

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Formación Profesional
de Biología

“VIABILIDAD DEL USO DE CRISTALES DE MENTOL COMO ANESTESICO EN JUVENILES DE GAMITANA, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) (Piscis, Characiformes)”

TESIS

Requisito para optar el título profesional de
Biólogo

AUTOR:

Jorge Willian Flores Rodriguez

IQUITOS – PERÚ

2014

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR

Blga. Marina Claudiana del Águila Pizarro, MSc.

Presidente

Blgo, Luis E. Campos Baca, Dr. Blgo.

Miembro

Jorge Luis Marapara del Águila, Dr.

Miembro

Blgo. Enrique Ríos Isern, Dr.

Asesor

Blga. Pryscila S. Casado del Castillo.MSc.

Asesor

DEDICATORIA

A mí amada y querida mamá:

Ilmer Rodriguez Fartolino,

Y mi padre Jorge Flores por

todo el amor, consejo,

comprensión para encaminar

mi vida. ¡Los amo!

A mi querida hermana Susan

Flores y mi pareja María

Rivadeneira que con su apoyo

incondicional y confianza hacia

mí, me dieron los ánimos y

fuerzas para salir adelante.

A mi abuelo, Padre y amigo

Jorge A. Flores Rengifo

Que desde el cielo me está guiando

Y por sus consejos que siempre me dio

Son el aliento de mí día a día. Te amo viejo!

AGRADECIMIENTOS

Al Ing.Salvador Tello, Director del Programa AQUAREC, IIAP, por haberme permitido realizar los bioensayos, en las instalaciones del Centro de Investigaciones Fernando Alcantara Bocanegra. IIAP.

De manera especial a los técnicos del IIAP, por brindarme de su apoyo en cada tramo del trabajo.

A mi AsesoraMSc. Prisyra Casado del Castillo por darme toda la orientación y facilidad dentro de las instalaciones del IIAP, así como todos los consejos y tertulias compartidas.

A mi Asesor el Dr. Enrique Rios Isern por haberme enseñado cosas valiosas durante mi formación académica y por los consejos y recomendaciones para la presentación de este trabajo.

A mis amigos por su apoyo incondicional en todo momento compartido durante la elaboración de esta investigación. Y a todas aquellas personas que de una u otra forma me brindaron su apoyo en las diferentes etapas de este trabajo, ya que muchas veces intentar hacer algo diferente es como intentar ir contra la corriente y contra el sistema.

¡GRACIAS TOTALES!

ÍNDICE

	Pág
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR.....	ii
PAGINA DEL ASESOR.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ANEXOS.....	xiii
LISTA DE GRAFICOS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Anestésicos en peces.....	3
2.2. Cristales de mentol como anestésico.....	8
2.3. Concentración mínima toxica de anestésicos.....	8
2.4. Descripción de los cristales de mentol.....	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Área de Estudio.....	11
3.2. Material Biológico.....	11
3.2.1. Descripción de la Gamitana (<i>Colossoma Macropomum</i>).....	11
3.3. Fuente de Agua utilizada.....	12
3.4. Aclimatación de los Alevinos.....	13
3.5. Diseño Experimental de la Investigación.....	13
3.5.1. Preparación y Utilización de la solución anestésica.....	14
3.5.2. Tiempo de inducción de los cristales de mentol como anestésico.....	15
3.5.3. Tiempo de exposición o margen de seguridad de los cristales de mentol como anestésico.....	16
3.5.4. Efectos en los parámetros hematológicos de los cristales de mentol como Anestésico.....	18

3.5.5. Concentración mínima tóxica de los cristales de mentol como Anestésico	20
3.6. Condiciones de los Bioensayos	20
3.7. Protocolo aplicado para los bioensayos en la investigación	21
3.8. Protocolo de evaluación del comportamiento ante el anestésico	22
3.9. Análisis Estadístico	23
IV. RESULTADOS.....	24
4.1. Determinación de la concentración ideal de los cristales de mentol como Anestésico en juveniles de <i>Colossoma macropomum</i> “Gamitana”	24
4.1.1. Reducción total del movimiento opercular	25
4.1.2. Recuperación.....	27
4.2 Determinación del margen de seguridad de los cristales de mentol Como anestésico en juveniles de <i>Colossoma macropomum</i> “Gamitana”	30
4.2.1. Margen de seguridad de la concentración 120 ppm o mg/L.....	31
4.2.2. Margen de seguridad de la concentración 150 ppm o mg/L.....	33
4.2.3. Margen de seguridad de la concentración 180 ppm o mg/L.....	35
4.3. Determinación del efecto de los cristales de mentol como anestésico en los parámetros hematológicos de juveniles de <i>Colossoma macropomum</i> “Gamitana”	38
4.3.1. Análisis de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 120 ppm o mg/L	38
4.3.2. Análisis de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 150 ppm o mg/L	40
4.3.3. Análisis de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 180 ppm o mg/L	43
4.3.4. Análisis de los niveles de glucosa(mg/dL) de la concentración 120 ppm o mg/L	45
4.3.5. Análisis de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 150 ppm o mg/L	49
4.3.6. Análisis de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 180 ppm o mg/L	52

4.4. Determinación de la concentración mínima tóxica de los cristales de mentol como anestésico en juveniles de <i>Colossoma macropomum</i> "Gamitana"	55
V. DISCUSIÓN	57
VI. CONCLUSIONES	62
VII. RECOMENDACIONES	63
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
IX. ANEXOS.....	70

LISTA DE TABLAS

Número	Título	Pag.
Tabla 1.	Concentraciones experimentales	14
Tabla 2.	Volumen del anestésico.....	15
Tabla 3.	Estadios de la anestesia	22
Tabla 4	Análisis de varianza (Reducción total del movimiento opercular)	25
Tabla 5.	Prueba de Tukey (Reducción total del movimiento opercular).....	26
Tabla 6	Análisis de varianza (Recuperación)	28
Tabla 7.	Prueba de Tukey (Recuperación).....	28
Tabla 8	Análisis de varianza de los tiempos de exposición de la concentración 120 ppm o mg/L.....	31
Tabla 9.	Prueba de Tukey de los tiempos de exposición de la concentración 120 ppm o mg/L.....	32
Tabla 10	Análisis de varianza de los tiempos de exposición de la concentración 150 ppm o mg/L.....	34
Tabla 11.	Prueba de Tukey de los tiempos de exposición de la concentración 150 ppm o mg/L.....	34
Tabla 12	Análisis de varianza de los tiempos de exposición de la concentración 180 ppm o mg/L.....	36
Tabla 13.	Prueba de Tukey de los tiempos de exposición de la concentración 180 ppm o mg/L.....	36
Tabla 14	Análisis de varianza de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 120 ppm o mg/L.....	39
Tabla 15.	Prueba de Tukey de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 120 ppm o mg/L.....	39
Tabla 16	Análisis de varianza de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 150 ppm o mg/L.....	41
Tabla 17	Prueba de Tukey de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 180 ppm o mg/L.....	42
Tabla 18	Análisis de varianza de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 180 ppm o mg/L.....	44

Tabla 19.	Prueba de Tukey de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 180 ppm o mg/L.....	44
Tabla 20	Análisis de varianza de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 120 ppm o mg/L.....	46
Tabla 21.	Prueba de Tukey de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 120 ppm o mg/L.....	47
Tabla 22	Análisis de varianza de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 150 ppm o mg/L.....	49
Tabla 23.	Prueba de Tukey de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 150 ppm o mg/L.....	50
Tabla 24	Análisis de varianza de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 180 ppm o mg/L.....	52
Tabla 25	Prueba de Tukey de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 180 ppm o mg/L.....	53

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Pág
Figura 1.	Diagrama del Diseño Experimental de la Investigación (Inducción del anestésico).....	16
Figura 2.	Diagrama del Diseño Experimental de la Investigación (Margen de seguridad)	17
Figura 3.	Diagrama del Diseño Experimental de la Investigación (Efectos en los parámetros hematológicos.....	18

LISTA DE ANEXOS

Número	Título	Pág.
Foto 1.	Centro de Investigación Fernando Alcántara Bocanegra. IIAP	71
Foto 2.	Juvenil de gamitana.....	12
Foto 3.	Tanques de losetas para aclimatación de los peces	71
Foto 4.	Tanques de aclimatación.....	72
Foto 5.	Cristales de mentol.....	72
Foto 6:	Toma de muestras de sangre	73
Foto 7.	Equipo de medición de glucosa.....	73
Foto 8.	Equipo para determinar hematocritos.....	74
Foto 9.	Fase experimental de concentración mínima tóxica	74
	Estadios del anestésico.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Número	Título	Pág.
Gráfico 1.	Reducción total del movimiento opercular	27
Gráfico 2.	Recuperación.....	29
Gráfico 3.	Tiempo de recuperación a la exposición de la concentración de 120 ppm o mg/L	33
Gráfico 4.	Tiempo de recuperación a la exposición de la concentración de 150 ppm o mg/L	35
Gráfico 5.	Tiempo de recuperación a la exposición de la concentración de 180 ppm o mg/L	37
Gráfico 6.	Niveles de hematocrito (%) de la concentración de 120 ppm o mg/L.....	40
Gráfico 7.	Niveles de hematocrito (%) de la concentración de 120 ppm o mg/L.....	43
Gráfico 8.	Niveles de hematocrito (%) de la concentración de 120 ppm o mg/L.....	45
Gráfico 9.	Niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 120 ppm o mg/L.....	48
Gráfico 10.	Niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 150 ppm o mg/L.....	51
Gráfico 11.	Niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 180 ppm o mg/L.....	54
Gráfico 12.	Mortalidad acumulada (%): horas.....	56

RESUMEN

La viabilidad del uso de los cristales de mentol como anestésico en juveniles de *Colossoma macropomum*, “gamitana” (Cuvier, 1818), fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación Fernando Alcántara Bocanegra, IIAP, mediante bioensayos planteados de acuerdo a los objetivos, determinación de la concentración ideal, determinación del margen de seguridad, efectos en los parámetros hematológicos y determinación de la concentración letal media. Se Utilizó como unidades experimentales envases plásticos de 5L de carga de agua, 701 juveniles de gamitana, distribuidos entre los cuatro bioensayos, con tres repeticiones, cada envase con 10 juveniles de gamitana. A excepción del bioensayo para determinar los efectos en los parámetros hematológicos que se hizo una sola repetición por tratarse de muestras de sangre.

La concentración ideal encontrada de las concentraciones de 60, 90, 120, 150, 180 y 210 ppm del anestésico por tener tiempos de inducción y recuperación rápida, fueron las concentraciones de 120, 150 y 180 ppm.

El margen de seguridad se trabajó con tiempos de exposición de 10, 20 y 30 minutos con 120, 150 y 180 ppm, donde se obtuvo que los peces soportaron la exposición en los diferentes tiempos sin ocasionar su muerte ni lesión alguna.

El efecto en los parámetros hematológicos, hematocrito (%) y glucosa (mg/dL) que se trabajaron con las tres concentraciones antes mencionadas en tiempos de 3, 9 y 10 + recuperación en minutos de exposición al anestésico, teniendo un grupo control (sin anestésico) con 23,33%. La concentración de 120 ppm tuvo diferencia más marcada en el tiempo de tres minutos con 29,22%, al igual que la concentración de 150 ppm que se

diferenció marcadamente en el minuto tres con 33,67%. 180 ppm tuvo diferencia en cuanto al control en el minuto tres con 29,67%.

Los niveles de glucosa teniendo como contraste 56,40 mg/dL (grupo control), obtuvo diferencia significativa en la concentración de 120 ppm que tuvo un incremento en sus valores a comparación del control, (120,20 mg/dL) en el minuto nueve. Las concentraciones de 150 y 180 ppm, no mostraron diferencias significativas ante el análisis estadístico, resultando homogéneos.

Además la concentración mínima tóxica trabajando con concentraciones de 30, 60, 90, 120, 150, 210 ppm, exponiendo los peces a 24 horas de cada concentración, registrándose que a las 18 horas de exposición la concentración de 60 ppm acumuló una mortalidad del 90%, siendo este la concentración mínima tóxica.

