-	2,6011A	2,173A	-	0,987B	-
	CV¹		46,84				24,85				
12 h	[1]	<LQ	ND	ND	ND	ND	0,2568	ND	ND	ND	ND
	[2]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	[3]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	[4]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	[5]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Média	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CV¹		-				-				

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,01$). <LQ = valores detectados mas abaixo do Limite de Quantificação

ND: amostra não apresentou valores detectáveis (<LD).

¹Coefficiente de variação da ANAVA (Análise de Variância)

Analisando a Tabela 3, o eugenol foi o único composto do OC quantificável em ambas as espécies de peixes, enquanto o isoeugenol foi detectado, porém não quantificado. Isto se deve a composição média do OC (~85% eugenol), fazendo com que outros constituintes em menor proporção não atinjam valores quantificáveis e detectáveis.

Após a anestesia (0 h) a média de resíduos das 5 concentrações de BZ totalizaram $1,46 \mu\text{g g}^{-1}$ na tilápia, apresentando valor superior e com diferença significativa ($P < 0,01$) frente ao eugenol ($0,514 \mu\text{g g}^{-1}$) e TR ($0,397 \mu\text{g g}^{-1}$). No cachadã $2,6 \mu\text{g g}^{-1}$ de BZ e $2,17 \mu\text{g g}^{-1}$ de TR não apresentaram diferença significativa entre si, porém foram superiores ao valor médio de $0,987 \mu\text{g g}^{-1}$ encontrado para o eugenol.

A BZ foi o anestésico que proporcionou maiores valores residuais logo após a anestesia, tanto para a tilápia quanto para o cachadã, provavelmente devido à rápida absorção pelo animal e baixa solubilidade em água (cerca de 250 vezes menor que a TR), justificando o fato de ser proibida pela FDA que libera o uso de seu isômero a TR (BURKA et al., 1997; FDA, 2012).

Comparando as médias residuais entre as 5 concentrações aplicadas dos anestésicos, não houve diferença significativa ($P > 0,01$) para a maioria dos tratamentos, com exceção da tilápia, onde a menor concentração de TR resultou em maior concentração residual. Este fato está associado ao tempo de exposição do peixe ao anestésico, uma vez que menores concentrações elevam o tempo necessário para que o peixe seja induzido à anestesia.

Ao contrário da maioria dos estudos envolvendo análise residual, os peixes avaliados neste trabalho permaneceram menos de 3 minutos imersos em banhos de anestésicos. As concentrações foram definidas para que o tempo necessário para indução à anestesia respeitasse os parâmetros de um anestésico ideal (KEENE et al., 1998; ROSS; ROSS, 2008; VERA et al., 2010).

Se compararmos os valores médios de resíduos entre as espécies, o cachadiah reteve maiores concentrações que a tilápia. Este fato está associado às características da espécie, os hábitos alimentares, o metabolismo dos peixes, a composição do filé, que dificultam a eliminação dos resíduos.

A depuração depois de 12 horas não apresentou valores quantificáveis pelo método proposto, com exceção da concentração [2] de eugenol em tilápia e [1] de BZ em cachadiah. Essas concentrações podem ter elevado a média residual em virtude do tempo de indução à anestesia ser maior, quando os peixes estão imersos em anestésicos de baixa concentração, aumentando o tempo de permanência do peixe em contato com o anestésico.

A partir de 24 horas de depuração, nenhum analito foi detectado nas amostras, período de depuração recomendado por Stehly, Meinertz e Gingerich (2000) para BZ em truta arco-íris, por exemplo.

Kildea, Allan e Kearny (2004) também não observaram níveis detectáveis de OC em “*silver perch*” após 48 h. Tuckey e Forgan (2012) observaram que resíduos de isoeugenol em dourada australiana passam de 22,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ imediatamente após o abate para 1,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ após 7 horas de depuração, o que indica uma possível depuração total a partir de 24 horas.