PALABRAS CLAVES: Cristales de mentol, anestésicos, juveniles, gamitana, bioensayos

I. INTRODUCCIÓN

El uso de anestésicos en la piscicultura facilita en gran medida muchos procedimientos propios de la actividad como son la inseminación artificial, inducción del desove, la obtención de peso y longitud corporal, la realización de operaciones, biopsias, transporte **(Ross & Ross 1999)** e inclusive técnicas de reproducción y mejora genética debido que los peces bajo anestesia es menor la incidencia del trauma. Al elegir un anestésico debe tomarse en cuenta una serie de consideraciones importantes tales como: eficacia, costo, disponibilidad, facilidad de uso y la ausencia de efectos adversos sobre peces, seres humanos y el ambiente **(Hopkins et al. 2003)**.

El efecto de la anestesia en el pez está asociado con cambios visibles de comportamiento, a partir de la reducción en el movimiento opercular, hasta la pérdida completa de la respuesta a la manipulación. La anestesia se alcanza cuando ocurre la pérdida total o parcial de los sentidos corporales, debido a la disminución de las funciones nerviosas **(Iwama&Ackerman, 2005)**. Muchos factores pueden influir en la acción de los anestésicos. Entre ellos se destacan la calidad del agua, el momento de inducción de la anestesia, las especies anestesiadas, el tamaño de los peces, entre otros. Estos factores pueden interferir en el tiempo necesario para que los animales lleguen a la fase de la anestesia deseada **(Olsen et al., 1995)**. La recuperación de peces sometidos a anestesia es más rápida a temperaturas más elevadas, puesto que las altas tasas metabólicas están asociadas con altas temperaturas, mientras que en temperaturas más bajas, el tiempo de inducción es más prolongado **(Hoskonen&Pirhonen, 2006)**.

Por ello la gamitana (*Colossoma macropomum*), pez que despierta interés por la calidad de su carne y la facilidad de su manejo en piscicultura (**Tavares-Dias et al., 1999**), califica como candidato para la utilización del anestésico, para probar su viabilidad. El anestésico a usar por su fácil preparación y adquisición a bajo costo son los cristales de mentol, el cual es obtenido del aceite esencial de las plantas del género *Mentha* sp, entre una de ellas la *Mentha arvensis*, con propiedades anestésicas, antiespasmódicas, anti-inflamatorias, anti úlceras y antiviricas (**Cunha, 2007**), Siendo de gran importancia económica en la industria farmacéutica alimenticia y cosmética, además es ampliamente usado como anestesia en invertebrados marinos (**Ruppert & Barnes, 1996**).

Los cristales de mentol ya fueron utilizados en pruebas anteriores como anestésico así lo confirman **Façanha & Gomes, (2005)** que trabajó con gamitana en las fases de juvenil y adulto, encontrando las concentraciones adecuadas y el margen de seguridad para estas fases del pez y **Simões, L.C. & Gomes (2009)**, que en tilapia en fase juvenil se trabajó los cristales de mentol, encontrando su concentración adecuada, su margen de seguridad y el efecto sobre los parámetros hematológicos de esta especie de pez.

Actualmente no existen reportes e información de la zona (Perú), y por esta razón es que se busca demostrar la viabilidad de los cristales de mentol como anestésico en juveniles de gamitana, que trata como objetivos la concentración adecuada del anestésico, el margen de seguridad o tiempo de exposición máximo, la influencia sobre los parámetros hematológicos y la determinación de la concentración mínima tóxica del anestésico para la especie *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818), gamitana.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Anestésicos en peces

Moyano A. (1997), evaluaron tres anestésicos, llamados MS-222® (metanolsulfanato de trícaina), Benzocaína y BZ-20® (benzocaína comercial) en alevines y juvenil de *S. salar* (Salmón del Atlántico), en dos dosis, una alta y una baja determinadas por el fabricante y la literatura. Para esto se sumergieron para cada caso, en duplicado, 25 peces en una batea que contenía el respectivo anestésico, donde se midió el tiempo de inducción y de recuperación a un estado de anestesia de narcosis profunda, se realizó una segunda experiencia para determinar la tasa de sobrevivencia de los peces a los anestésicos a un estado de anestesia quirúrgica. Solo con MS-222® fue posible lograr el estado de narcosis profunda en los estados de desarrollo de alevín y juvenil de Salmón del Atlántico; la benzocaína actúa a una concentración más baja que el MS-222®, debido a que su disolución previa en etanol, potencia la acción del anestésico. En esta experiencia solo se obtuvo para benzocaína el estado de anestesia deseado a la dosis alta (45 ppm) para alevín y juvenil. A la dosis baja no se logró el estado de anestesia testado. BZ-20® es un derivado de la Benzocaína que posee la ventaja de ser soluble en agua. Solo se obtuvo inducción al estado de anestesia de narcosis profunda a la dosis alta (40 ppm) para juvenil, siendo el tiempo de inducción más alto en relación a los obtenidos por los otros anestésicos. Al no lograr el estado de anestesia deseado con alevín, se probó el anestésico al doble de la dosis máxima, o sea 80 ppm, con lo cual si se obtuvo el estado de anestesia requerido. En la prueba de medición del tiempo de sobrevivencia, se indujo a los peces a un estado de anestesia quirúrgica. El único anestésico que produjo

mortalidad en los juveniles fue el MS-222® en un 24%. Para el caso del BZ-20® se produjo mortalidad al ser probado al doble de la dosis máxima (80ppm), en un 40% en alevín y un 24% en juvenil

Roubach et al (2000), evaluaron el uso de MS-222 (metanolsulfanato de trícaina), como anestésico para juveniles de sábalo cola roja, *Brycon cephalus*. Utilizaron cinco concentraciones 100, 150, 200, 250, 300 mg/L, donde obtuvieron que la concentración de 100 mg/L y menores a ella no causan una inducción completa de la anestesia, en cambio a 150 mg/L duro la exposición 10 minutos. En concentraciones mayores a ellas los peces fueron inducidos en menor tiempo, pero se observó mortalidad de 16,77 y 33,3% en las dosis de 200 y 30 mg/L. En los parámetros hematológicos se observó una alteración significativa en los niveles de glucosa en los peces anestesiados con dosis de 250 y 300 mg/L. Concluyendo que la dosis ideal para anestésiar juveniles de sábalo cola roja es de 150 mg/L.

García et al. (2002), evaluaron la eficacia, del aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* L. (Merr. & Perry), como anestésico en ejemplares de seriola, *Serioladumerili* (Risso, 1810), lubina, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) dorada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), dentón, *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758) y sargo picudo, *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). La novedosa utilización de este producto resultó efectiva en todas las especies a dosis de 40 ppm en agua de mar, provocó la anestesia total de los peces en 3-6 minutos y su recuperación en 2-5 minutos, y no se observó en ellos ningún efecto indeseable.

Molina et al. (2005), utilizaron para el transporte de sardinas (*Sardina pilchardus*), tres anestésicos en dosis de sedación: aceite de clavo (10 ml/m³ de Aquí S), 2-Fenoxietanol (0,1 ml/l) y metanolsulfanato de tricaina o MS-222 (10 mg/l), obteniendo con el ultimo mencionado menos mortalidad que en los demás.

Santamaría et al. (2008) evaluaron la efectividad anestésica de 2-fenoxietanol, benzocaína, quinaldina y MS-222(metanolsulfanato de tricaina) en alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Alevinos (7.3 ± 6.8 g) y juveniles (49.6 ± 28.4 g) fueron expuestos a 2-fenoxietanol (200, 400 y 600 ppm), benzocaína (50, 100 y 150 ppm), quinaldina (7.5, 15 y 30 ppm) o MS-222 (100, 150 y 200 ppm) (n=12), para evaluar la duración de la inducción y recuperación, frecuencia opercular y la sobrevivencia post anestesia. La concentración de anestésico; sin embargo, alevinos expuestos a MS-222 mostraron períodos de inducción más largos que los juveniles; y alevinos expuestos a 2-fenoxietanol mostraron períodos de inducción iguales con las tres concentraciones (p>0.05), mientras que juveniles expuestos a MS-222 mostraron el menor tiempo de inducción con la menor concentración (p<0.05). El tiempo de recuperación fue inferior a 2 min, con 2-fenoxietanol, MS-222, quinaldina y 50 ppm de benzocaína; pero altas concentraciones de benzocaína mostraron largos períodos de recuperación.

Pérez et al. (2010), evaluaron las concentraciones de aceite de clavo (eugenol) 30, 60, 90, 120 y 150 mg/L en 40 ejemplares de paco (*Piaractus mesopotamicus*), con peso promedio de 716.18 g, siendo utilizados dos acuarios de 20 litros, separando un acuario con anestesia y otro sin anestesia, concluyendo que la concentración

de 30 mg/L es suficiente para la inducción anestésica de los animales, por otra parte, las concentraciones más elevadas, hasta 150 mg/L, causaron inducciones aún más rápidas, sin pérdida en las condiciones para la recuperación de los peces.

Llanos C. & Scotto C. (2010), Evaluaron la eficacia anestésica del eugenol aplicadas a diferentes labores de manipulación tales como inseminación artificial, inducción del desove, la obtención de peso y longitud corporal, la realización de operaciones, biopsias y transporte de *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848). Las pruebas se realizaron en 10 individuos machos y 10 individuos hembras de *X. helleri* "pez espada" por cada tres dosis de eugenol. La utilización de este producto resultó efectiva en ambos sexos en dosis de 100, 125 y 150 mg·L⁻¹, con un tiempo promedio de inducción total de la anestesia (T.I.) de 251,2 seg (machos) y 279,5 seg (hembras) a 100 mg·L⁻¹; 201,8 seg (machos) y 257,7 seg (hembras) a 125 mg·L⁻¹; 182,3 seg (machos) y 209,4 seg (hembras) a 150 mg·L⁻¹; y un tiempo promedio de recuperación total a la anestesia (T.R.) de 261,1 seg (machos) y 389,8 seg (hembras) a 100 mg·L⁻¹; 204,5 seg (machos) y 213,5 seg (hembras) a 125 mg·L⁻¹; 255,1 seg (machos) y 238,3 seg (hembras) a 150 mg·L⁻¹. Se determinó una mayor eficiencia a la inducción de la anestesia en la dosis de 125 mg·L⁻¹ para machos y 100 mg·L⁻¹ para hembras. No se observó en ningún animal algún efecto letal durante la inducción de la anestesia y posterior recuperación a ésta

Ocampo et al. (2012), evaluaron la concentración anestésica efectiva del eugenol en 40 peces escalares (*Pterophyllumscalare*) bajo condiciones de laboratorio. Los animales fueron expuestos a cuatro concentraciones de la solución anestésica (20, 30, 40 y 50 mg/L de eugenol) y las observaciones se hicieron en los estadios de

inducción a la anestesia (I, II, III) y recuperación (I, II, III, IV). Los animales expuestos a las mayores concentraciones de eugenol (40 y 50 mg/L) entraron rápidamente en inducción; sin embargo, fueron los que más tardaron en recuperarse ($p < 0.05$). En una concentración de 20 mg/L se induce anestesia ligera en peces escalares (estadio I de anestesia), en tanto que una concentración de 50 mg/L se induce un estadio de anestesia avanzado (III). La concentración anestésica más efectiva fue de 40 mg/L de eugenol para alevinos de peces escalares.

Fernandes et al. (2013), evaluaron la eficiencia de la benzocaína y del eugenol como anestésico para alevinos de pejerrey *Odontesthes bonariensis*, donde se realizaron dos experimentos en alevinos de $57 \pm 7,08$ mm e $1,1 \pm 0,44$ g, que fueron expuestos a concentraciones entre 40 mg^{-1} y 120 mgL^{-1} de benzocaína y de eugenol entre 12 mgL^{-1} y 75 mgL^{-1} . Ambos anestésicos mostraron eficiencia para anestesiar pejerrey, dado que la benzocaína en concentraciones de entre 80 mgL^{-1} y 100 mgL^{-1} mostraron mejores resultados, en cuanto para para eugenol las mejores concentraciones fueron entre 25 mgL^{-1} e 50 mgL^{-1} . Por otro lado el tiempo de recuperación no presentó diferencia significativa entre los anestésicos probados.

Mercy et al. (2013), Evaluaron el tiempo de inducción en Barbo de línea roja, *Puntius denisonii* (Day, 1865), exponiendo a estos peces de acuario a cuatro concentraciones de MS-222 (50 mg L^{-1} , 100 mg L^{-1} , 150 mg L^{-1} and 200 mg L^{-1}) para determinar cual es la más efectiva. La concentración más efectiva fue de 150 mg L^{-1} (con un tiempo de inducción de 165 ± 10 segundos y una recuperación de

112±10 segundos) con los que se determinó que el tiempo de inducción se encuentra por debajo de tres minutos en *P. denisonii*.