Guénette et al. (2007) mediu o tempo de meia vida de resíduos de OC (eugenol) em truta arco-íris obtendo 12,14 horas. No entanto, todos estes estudos foram realizados após 15 ou 30 minutos de exposição aos anestésicos, sem considerar os estágios de indução e recuperação em um procedimento de anestesia recomendado para um anestésico ideal: 3 minutos de indução e 5 minutos de recuperação (KEENE et al., 1998; ROSS; ROSS, 2008; VERA et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

O Brasil ainda não possui leis que regulamentam o tempo de depuração necessário para peixes que foram anestesiados na aquicultura. No entanto, é preciso cuidado ao utilizar parâmetros internacionais que não atendem as demandas específicas do mercado brasileiro. Por esse motivo é importante conhecer o tempo de depuração de peixes submetidos à anestesia padrão, podendo assim definir um protocolo operacional que garanta a segurança do Aquicultor e de seu pescado.

O método proposto neste trabalho indicou a BZ como o anestésico de maior valor médio residual para cachadã e tilápia. As concentrações aplicadas não apresentaram diferença significativa no valor residual, sendo a concentração [4] de BZ com menor valor médio residual para tilápia e [3] para o cachadã. Tanto a tilápia quanto o cachadã apresentaram menores valores residuais nas concentrações [2] de TR e OC. Assim, quanto à análise residual, a TR e OC (EUG) são os anestésicos mais indicados para tilápias e cachadã, respectivamente.

, a partir do qual não são detectados mais resíduos dos anestésicos. Considerando a aplicação destes anestésicos em peixes por um período menor ou igual a 3 minutos, valor consideravelmente menor frente aos demais trabalhos encontrados na literatura, e valores não detectáveis a partir de 12 horas, peixes submetidos a procedimentos de anestesia ideal precisam de um período de depuração de 24 horas aplicados nas condições descritas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de suporte financeiro à pesquisa.

Ao Laboratório de Nutrição de Peixes - DZO; pelo fornecimento das amostras e ao Laboratório de Análise e Qualidade de Aguardente – DQI; pelo suporte durante as análises.

REFERÊNCIAS

ACERETE, L.; BALASCH, J. C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1/4, p. 167-178, Aug. 2004.

BANICERU, M.; MANDA, C. V.; POPESCU, S. M. Chromatographic analysis of local anesthetics in biological samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 1-12, Sep 2011.

BURKA, J. F.; HAMMELL, K. L.; HORSBERG, T. E.; JOHNSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARE, D. J. Drugs in salmonid aquaculture--a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 333-49, May 1997.

CARTER, K. M.; WOODLEY, C. M.; BROWN, R. S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 21, n. 1, p. 51-59, jan 2011.

CCAC; Canadian Council on Animal Care. **Additional information related to the CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing**. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf> . Acesso em: 20 de agosto de 2011.

FDA: U.S. Food and Drug Administration. **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. 4th Edition – APRIL 2011**. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/UCM251970.pdf>. Acesso em: 25 Jan. 2013.

FDA: U.S. Food and Drug Administration. **ANADA 200-226 Tricaine-S - original approval – May 2012**. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProductA/FOIADrugSummaries/ucm132992.htm>. Acesso em: 21 Ago. 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Jul 2011.

FRISCH, A. J.; ANDERSON, T. A. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 23-34, July 2000.

GUÉNETTE, S. A.; UHLAND, F. C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 266, n. 1-4, p. 262-265, Aug 2007.

HAYTON, W.; SZOKE, A.; KEMMENOE, B.; VICK, A. Disposition of benzocaine in channel catfish. **Aquatic toxicology**, Amsterdam, v. 36, n. 1/2, p.90-113, Apr 1996.

HUANG, W. C.; HSIEH, Y. S.; CHEN, I. H.; WANG, C. H.; CHANG, H. W.; YANG, C. C.; KU, T. H.; YEH, S. R.; CHUANG, Y. Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. **Zebrafish**, v. 7, n. 3, p. 297-304, Mar 2010.

KEENE, J. I.; NOAKES, D. I. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 89-101, Feb. 1998.

KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 286, n. 3/4, p. 301-308, Jan. 2009.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1/2, p. 265-277, Jun 2004.

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**, Amsterdam, v. 855, n. 1/2, p. 255-260, May 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**, Amsterdam, v. 254, n. 1-4, p. 347-354, Feb 2006.

- MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-S™ exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 296, n. 3-4, p. 200-206, Apr 2009.
- METTAM, J. J.; OULTON, L. J.; MCCROHAN, C. R.; SNEDDON, L. U. The efficacy of three types of analgesic drugs in reducing pain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 133, n. 3-4, p. 265-274, July 2011.
- 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**, Amsterdam, v. 246, n. 1/4, p. 467-481, May 2005.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, June 2004.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative Techniques for Aquatic Animals**. 3 ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 236 p
- RUANE, N. M.; CARBALLO, E. C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 10, p. 777-784, Aug. 2002.
- SCHERPENISSE, P; BERGWERFF, A. A. Determination of residues of tricaine in fish using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 586, n. 1/2, p. 407-410, Nov 2007.
- SNEDDON, L. U. Pain perception in fish: indicators and endpoints. **ILAR journal**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 338-42, Sep 2009.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1997. p. 694-697.
- SPIEGEL, M. R. **Estatística**. 3. ed. São Paulo: Makron Booksdo Brasil, 1993. 643 p.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. P.; GINGERICH, W. H.; MAZIK, P. M.; GAIKOWSKI, M. P. Effects of temperature on the loss of benzocaine and acetylated benzocaine residues from edible tissues of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Final FDA Report. Contract 224-92-7036. Study CAP-94-00078-01**, 1995. 15 p.

STEHLY, G. R., MEINERTZ, J. R., GINGERICH, W. H. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposures. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 121–127, Dec 1998.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effects of temperature on the elimination of benzocaine and acetylated benzocaine residues from the edible fillet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 5, p. 387-392, Apr 2000.

SZOKE, 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**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 69-75, Oct 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9447553>>. .

TUCKEY, N. P. L.; FORGAN, L. G. A rapid and simple fluorometric method for quantifying isoeugenol in seawater and in plasma and white muscle from Australasian snapper (*Pagrus auratus*). **Food Chemistry**, London, v. 133, n. 4, p. 1664-1670, Sep 2012.

VERA, L. M.; ROS-SÁNCHEZ, G.; GARCÍA-MATEOS, G.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. MS-222 toxicity in juvenile sea bream correlates with diurnal activity, as measured by a novel video-tracking method. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 1-2, p. 29-34, 2010.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; HANSEN, M. K. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of bodyweight, temperature and stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 295, n. 1-2, p. 52-59, Jan 2009.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish physiology and biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 201-18, May 2012.

ANEXO

Análises de Variância e teste de Student-Newman-Keuls SNK (Student-Newman-Keuls):

ANESTÉSICOS

Arquivo analisado:

C:\Documents and Settings\XPMUser\Desktop\Estatística robson\dados tabulados\ANAVA ANESTESICOS.dbf

Variável analisada: TILAPIA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV Pr>Fc	GL	SQ	QM	Fc
ANESTES. 0.0002	2	13.597010	6.798505	10.110
erro	57	38.330453	0.672464	
Total corrigido	59	51.927463		
CV (%) =	33.74			
Média geral:	0.7905067	Número de observações:		60

Teste Tukey para a FV ANESTES.

DMS: 0,624215563492988 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 20
Erro padrão: 0,183366313061558

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
TRI	0.397535	a1
EUGEN	0.513595	a1
BENZ	1.460390	a2

 Teste SNK para a FV ANESTES.

Médias DMS
 NMS: 0,05

 3 0,624215563492988
 2 0,519277594382615

Média harmonica do número de repetições (r): 20
 Erro padrão: 0,183366313061558

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
TRI	0.397535	a1
EUGEN	0.513595	a1
BENZ	1.460390	a2

 Variável analisada: CACHADIA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
ANESTES.	2	27.967978	13.983989	6.771
0.0023				
erro	57	117.716594	2.065203	
Total corrigido	59	145.684571		
CV (%) =	24.83			
Média geral:	1.9205883	Número de observações:		60

 Teste Tukey para a FV ANESTES.

DMS: 1,09390966045008 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 20
 Erro padrão: 0,32134120485031

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
EUGEN	0.987140	a1
TRI	2.173525	a2
BENZ	2.601100	a2

 Teste SNK para a FV ANESTES.