2.2. Cristales de mentol como anestésico

Façanha & Gomes, (2005), llevaron a cabo una evaluación de los cristales de mentol como anestésico en juveniles de gamitana (*Colossoma macropomum*) en concentraciones de 50; 100; 150; 200; 250 mg L⁻¹, donde concluyeron que la concentración ideal está entre 100 y 150 mg L⁻¹.

Simões, L.C. & Gomes (2009), realizaron una evaluación de los cristales de mentol como anestésico en juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*), en concentraciones de 50; 100; 150; 200; 250 y 300 mg L⁻¹, donde concluyeron que la concentración ideal está entre 150 y 200 mg L⁻¹, y la de rápida acción sin generar mortalidad es la de 250 mg L⁻¹. Con la concentración ideal se reportó diferencias significativas en la glucosa, por lo que causó estrés en los peces.

2.3. Concentración mínima tóxica

Marín et al. (2012), estudiaron la concentración letal 50 (CL50) a 96 horas del eugenol (aceite de clavo derivado de *Eugenia caryophyllata*) en cachama blanca para establecerla. Para la determinación de la CL50 se utilizaron 90 alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de 3.5 ± 0.5 g en acuarios de vidrio con un volumen cercano a los 30 litros, los parámetros de calidad del agua estuvieron dentro del rango confort para la especie. Los peces fueron expuestos a siete concentraciones de eugenol (8, 12, 15, 18, 25, 35, 45 mg/L) adicionalmente se

evaluó un grupo control y un grupo con el diluyente anestésico por un periodo de 96 horas, en el cual se evaluó su comportamiento: eje de nado, tipo de nado y distribución en el acuario. El valor de la CL50 se estimó mediante el uso del software Trimmed Spearman-Kärber y fue de 18.2 mg/L ($p < 0.05$), acorde a lo descrito para algunas especies dulceacuícolas. Concluyendo que la dosis letal fue de 18 mg/L en el lapso de 24 horas con una muerte del 60%.

Llanos et al. (2012), evaluaron la CL50 a 96h del eugenol en el pez espada, *Xiphophorus helleri*, donde utilizaron 27 acuarios de vidrio de 20 L (50 x 26 x 30 cm), mantenidos a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante las 96 h del periodo experimental, y saturado con oxígeno durante 24 h antes de la introducción de los peces. Se realizó la mezcla de solución reserva de eugenol en agua, diluida con un factor 0.6 para obtener concentraciones de 0 (control), 3.9, 6.5, 10.8, 18.0, 30.0, 50.0, 83.4 y 139.0 mg.L-1, respectivamente, en nueve acuarios, con tres réplicas por cada concentración. Se colocaron 10 peces por acuario. Concluyendo que el valor de la CL50 a 96 horas (95% de límites de confianza) del eugenol fue 22.12 mg.L-1 con un límite mínimo de 15.86 y máximo de 30.85 mg.L-1

2.4. Descripción de los Cristales de mentol

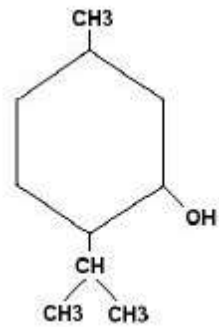
Empresa ANCOFARMA SA, El l-mentol, que es la forma natural, se obtiene de la naturaleza a partir de la esencia de varias especies del género *Mentha* (fam. Labiadas), principalmente *Mentha piperitay Mentha arvensis*, o por síntesis en forma levo o racémico (p. ej. se obtiene dl-mentol por hidrogenación del timol). Se trata de un agente con acción antiséptica, analgésica local, antiinflamatoria.

Sinónimos:

Levomentol. (-)-Mentol. Hexahidrotimol. 3-Mentanol. 2-Isopropil-5-metilciclohexanol. Alcohol mentólico. Alcánfor de menta.

Formula Molecular:

$C_{10}H_{20}O$



Peso Molecular:

156,26

Datos Físico-Químicos:

Cristales brillantes, prismáticos o aciculares, incoloros. Prácticamente insoluble en agua, muy soluble en etanol al 96%, y petróleo ligero, fácilmente soluble en aceites grasos, y parafina líquida, muy poco soluble en glicerol. Punto de fusión: 41 – 44°C. Rotación óptica: -50° (c=10, etanol).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Fernando Alcántara Bocanegra de Quistococha - CIFAB, sede del Programa de Investigación para el uso y Conservación del Agua y sus Recursos (AQUAREC) del IIAP, ubicado en el Km 4,5 carretera Iquitos – Nauta, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, Región Loreto

(Foto 1.)

3.2. Material Biológico

3.2.1. Descripción de la Gamitana (*Colossoma Macropomum*)

La gamitana es el carácido más grande de la amazonía, es un pez muy fuerte, que puede llegar a pesar hasta 30Kg y crecer hasta 90cm de longitud total (**Goulding, 1980**). Presenta una coloración gris oscuro en el dorso y amarillo blanquizco en la parte ventral, el patrón de coloración puede variar en función del tipo de agua donde se desarrolla (**Goulding, 1980**). Los especímenes jóvenes hasta aproximadamente 40 días de edad presentan una mancha negra, similar a un “ojo” sobre la línea lateral, ubicada en el medio de ambos lados, que va desapareciendo gradualmente con la edad.

La gamitana es un pez que tiene tolerancia a los niveles bajos de oxígeno disuelto, y utiliza una serie de mecanismos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento para contrarrestar esta deficiencia en su hábitat (**Florindoet al., 2006**), también ha sido

señalada como una especie altamente resistente a las enfermedades (**González & Heredia, 1998**).



Foto 2. Juvenil de gamitana (*Colossoma Macropomum*)

Taxonomía:

Reino	:	Animalia
Phyllum	:	Chordata
Subphyllum	:	Vertebrata
Clase	:	Actinopterygii
Orden	:	Characiformes
Familia	:	Serrasalmidae
Género	:	Colossoma
Especie	:	macropomum

3.3. Fuente de Agua utilizada

La fuente de agua utilizada en las fases del experimento fue de los tanques armados con filtros para asegurar una mejor calidad del agua en la realización de los experimentos, además de un previo análisis del agua,

para constatar la calidad y dar solución a algún problema de índole químico - físico que puede influenciar en los resultados de la investigación (**Foto 3.**).

3.4. Aclimatación de los peces

En el periodo de aclimatación se utilizaron los tanques de losetas que se encuentran en la sala de reproducción de IIAP (**Foto 4**), que eran abastecidas por tanques antes mencionadas, durante un periodo de 1 semana, con aeración y flujo constante de agua.

Los peces fueron alimentados con ración balanceada al 28% de proteína *ad libitum*, suspendiendo la misma, 48 horas antes de efectuarse los bioensayos para evitar que las excretas producidas y el proceso de digestión de los peces interfieran con los resultados del experimento.

En este mismo periodo se midió la temperatura con el termómetro de mercurio, siendo el rango de temperatura $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, el oxígeno disuelto fue de 3 mg/L y el pH fue de 6,5L medidos con ayuda del Kit Lamotte AQ-2.

3.5. Diseño Experimental de la Investigación

El empleo de juveniles de Gamitana, se sustenta, en que en los momentos de efectuarse la investigación se encontraban con mayor disponibilidad, y por presentar una mayor facilidad para obtener las muestras sanguíneas que serían necesarias para un bioensayo a realizarse en la investigación.

El diseño experimental utilizado para el presente trabajo fue el: Diseño Completamente Aleatorio (DCA), por ser el que mejor se adapta a las

condiciones del experimento. Es útil para estudios de métodos y técnicas de trabajo en laboratorio, estudios de invernadero y experimentos con animales, asimismo, es conveniente, cuando la variabilidad está uniformemente distribuida en el material experimental o unidades experimentales. Este diseño permitió analizar los resultados o parámetros que se obtuvieron de los experimentos.

3.5.1. Preparación y Utilización de la solución anestésica

El mentol como componente fue utilizado en estado sólido, es decir en forma de cristales (**Foto 5.**), el cual fue diluido en alcohol (96%) bajo la relación de 1g (cristales de mentol)/ 10ml de alcohol de acuerdo a lo descrito por **Simoés & Gomes (2009)**, como solución padrón o stock. A partir de esta solución stock se obtuvieron las concentraciones 60, 90, 120, 150, 180, 210 ppm o mg/L, las cuales fueron preparadas en base a 50 ml

Tabla 1. Concentraciones experimentales

Concentración(ppm)	Alcohol(ml)	Solución stock(ml)	Base(ml)
60	47	3	50
90	45,5	4,5	50
120	44	6	50
150	42,5	7,5	50
180	41	9	50
210	39,5	10,5	50

Fuente: Anotaciones del autor

La volumen de anestésico a usar por cada concentración se hizo de acuerdo a los recipientes de agua experimentales, los cuales eran llenados hasta 4 litros de agua por la cantidad de solución stock agregada para la

preparación de la concentración a trabajar, resultando el volumen de anestésico a utilizar.

Tabla 2. Volumen del anestésico

Concentración(ppm)	Vol. De agua(L)	Solución stock(ml)	Vol. de anestesia(ml)
60	4	3	12
90	4	4,5	18
120	4	6	24
150	4	7,5	30
180	4	9	36
210	4	10,5	42

Fuente: Anotaciones del autor

3.5.2. Tiempo de inducción de los cristales de mentol como anestésico

Se utilizaron un total de 180 juveniles de gamitana con peso y talla promedio de 55,63 gr y 14,97 cm, para todos los bioensayos del trabajo experimental.

Para este bioensayo fueron colocados los peces en envases plásticos transparentes con una capacidad útil de 5 L, llenados solo en 4 L de agua.

Se distribuyó en 06 unidades experimentales conteniendo las diferentes concentraciones de anestésico. La prueba con la solución anestésica se realizó de manera individual a un total de 10 peces por cada tratamiento y se tomó nota del tiempo de inducción, además del tiempo de recuperación que se realizó posteriormente a la inducción, cada uno con tres repeticiones.

Figura 1. Diagrama del diseño experimental (Inducción del anestésico)






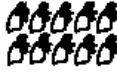









	60	90	120	150	180	210
Concentración (ppm)						
Nº Peces: 10						
Replica 1 10 peces						
Réplica 2 10 peces						
Réplica 3 10 peces						

3.5.3. Tiempo de exposición o margen de seguridad de los cristales de mentol como anestésico

El experimento de margen de seguridad se realizó con las concentraciones de 120, 150 y 180 ppm o mg/L, por ser homogéneos tras el análisis estadístico. Se descartó el de 210 ppm o mg/L por tener un tiempo de recuperación muy elevado lo cual no es conveniente en el uso de anestésicos.

Se distribuyó en tres recipientes experimentales los tiempos de 10, 20 y 30 minutos con tres repeticiones cada uno por cada concentración. Se utilizó un total de 270 peces, siendo 10 peces por tratamiento, experimentando de manera individual, es decir un pez por vez. Posterior a la exposición en cada tiempo experimental, se dispuso a los peces en recuperación para descartar la muerte de los organismos.







Figura 2. Diagrama del diseño experimental (Margen de seguridad)

	120	150	180
Concentración (ppm)			
Tiempos (min)	10 20 30	10 20 30	10 20 30
Nº Peces x replica 10			
Replica 1 Total de peces usados 30 peces			
Replica 2 Total de peces usados 30 peces			
Replica 3 Total de peces usados 30 peces			

3.5.4. Efectos en los parámetros hematológicos de los cristales de mentol como anestésico

Se evaluaron a partir de la toma de muestras de sangre. Se utilizaron 9 peces por envase experimental en cada concentración. Los tiempos trabajados por envase fueron de 3 minutos, 9 minutos y 10 minutos más recuperación, que además de estos se dispuso un grupo control que se tomaría en cuenta como la muestra cero (antes de la exposición al anestésico) para contrastar los resultados. Las concentraciones que se utilizaron fueron 120, 150 y 180 ppm o mg/L, que posterior a su exposición se procedió a la toma de sangre a través de un punción en la aleta caudal con jeringas que contenían heparina sódica para evitar la coagulación de la muestra, además de conservar las muestras en refrigeración, que luego se analizaron. (Foto 6.)

Figura 3. Diagrama del diseño experimental (Efectos en los parámetros hematológicos)

	120			150			180		
Concentración (ppm)									
Tiempos (min)	3	9	10 + Rec.	3	9	10 + Rec.	3	9	10 + Rec.
Nº Peces usados: 27									

- **Glucosa**

Se midió los índices de glucosa a partir del glucómetro utilizado en análisis para humanos ACCU-CHEK y las bandas de glucosa de la misma marca.

El método operador consistía en tomar la banda de glucosa y colocarla en el glucómetro, para luego insertar la muestra de sangre en la banda lo que activa inmediatamente el glucómetro mostrando el nivel de glucosa de la muestra(**Foto 7**).

- **Hematocrito**

El nivel de hematocrito fue obtenido utilizando el equipo HEMATOKRIT 210, donde fueron colocadas las muestras de sangre a través de capilares heparinizados, que una vez centrifugados con la ayuda de la tapa del equipo se media a través de porcentajes el hematocrito (**Foto 8**).

3.5.5. Concentración mínima toxica de los cristales de mentol como anestésico.

La concentración letal media se evaluó a partir de las concentraciones 30, 60, 90, 150, 210, 270 ppm o mg/L, en un periodo de 24 horas, con un número de 10 peces y tres repeticiones cada una. Fueron dispuestos en los envases de plástico de 5 L, llenados solo hasta 4L, con aireación constante.

La observación de los organismos se hizo constante durante las seis primeras horas, luego de ello se procedía a revisar los individuos cada tres horas. Se tomaba en cuenta como un pez muerto, cuando se retiraba al pez y se ponía en recuperación, si no se encontraba respuesta de vida en 15 minutos de haber sido puesto a recuperación, se tomaba nota como muerto, método recomendado por **Llanos et al. 2012.(Foto 9)**

3.6. Condiciones de los Bioensayos

Se utilizó un equipo portátil de la marca “LAMOTTE” para medir los parámetros físicos y químicos, se tomaron los valores de temperatura, pH, dióxido de carbono y oxígeno disuelto de las unidades experimentales. Para la medición de los parámetros químicos se utilizó la técnica de titulación y colorimetría; el control solo se realizó antes de iniciar el experimento debido a que la solución anestésica de los cristales de mentol interferiría enormemente en las pruebas para lo cual se utilizó el

instrumental antes mencionado. Solo se consideró conveniente medir diariamente la temperatura. Sin renovación de agua ni alimento.

3.7. Protocolo aplicado para los bioensayos en la investigación

El manejo de los animales de laboratorio se realizó teniendo en cuenta los siguientes principios básicos: evitar el sufrimiento innecesario de los animales, evitar riesgos del manipulador y fomentar la aplicación de la regla de las 3R (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) **(OIE, 2011)**.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a los lineamientos propuestos por la **European Medicines Agency (2007)**: (a) se seleccionó a los animales de apariencia más saludable y de peso similar, (b) se aseguró el mínimo número de peces por tratamiento, teniendo conocimiento previo sobre los rangos de las variables a estudiar en la especie.

Las condiciones ambientales fueron controladas. La dieta y el agua fueron estandarizadas en su calidad y composición durante todo el periodo de estudio.

- **Organismos de Prueba:** *Colossoma macropomum*.
- **Tipo de Prueba:** Estática, sin agregar más anestésicos y sin recambio de agua.
- **Suministro de Alimento:** Sin alimentación.

- **Agua utilizada:** Agua de estanque en óptimas condiciones previo análisis físico-químico.
- **Temperatura:** 27±1°C
- **Número de especímenes por experimento:** 10 organismos.
- **Número de réplicas por tratamiento:** 03 repeticiones.
- **Número de especímenes por tratamiento:** 30 organismos.
- **Número de concentraciones de Prueba:** 06 concentraciones.

3.8. Protocolo de evaluación del comportamiento ante el anestésico

Las evaluaciones se realizaron en el momento de los experimentos, dado que se tenía que observar las fases de inducción del anestésico en los organismos experimentales.

Tabla 3. Estadios de la anestesia

Estadio de la anestesia	Características en el comportamiento
1	Perdida de reacción de los estímulos
2	Pérdida parcial del equilibrio
3	Pérdida total del equilibrio
4	Reducción parcial del movimiento opercular
5	Reducción total de movimiento opercular
Recuperación	Retorno de los movimientos y nado activo

Propuesto por: Stoskopf (1993)

3.9. Análisis Estadístico

Se plantearon las hipótesis de trabajo:

Ho: No es viable el uso de cristales de mentol como anestésico en juveniles de gamitana,
Colossoma macropomum

Hi: Es viable el uso de cristales de mentol como anestésico en juveniles de gamitana,
Colossoma macropomum.

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó estadística descriptiva.

IV. RESULTADOS

4.1 Determinación de la concentración ideal de los cristales de mentol como anestésico en juveniles de *Colossoma macropomum*, (CUVIER 1818), “Gamitana”

Se realizaron los bioensayos con tres repeticiones para los cristales de mentol como anestésico, usando seis concentraciones diferentes (60, 90, 120, 150, 180 y 210 ppm o mg/L de la solución anestésica) a los que fueron expuestos los juveniles de gamitana tomando nota de los tiempos de las cinco fases de inducción y recuperación de cada concentración.

Los resultados a mostrarse corresponden de la última fase de inducción que es Reducción total del movimiento opercular y de Recuperación. Las fases de la anestesia de Perdida de reacción a los estímulos, Perdida parcial del equilibrio, Perdida total del equilibrio y Reducción parcial del movimiento opercular véase en Anexos.

Culminado los bioensayos se obtuvieron los tiempos de cada concentración y se realizó el análisis de varianza de cada estadio de la solución anestésica para determinar si existían diferencias significativas entre ellas.

4.1.1. Reducción total del movimiento opercular

Como quinto estadio de la solución anestésica, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 4). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 5) resultando que la concentración 210 ppm o mg/L que provoca la reducción total del movimiento opercular en menor tiempo que las demás concentraciones, seguida de las concentraciones 180 y 150 ppm o mg/L, las cuales resultaron homogéneas a la concentración antes mencionada.

Tabla 4. Análisis de varianza (Reducción total del movimiento opercular)

Reducción total del movimiento opercular					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	845022,923	5	169004,585	2298,173	,000
Intra-grupos	882,464	12	73,539		
Total	845905,387	17			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 5. Prueba de Tukey (Reducción total del movimiento opercular)

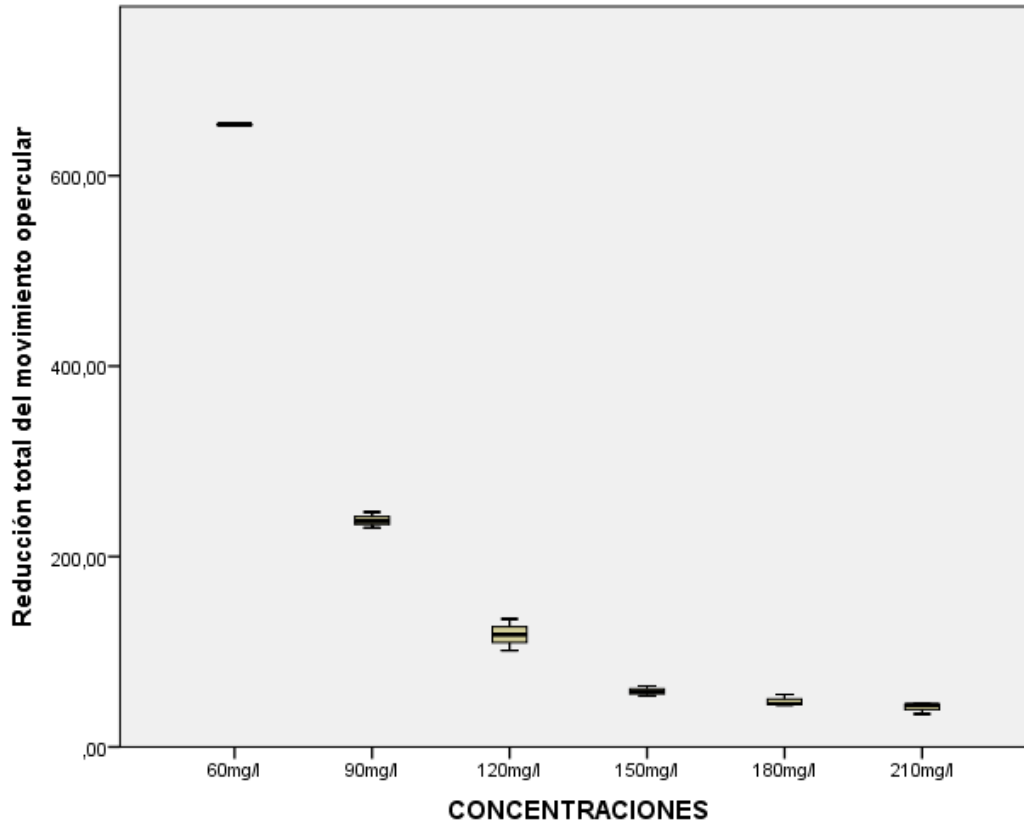
Reducción total del movimiento opercular

Prueba de Tukey

Concentraciones	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
210 mg/l	41,3833			
180 mg/l	48,2333			
150 mg/l	58,6233			
120 mg/l		117,9067		
90 mg/l			238,0700	
60 mg/l				653,4367
Sig.	,210	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 1. Reducción total del movimiento opercular



El gráfico 1, El tiempo de inducción más rápido para que el pez reduzca totalmente su movimiento opercular fue para la concentración de 210 ppm o mg/L con un tiempo promedio de 41,38s

4.1.2. Recuperación

Como sexto estadio de la solución anestésica, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 6). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 7) resultando que la concentración 60 ppm o mg/L tiene un periodo menor de tiempo de recuperación que las demás concentraciones, seguida de las concentraciones 90 y 120 ppm o mg/L, las cuales resultaron

homogéneas a la concentración antes mencionada, pero estas concentraciones a su vez son homogéneas con 150 y 180 ppm o mg/L.

Tabla 6. Análisis de varianza (Recuperación)

Recuperación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1281378,713	5	256275,743	89,611	,000
Intra-grupos	34318,307	12	2859,859		
Total	1315697,020	17			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

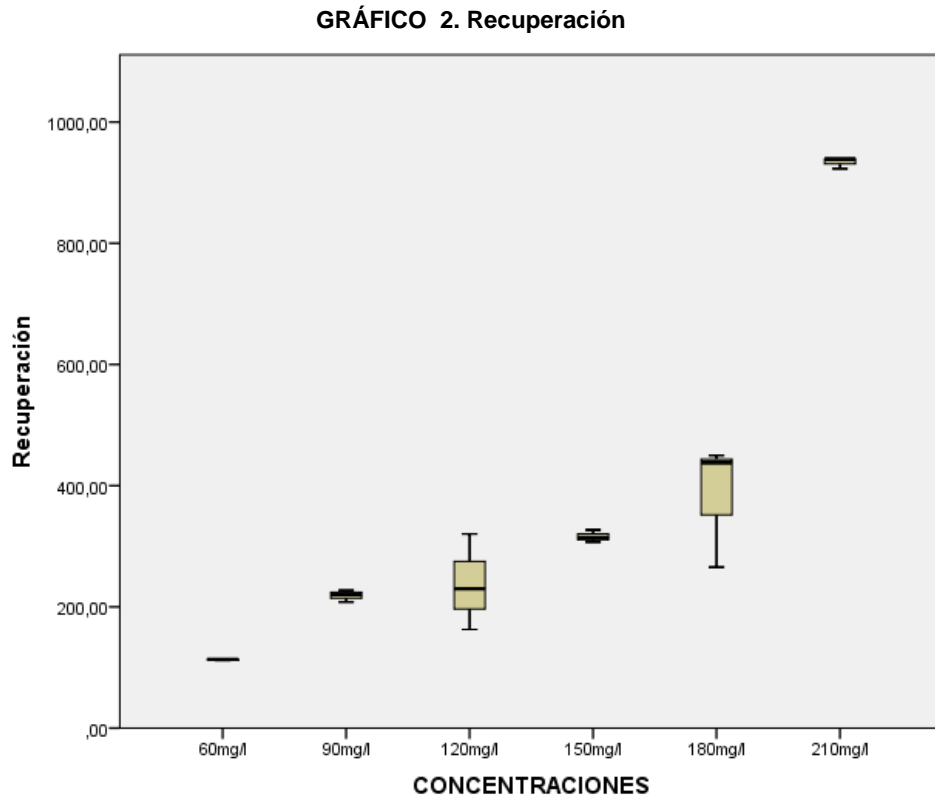
Tabla 7. Prueba de Tukey (Recuperación)

Recuperación

Prueba de Tukey

Concentraciones	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
60 mg/l	113,0367			
90 mg/l	218,7800	218,7800		
120 mg/l	237,7533	237,7533		
150 mg/l		316,1267	316,1267	
180 mg/l			384,4767	
210 mg/l				933,6233
Sig.	,114	,293	,633	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.