Médias DMS
 NMS: 0,05

3	1,09390966045008
2	0,910010595973872

Média harmonica do número de repetições (r): 20
 Erro padrão: 0,32134120485031

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
EUGEN	0.987140	a2
TRI	2.173525	a1
BENZ	2.601100	a1

CONCENTRAÇÕES

Arquivo analisado:

C:\Documents and Settings\XPMUser\Desktop\Estatistica robson\dados
tabulados\ANAVA CONCENTRcoes.dbf

Variável analisada: TILAPIA_BE

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV Pr>Fc	GL	SQ	QM	Fc
CONCENT. 0.5509	4	5.821854	1.455463	0.788
erro	15	27.717284	1.847819	
Total corrigido	19	33.539138		
CV (%) =	93.08			
Média geral:	1.4603900	Número de observações:		20

Variável analisada: TILAPIA_TR

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV Pr>Fc	GL	SQ	QM	Fc
CONCENT. 0.0001	4	1.777189	0.444297	12.815
erro	15	0.520055	0.034670	
Total corrigido	19	2.297245		
CV (%) =	46.84			
Média geral:	0.3975350	Número de observações:		20

 Teste Tukey para a FV CONCENT.

DMS: 0,406691219620847 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 0,0930998686447337

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	0.198500	a1
4	0.232825	a1
3	0.247875	a1
5	0.320050	a1
1	0.988425	a2

 Teste SNK para a FV CONCENT.

Médias DMS
 NMS: 0,05

5	0,406691219620847
4	0,379598232344006
3	0,342173683240406
2	0,280633256784518

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 0,0930998686447337

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	0.198500	a1
4	0.232825	a1
3	0.247875	a1
5	0.320050	a1
1	0.988425	a2

 Variável analisada: TILAPIA_EU

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV Pr>Fc	GL	SQ	QM	Fc
CONCENT. 0.9925	4	0.039683	0.009921	0.061
erro	15	2.454388	0.163626	
Total corrigido	19	2.494071		
CV (%) =	78.76			
Média geral:	0.5135950	Número de observações:		20

Variável analisada: CACHADIA_BE

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV Pr>Fc	GL	SQ	QM	Fc
CONCENT. 0.6397	4	6.176949	1.544237	0.644
erro	15	35.986163	2.399078	
Total corrigido	19	42.163112		
CV (%) =	59.55			
Média geral:	2.6011000	Número de observações:		20

Variável analisada: CACHADIA_TR

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV Pr>Fc	GL	SQ	QM	Fc
-------------	----	----	----	----

CONCENT.	4	5.938315	1.484579	0.397
0.8076				
erro	15	56.069451	3.737963	

Total corrigido	19	62.007766		

CV (%) =	88.95			
Média geral:	2.1735250	Número de observações:	20	

Variável analisada: CACHADIA_EU

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				

CONCENT.	4	1.916505	0.479126	0.618
0.6565				
erro	15	11.629211	0.775281	

Total corrigido	19	13.545716		

CV (%) =	89.20			
Média geral:	0.9871400	Número de observações:	20	

ESPÉCIES

Arquivo analisado:

C:\Documents and Settings\XPMUser\Desktop\Estatística robson\dados
tabulados\DADOS TABULADOS.dbf-----
Variável analisada: UG.G_TILAPOpção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
ESPECIE	1	38.312537	38.312537	22.878
0.0000				
erro	118	197.612034	1.674678	
Total corrigido	119	235.924572		
CV (%) =	45.47			
Média geral:	1.3555475	Número de observações:		120

Teste SNK para a FV ESPECIE

Médias DMS

NMS: 0,05

2 0,467875134548467

Média harmonica do número de repetições (r): 60

Erro padrão: 0,167066765950601

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
TIL _μ PIA	0.790507	a1
CACHADIA	1.920588	a2

Teste Tukey para a FV ESPECIE

DMS: 0,467875134548467 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 60
Erro padrão: 0,167066765950601

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
TIL _μ PIA	0.790507	a1
CACHADIA	1.920588	a2