El gráfico 2, El tiempo de recuperación más rápido para el pez fue para la concentración de 60 ppm o mg/L con un tiempo promedio de 113,04 s

4.2. Determinación del margen de seguridad de los cristales de mentol como anestésico en juveniles de *Colossoma macropomum*, (CUVIER 1818) "Gamitana"

Se realizaron los bioensayos con tres repeticiones, para experimentar el tiempo de exposición de los cristales de mentol como anestésico.

De acuerdo al análisis estadístico anteriormente usado, se determinó experimentar con tres concentraciones. 210 ppm o mg/L por ser el de

menor tiempo de inducción en los estadios de la anestesia, hubiera sido escogido pero el periodo largo de tiempo que le toma al pez en recuperarse (933,62 segundos) influyo en su descarte para este bioensayo, por lo que se decidió usar el de 120 mg/L por no estar muy separado en tiempo en cuanto a la inducción del anestésico en el pezy su recuperación. Las otras dos concentraciones por tener buenos resultados fueron de 150 y 180 mg/L y por ser homogénea en tiempos de recuperación e inducción. (Observar Tabla 5 y 7).

Para el bioensayo se usaron tres concentraciones que fueron 120, 150 y 180 ppm o mg/L, a los que fueron expuestos los juveniles de gamitana durante los tiempos de 10, 20 y 30 min.

Culminado la exposición de los peces se procedía a ponerlos en recuperación y conocer si soportan esos tiempos expuestos a la solución anestésica.

4.2.1. Margen de seguridad de la concentración de 120 ppm o mg/L

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los tiempos de exposición (Tabla 8). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 9) resultando que la recuperación en un periodo menor de tiempo de recuperación fue a los diez (10) minutos de exposición.

Tabla 8. Análisis de varianza de los tiempos de exposición de la concentración de 120 ppm o mg/L.

Concentración 120 ppm o mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1774744,465	2	887372,233	68,332	,000
Intra-grupos	1129793,585	87	12986,133		
Total	2904538,051	89			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 9. Prueba de Tukey de los tiempos de recuperación a la exposición de la concentración de 120 ppm o mg/L

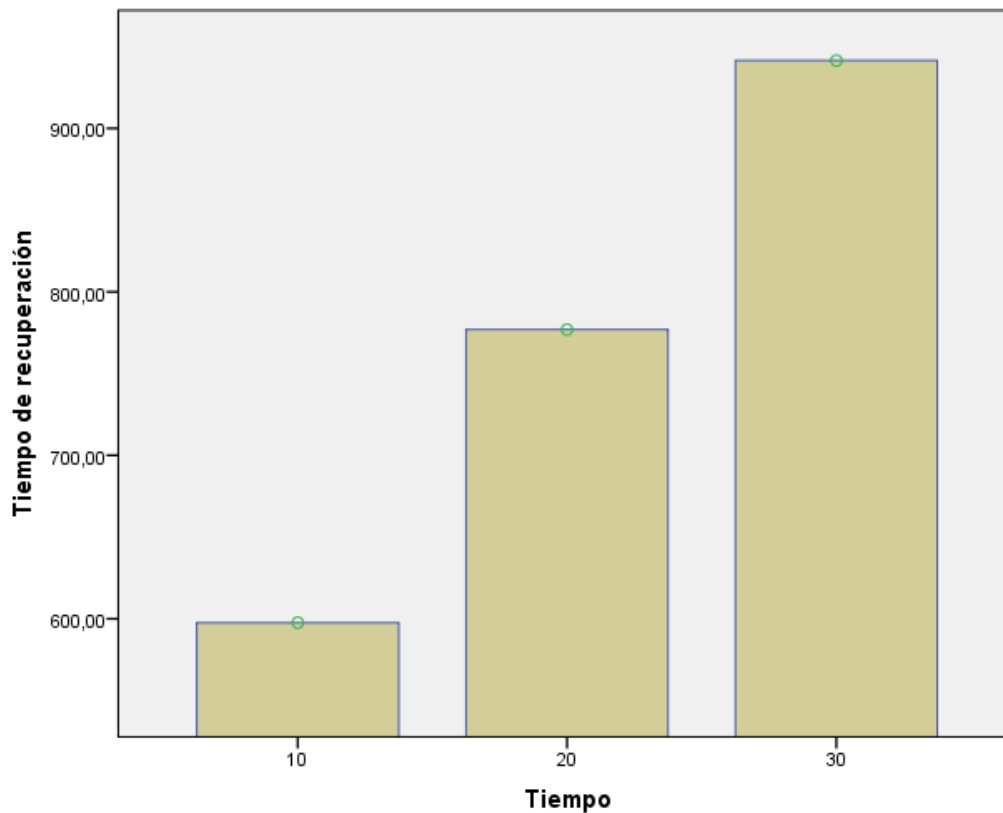
Concentración 120 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
10	597,6153		
20		776,9093	
30			941,4817
Sig.	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 3. Tiempos de recuperación a la exposición de la concentración 120 ppm o mg/L



El gráfico 3, El tiempo de recuperación más rápido para el pez fue a los diez (10) minutos de exposición con un tiempo promedio de 597,62 s

4.2.2. Margen de seguridad de la concentración de 150 ppm o mg/L

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los tiempos de exposición (Tabla 10). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 11) resultando que la recuperación en un periodo menor de tiempo de recuperación fue a los diez (10) minutos de exposición.

Tabla 10. Análisis de varianza de los tiempos de exposición de la concentración de 150 ppm o mg/L.

Concentración 150 ppm o mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	23767,719	2	11883,859	25,360	,000
Intra-grupos	40768,678	87	468,605		
Total	64536,397	89			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 11. Prueba de Tukey de los tiempos de recuperación a la exposición de la concentración de 150 ppm o mg/L

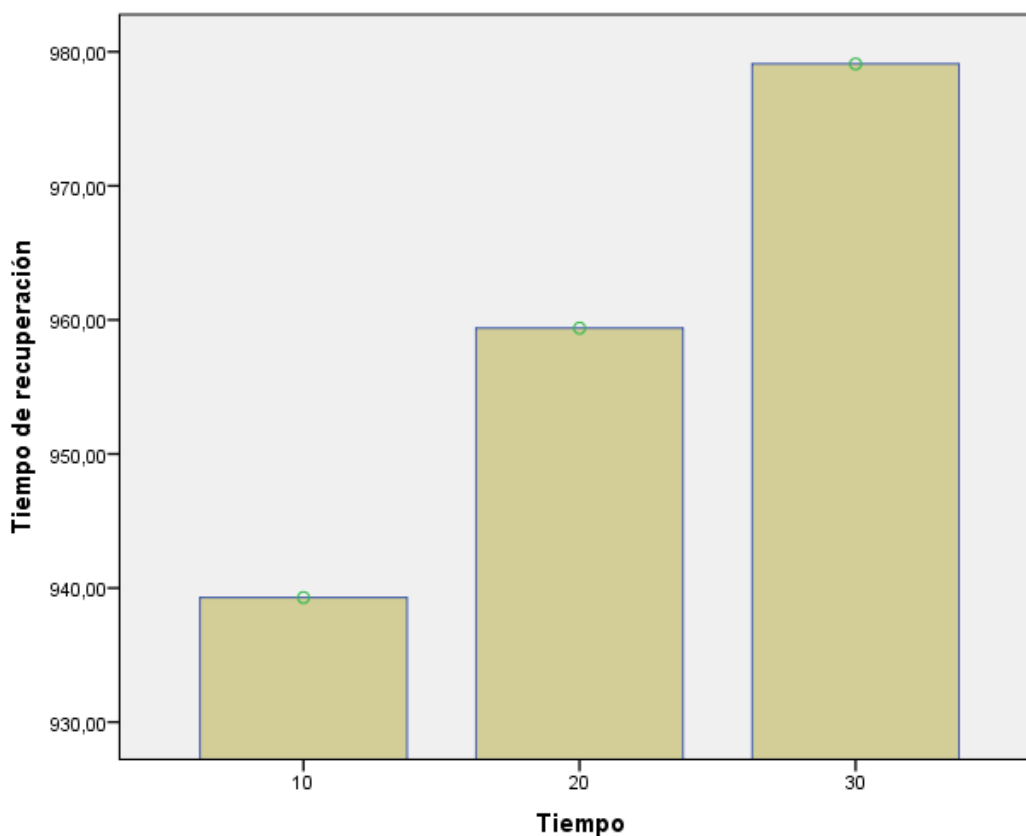
Concentración 150 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
10	939,2897		
20		959,3860	
30			979,0950
Sig.	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 4. Tiempos de recuperación a la exposición de la concentración 150 ppm o mg/L



El gráfico 4, El tiempo de recuperación más rápido para el pez fue a los diez (10) minutos de exposición con un tiempo promedio de 939,29 s

4.2.3. Margen de seguridad de la concentración de 180 ppm o mg/L

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los tiempos de exposición (Tabla 12). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 13) resultando que la recuperación en un periodo menor de tiempo de recuperación fue a los diez (10) minutos de exposición, pero resultando homogéneo el tiempo de recuperación de veinte (20) minutos.

Tabla 12. Análisis de varianza de los tiempos de exposición de la concentración de 180 ppm o mg/L.

Concentración 180 ppm mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2767221,266	2	1383610,633	45,133	,000
Intra-grupos	2667109,584	87	30656,432		
Total	5434330,850	89			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 13. Prueba de Tukey de los tiempos de recuperación a la exposición de la concentración de 180 ppm o mg/L

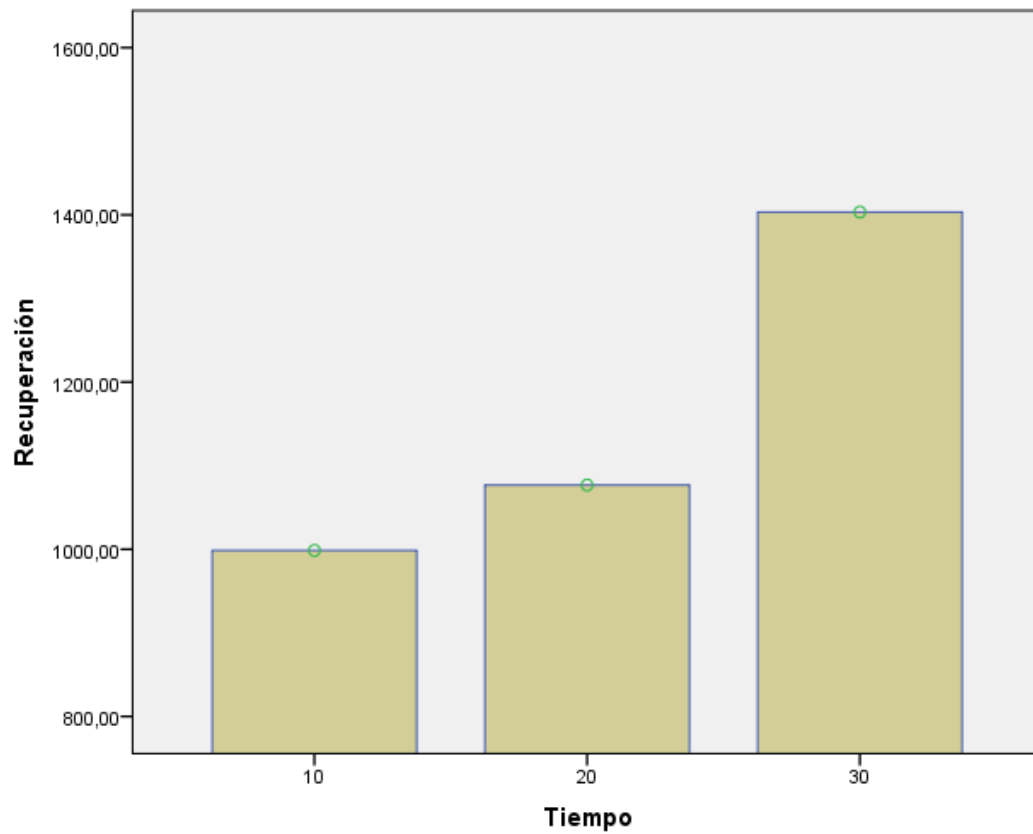
Concentración 180 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
10	998,5227	
20	1076,6820	
30		1403,3610
Sig.	,200	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 5. Tiempos de recuperación a la exposición de la concentración 180 ppm o mg/L



El gráfico 5, El tiempo de recuperación más rápido para el pez fue a los diez (10) minutos de exposición con un tiempo promedio de 998,52 s

4.3. Determinación del efecto de los cristales de mentol como anestésico en los parámetros hematológicos de juveniles de *Colossoma macropomum*, (CUVIER 1818) “Gamitana”

Se realizaron los bioensayos con tres repeticiones, para experimentar los efectos que ocasionan a nivel hematológico los cristales de mentol como anestésico y esto fue medido a nivel de hematocrito y glucosa.

Para el bioensayo se usaron tres concentraciones que fueron 120, 150 y 180 ppm o mg/L, a los que fueron expuestos los juveniles de gamitana durante los tiempos de 3 minutos, 9 minutos y 10 + recuperación. Se estableció un grupo control para las muestras de sangre sin efecto de los cristales de mentol como anestésico.

Culminado la exposición de los peces se procedía a sacar las muestras de sangre para su posterior análisis.

4.3.1. Análisis de los niveles de hematocrito (%) de la concentración de 120 ppm o mg/L

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los niveles de hematocrito (Tabla 14). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 15) resultando que a los tres (03) minutos el nivel de hematocrito (%) del pez se eleva considerablemente a comparación del grupo control evidenciándose una diferencia significativa marcada, evidenciando un probable efecto

estresante en el pez, consecuentemente en los minutos nueve(09) y diez(10) + recuperación los niveles de hematocrito (%) son homogéneos al del grupo control, pero también al minuto tres (03).

Tabla 14. Análisis de varianza de los niveles de hematocrito (%) de la concentración de 120 ppm o mg/L.

Concentración 120 ppm mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	185,000	3	61,667	3,017	,044
Intra-grupos	654,000	32	20,437		
Total	839,000	35			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 15. Prueba de Tukey de los niveles de hematocrito (%) de la concentración de 120 ppm o mg/L

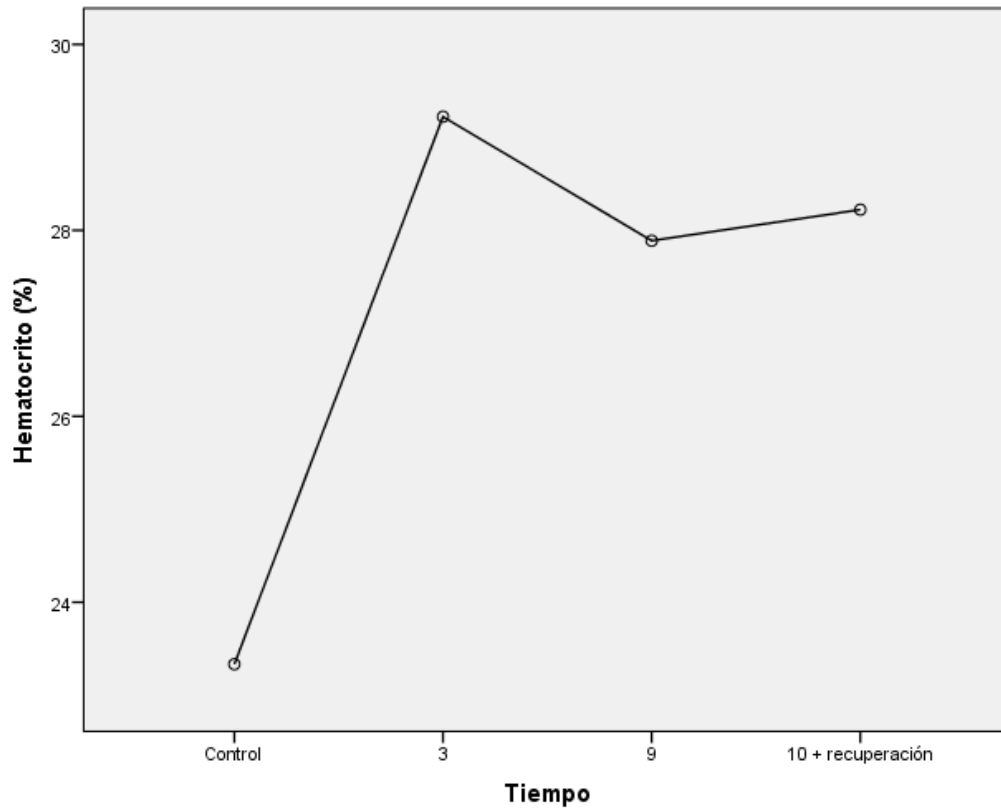
Concentración 120 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
Control	23,33	
9	27,89	27,89
10 + recuperación	28,22	28,22
3		29,22
Sig.	,121	,923

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 6. Niveles de hematocrito (%) de la concentración de 120 ppm o mg/L



El gráfico 6, Los niveles de hematocrito del pez se incrementan a la exposición de la concentración de 120 ppm o mg/L a comparación del grupo control a partir del minuto tres (03) con un 29,22 % que es la diferencia más marcada en cuanto al grupo control con 23,33%.

4.3.2. Análisis de los niveles de hematocrito (%) de la concentración 150 ppm o mg/L

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los niveles de hematocrito (Tabla 16). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 17) resultando que a

los tres (03) minutos y nueve minutos el nivel de hematocrito (%) del pez se eleva considerablemente a comparación del grupo control evidenciándose una diferencia significativa marcada, evidenciando un probable efecto estresante en el pez, consecuentemente en el minuto diez (10) + recuperación los niveles de hematocrito (%) son homogéneos al del grupo control.

Tabla 16. Análisis de varianza de los niveles de hematocrito (%) de la concentración de 150 ppm o mg/L.

Concentración 150 ppm o mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	553,861	3	184,620	22,397	,000
Intra-grupos	263,778	32	8,243		
Total	817,639	35			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 17. Prueba de Tukey de los niveles de hematocrito (%) de la concentración de 150 ppm o mg/L

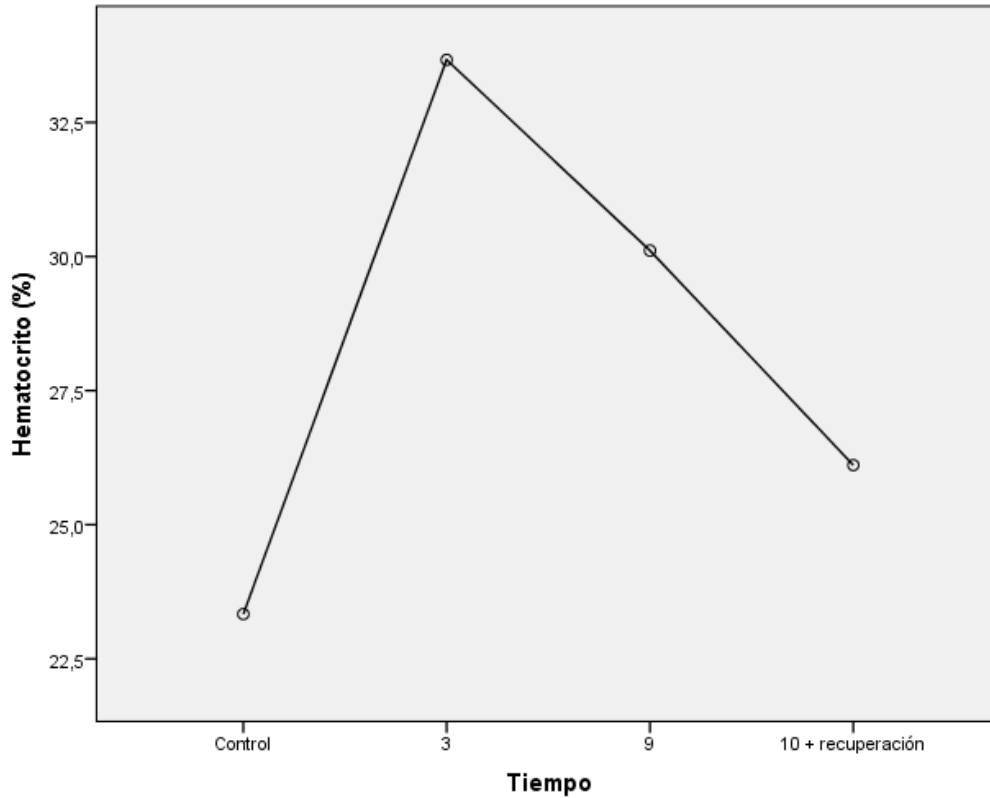
Concentración 150 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
Control	23,33	
10 + recuperación	26,11	
9		30,11
3		33,67
Sig.	,191	,060

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 7. Niveles de hematocrito (%) de la concentración 150 ppm o mg/L



El gráfico 7, Los niveles de hematocrito del pez se incrementan a la exposición de la concentración de 150 ppm o mg/L a comparación del grupo control a partir del minuto tres (03) con un 33,67%, nueve (09) con un 30,67 que es la diferencia más marcada en cuanto al grupo control con 23,33% y siendo homogéneo a este el tiempo de 10 minutos + recuperación con 26,11%.

4.3.3. Análisis de los niveles de hematocrito (%) de la concentración de 180 ppm o mg/L

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los niveles de hematocrito (Tabla 18). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 19) resultando que

los niveles de hematocrito (%) de todos los tiempos de exposición son homogéneos al del grupo control.

Tabla 18. Análisis de varianza de los niveles de hematocrito (%) de la concentración de 180 ppm o mg/L.

Concentración 180 ppm o mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	195,417	3	65,139	2,319	,094
Intra-grupos	898,889	32	28,090		
Total	1094,306	35			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 19. Prueba de Tukey de los niveles de hematocrito (%) de la concentración de 180 ppm o mg/L

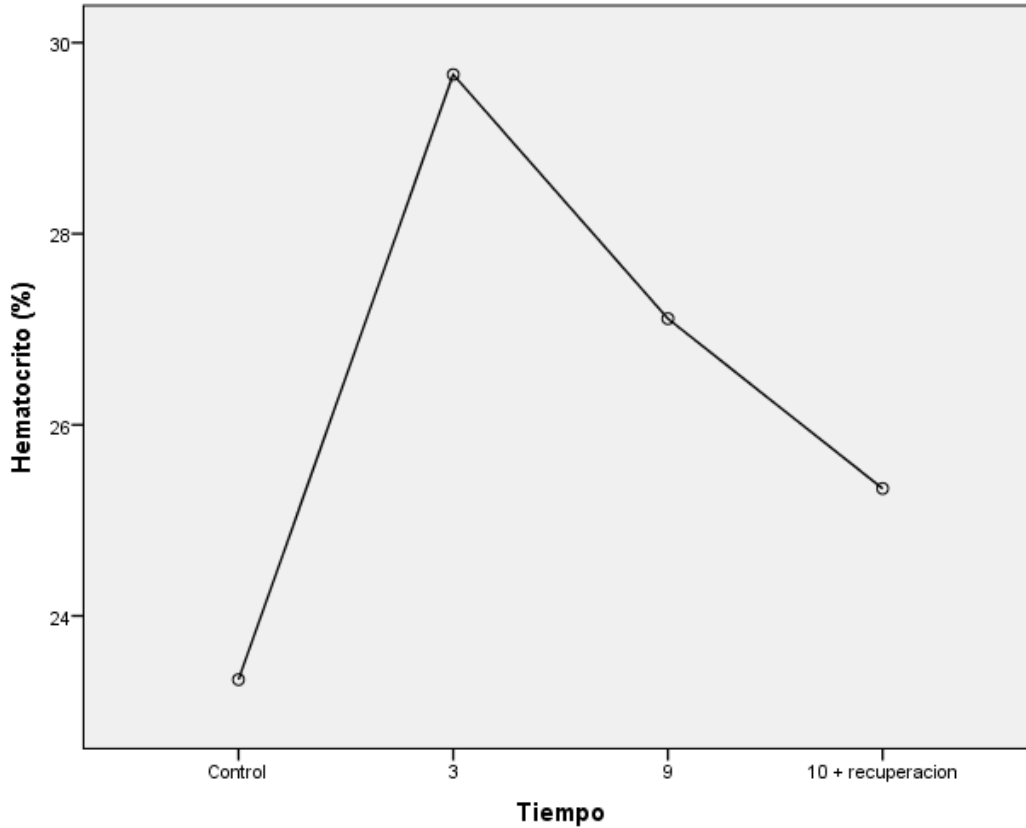
Concentración 180 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto para alfa = 0.05
	1
Control	23,33
10 + recuperación	25,33
9	27,11
3	29,67
Sig.	,073

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 8. Niveles de hematocrito (%) de la concentración de 180 ppm o mg/L



El gráfico 8, Los niveles de hematocrito del pez se mantienen homogéneos en cuanto al grupo control con 23,33 % y siendo homogéneo con todos los tiempos.

4.3.4. Análisis de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 120 ppm o mg/L.

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los niveles de glucosa (Tabla 19). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 20) resultando que los niveles de glucosa (mg/dL) a los tres minutos de exposición se mantiene

homogéneo al del grupo control; al igual que a los diez(10) + recuperación, evidenciándose un probable efecto de estrés en el pez a los nueve (09) minutos de exposición, siendo este resultado la diferencia de acuerdo al control.

Tabla 20. Análisis de varianza de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 120 ppm o mg/L.

Concentración 120 ppm o mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	11980,200	3	3993,400	6,703	,004
Intra-grupos	9532,000	16	595,750		
Total	21512,200	19			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 21. Prueba de Tukey de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 120 ppm o mg/L.

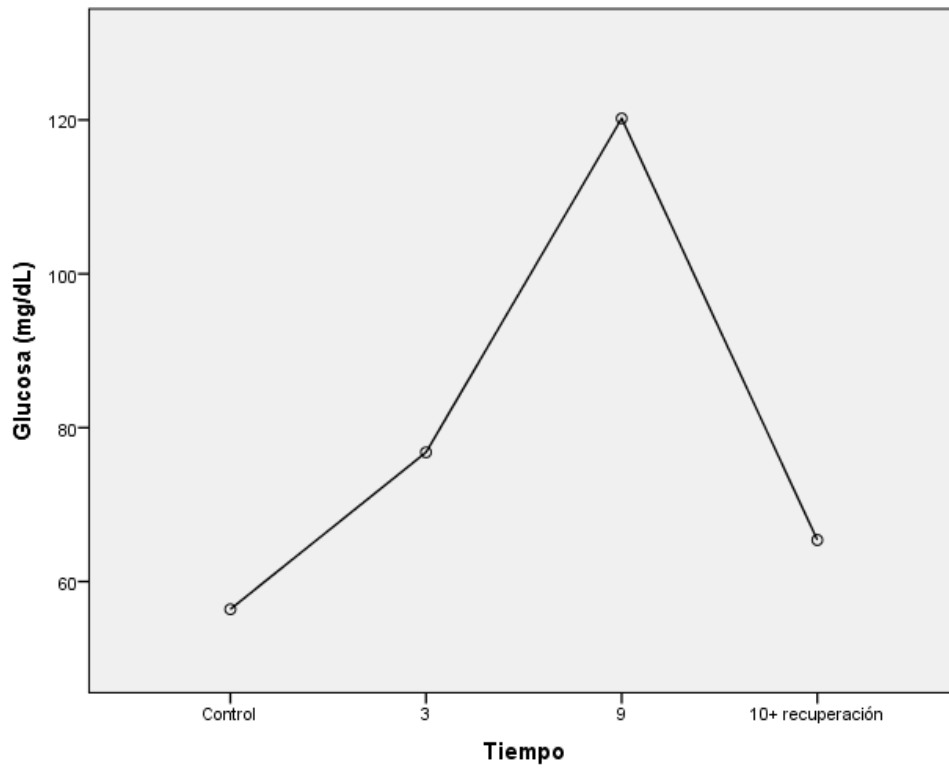
Concentración 120 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
Control	56,40	
10+ recuperación	65,40	
3	76,80	76,80
9		120,20
Sig.	,563	,055

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 9. Niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 120 ppm o mg/L



El gráfico 9, Los niveles de glucosa del pez se incrementan a la exposición de la concentración de 120 ppm o mg/L a comparación del grupo control, a partir del minuto tres (03) con un 76,80 mg/dL y nueve (09) con un 120, 20 mg/dL que es la diferencia más marcada en cuanto al grupo control con 56,40 mg/dL y siendo homogéneo a este el tiempo de 10 minutos + recuperación con 65,40 mg/dL.

4.3.5. Análisis de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 150 ppm o mg/L.

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los niveles de glucosa (Tabla 21). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 22) resultando que los niveles de glucosa (mg/dL) son homogéneos en cuanto al grupo control, que demuestra relativamente que el efecto de la solución anestésica en el pez es similar en todos los tiempos de exposición.

Tabla 22. Análisis de varianza de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 150 ppm o mg/L.

Concentración 150 ppm o mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	781,350	3	260,450	1,036	,403
Intra-grupos	4021,200	16	251,325		
Total	4802,550	19			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 23. Prueba de Tukey de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 150 ppm o mg/L.

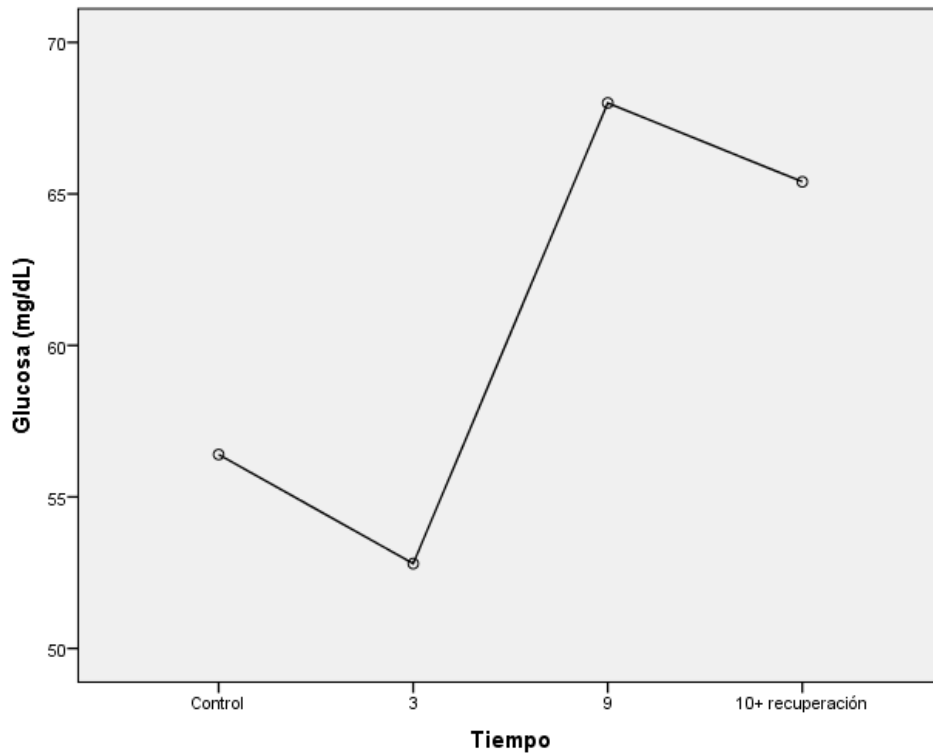
Concentración 150 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto para alfa = 0.05
	1
3	52,80
Control	56,40
10+ recuperación	65,40
9	68,00
Sig.	,451

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 10. Niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 150 ppm o mg/L



El gráfico 10, Los niveles de glucosa del pez se mantienen homogéneos, de acuerdo a la prueba estadística de Tukey, de la concentración de 150 ppm o mg/L conjuntamente del grupo control, el grupo control con 56,40 mg/dL, del minuto tres (03) con un 52,80 mg/dL y nueve (09) con un 68,00 10 minutos + recuperación con 65,40 mg/dL.

4.3.6. Análisis de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 180 ppm o mg/L

Para este bioensayo se comparó entre los tres tiempos de la misma concentración, se realizó el análisis de varianza, evidenciándose diferencia significativa entre los niveles de glucosa (Tabla 23). Para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 24) resultando que los niveles de glucosa (mg/dL) son homogéneos en cuanto al grupo control, que demuestra relativamente que el efecto de la solución anestésica en el pez es similar en todos los tiempos de exposición.

Tabla 24. Análisis de varianza de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 180 ppm o mg/L.

Concentración 180 ppm o mg/L

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	12864,150	3	4288,050	3,846	,030
Intra-grupos	17840,400	16	1115,025		
Total	30704,550	19			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla 25. Prueba de Tukey de los niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración de 180 ppm o mg/L.

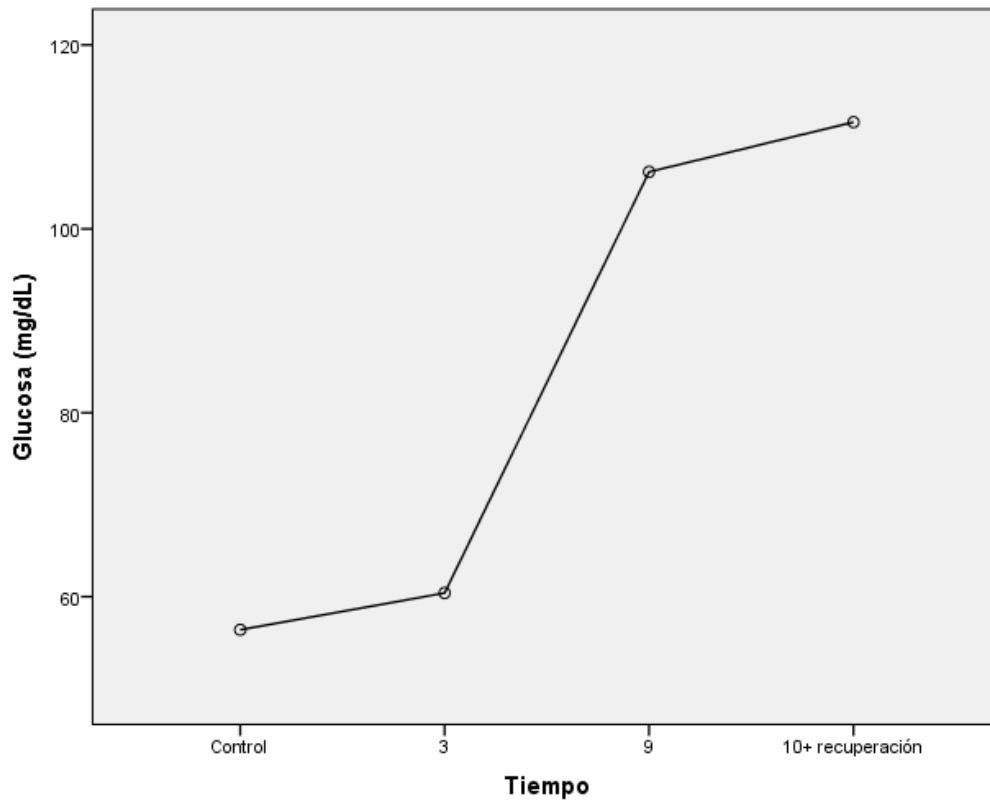
Concentración 180 ppm o mg/L

Prueba de Tukey

Tiempo	Subconjunto
	para alfa = 0.05
	1
Control	56,40
3	60,40
9	106,20
10+ recuperación	111,60
Sig.	,080

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO 11. Niveles de glucosa (mg/dL) de la concentración 180 ppm o mg/L



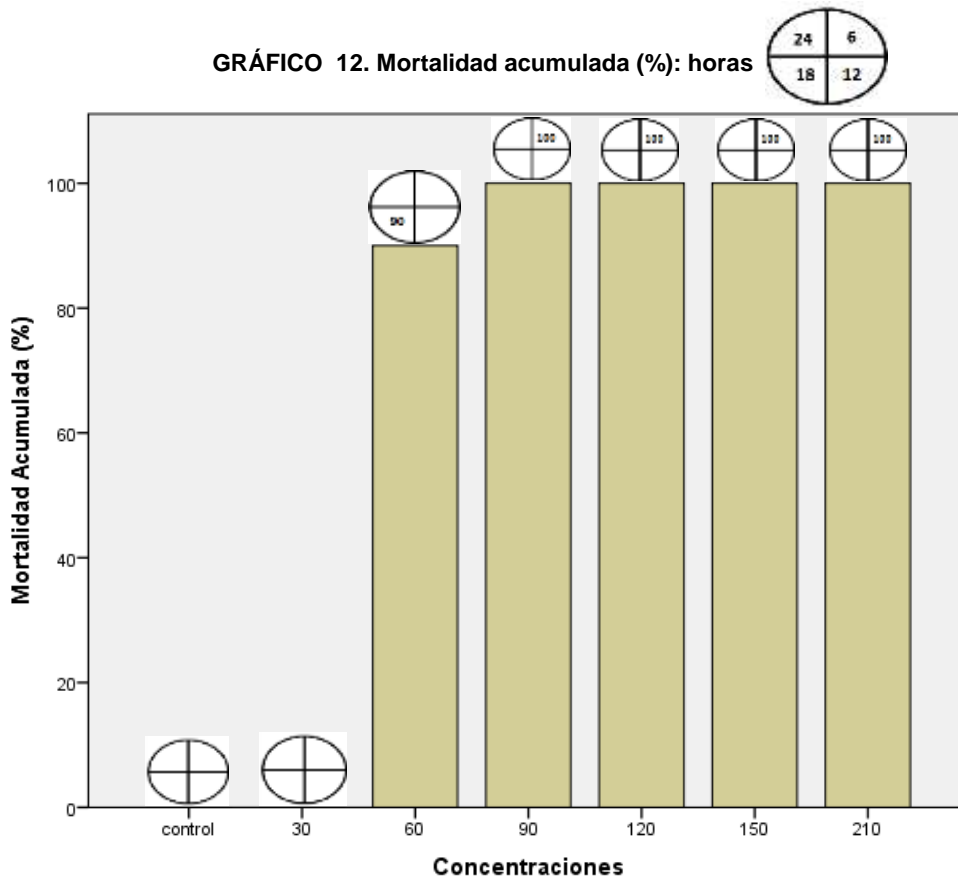
El gráfico 11, Los niveles de glucosa del pez se mantienen homogéneos de acuerdo a la prueba estadística de Tukey, de la concentración de 180 ppm o mg/L a conjuntamente del grupo control, el grupo control con 56,40 mg/dL, del minuto tres (03) con un 60,40 mg/dL y nueve (09) con un 106,20 y 10 minutos + recuperación con 111,60 mg/dL.

4.4. Determinación de la concentración mínima tóxica de los cristales de mentol como anestésico en juveniles de *Colossoma macropomum*, (CUVIER 1818) “Gamitana”

Para este bioensayo se estableció seis (06) concentraciones con tres repeticiones, tomada desde una mínima concentración hasta una concentración elevada, siendo estas 30, 60, 90, 120, 150 y 210 ppm o mg/L. Se evaluó este bioensayo en 24 horas, separando este periodo de tiempo en cuatro (04) cuadrantes de evaluación que son 6, 12, 18, y 24 horas.

La determinación de la muerte del organismos expuesto a la solución anestésica se determinó, cuando el pez era puesto en recuperación y si este no se recuperaba en 15 minutos, se daba por muerto al organismo, y planteando que en ese periodo de tiempo la dosis de la solución anestésica ya era letal.

GRÁFICO 12. Mortalidad acumulada (%): horas



El gráfico 12, La mortalidad ocurrida en los cuadrantes de tiempo, observándose la mortalidad de un 90 % a las 18 horas de exposición de la concentración de 60 ppm o mg/L, mostrando que esta concentración es toxica en ese lapsus de tiempo, seguida de un 100 % de mortalidad por parte de la concentración de 90 ppm o mg/L a las 4 horas de exposición, igualmente la concentración de 120 ppm o mg/L alcanzo un 100 % de mortalidad en el periodo de 2 horas de exposición, al igual que la concentración de 150 ppm o mg/L. Para finalmente la concentración de 210 ppm o mg/L alcance la mortalidad de los organismos a la hora de exposición.

V. DISCUSIÓN

5.1. Concentración ideal

Las concentraciones ideales de acuerdo a los tiempos obtenidos fueron de 120, 150 y 180 ppm o mg/L para juveniles de gamitana, que coincide con lo reportado por **Façanha & Gomes, (2005)**, que trabajaron con cristales de mentol como anestésico en juveniles de gamitana (*Colossoma macropum*), resultándoles ideal las concentraciones de entre 100 y 150 ppm. También se coincide con lo reportado por **Simões, L.C. & Gomes (2009)**, que trabajaron con cristales de mentol como anestésico en juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*), resultándoles 150 y 200 ppm las concentraciones ideales para esta especie.

Al hacer la comparación que existe entre los cristales de mentol y el eugenol, que coincidentemente también es originario de un aceite esencial, el aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* y otros anestésicos químicos se encuentra reportes como el de **Pérez et al. (2010)**, que tras la utilización de eugenol en ejemplares de paco (*Piaractus mesopotamicus*), obtuvo buenos resultados sin pérdida de organismos, con la concentración de 150 ppm o mg/L, al igual que **Mercy et al. (2013)** que evaluaron el tiempo de inducción en Barbo de línea roja, *Puntius denisonii* con eugenol, obteniendo como mejor concentración la 150 ppm, que coincide con trabajos anteriores con cristales de mentol y con este trabajo de investigación.

También se encuentran **Llanos C. & Scotto C. (2010)**, que evaluaron la eficacia anestésica del eugenol aplicadas a diferentes labores de manipulación en ejemplares de *Xiphophorus helleri*, pez espada, donde obtuvieron que las mejores

concentraciones para trabajar eran de 100 a 125 ppm, valores que se encuentran en el rango del trabajo de investigación realizado.

Otros anestésicos también fueron utilizados en peces así como el MS -222, que lo reporta **Roubach et al (2000)**, quien trabajo con juveniles de sábalo cola roja, *Brycon cephalus*, que obtuvo como mejor resultado para los juveniles de sábalo cola roja, la concentración de 150 ppm que es la misma concentración establecida en el trabajo de investigación como ideal.

Fernandes et al. (2013), reporta que la benzocaína en alevinos pejerrey *Odontesthes bonariensis* es eficaz a concentraciones de 80 a 100 ppm, lo que difieren totalmente del trabajo realizado con cristales de mentol.

5.2. Margen de seguridad

El margen de seguridad obtenido en el trabajo de investigación con cristales de mentol fue de 30 minutos en las concentraciones de 120, 150 y 180 ppm o mg/L, sin muerte de algún organismo, y esto coincide efectivamente con lo reportado por **Façanha & Gomes, (2005)**, **Simões, L.C. & Gomes (2009)**, que trabajaron con juveniles de *Colossoma macropomum*, gamitana y *Oreochromis niloticus*, tilapia con cristales de mentol.

No existen trabajos que reporten el margen de seguridad de otros anestésicos, porque solo son trabajos enfocados en tiempos de inducción y efectos sobre los parámetros hematológicos.

5.3. Efectos sobre los parámetros hematológicos

Los anestésicos actúan en los peces deprimiendo las funciones neurosensoriales, la mayor parte de los anestésicos afecta al sistema nervioso central y actúa primero sobre la corteza cerebral, el tiempo y la concentración inducen efectos que muestran las alteraciones a nivel sanguíneo (**Summerfelt & Smith, 1990**).

Los efectos causados en los parámetros hematológicos en los juveniles de gamitana, *Colossoma macropomum*, variaron de acuerdo a la concentración.

El hematocrito para gamitanacriada en cautiverio según **Tavares – Dias et al & Sandrin, 1998a**, oscila entre 22,2 % y 41, 6 % en condiciones normales. La concentraciones de 120 ppm o mg/L, mostro una diferencia significativa entre el control que tenía 23,33% y los tres de minutos de exposición que alcanzo 29,22%. Resultados similares se obtuvieron en la concentración de 150 ppm o mg/L, Con la diferencia significativa observada desde el minuto tres con 33,67%, seguido del minuto nueve con 30, 11%, disminuyendo hasta ponerse homogéneo al grupo control los 10 + recuperación con 26,11%. La ultima concentración de 180 ppm o mg/L se diferenció completamente de estas otras evaluaciones ya que todos los resultados obtenidos tras este bioensayo fueron homogéneos. Coincidentemente.

Estos tres bioensayos según la bibliografía muestran niveles de hematocrito normales.

Simões, L.C. & Gomes (2009), reporto que no hubo diferencia alguna en los niveles de hematocrito de los juveniles de tilapia, las cuales se trabajaron con la concentración de 250 mg/L, de esta manera también se afirma lo dicho por **Morales et al. (2005)**, que los cambios en la respuestas hematológicas de estrés como el hematocrito, normalmente no son observadas en exposiciones agudas, siendo más representativo en exposiciones crónicas.

La glucosa es un buen indicador de estrés, **Gomes et al. 2005**, La glucosa plasmática es un parámetro alternativo para evaluar la magnitud de la respuesta, teniendo la ventaja de la facilidad de determinación y que la faja de elevación es estrecha, incrementándose solo hasta 2 veces más. (**Pottinger&Carrick, 1999**).

En la concentración de 120 ppm o mg/L un probable efecto estresante se evidencio significativamente al minuto nueve de exposición con 120 ppm, esta diferencia se vio marcada por el aumento en los niveles de glucosa o también llamado hiperglucemia (120 mg/dL) que a comparación del control que tenía 56,40 mg/dL. Hiperglucemia se denominan como el aumento de glucosa por encima de los rangos basales o normales, que a su vez resulta oneroso para el organismo, que para disminuir el costo energético aumenta la resistencia temporaria de los tejidos periféricos a la insulina, reduciendo la utilización total de la glucosa a la vez que aumenta la lipólisis generando más glucosa (**Champe & Harvey,1997**).

En las concentraciones de 150 y 180 ppm o mg/L los resultados se mantuvieron homogéneos en cuanto al grupo control (56,40 mg/dL), por lo que no provoco en

el organismo un probable efecto estresante, pero los resultados en los tiempos se diferenciaron en cuanto al control, notándose hiperglucemia en la concentración de 180 ppm. Sin embargo en la concentración 150 ppm a los tres minutos de exposición se dio una hipoglucemia o también denominado disminución de glucosa en cuanto a los rangos basales o normales, con un 52,80 mg/dL , diferenciándose del grupo control (56,40 mg/dL), evidenciándose una diferencia con lo trabajado por **Simões, L.C. & Gomes (2009)**, quien reporto diferencia significativa en la glucosa en cuanto al control de su trabajo de investigación, lo cual lo realizo con 250 ppm al igual que **Roubach et al. (2010)**, quien trabajo con juveniles de sábalo cola roja e hizo análisis de glucosa, y resulto que afirmaron que los organismos habían sufrido efectos estresantes a concentraciones de 250 ppm y 300 ppm.

5.4. Concentración mínima tóxica en 24 horas

La dosis letal media establecida para los cristales de mentol como anestésico fue la de 60 ppm o mg/L, quien a las 18 horas de exposición acumulo un noventa (90%) porciento de mortalidad, afirmando y comparando lo dicho por **Marín et al. (2012)**, que reporto la dosis letal media(CL50), del eugenol en 96 horas con paco(*Piaractus brachypomus*), con la concentración de 18 ppm acumulando el 60% de muertos a las 72 horas, y obtuvo un 100% de muertes a las 24 horas con concentraciones mayores a 25 ppm, haciendo mención de estos trabajos porque ambos anestésicos son provenientes de aceites esenciales de plantas.

VI. CONCLUSIONES

- La concentración con tiempo de inducción más rápida fue de 250 ppm o mg/L, y al mismo tiempo fue lamás tardía en recuperación.
- Las concentraciones 120, 150 y 180 ppm o mg/L resultaron eficaces en cuanto a tiempos de inducción y recuperación.
- Las concentraciones 120, 150 y 180 ppm o mg/L poseen un amplio margen de seguridad de 30 minutos.
- No se mostró variación significativa en cuanto a los niveles de hematocrito con las concentraciones trabajadas.
- Las concentraciones 150 y 180 ppm o mg/L no causan un efecto estresante en cuanto a niveles de glucosa.
- Las concentración mínima tóxica actúa a partir de las 18 horas de exposición, siendo este 60 ppm o mg/L

VII. RECOMENDACIONES

- Categorizar a los cristales de mentol como anestésico.
- Realizar pruebas de eco toxicología para conocer el tiempo de permanencia del anestésico en el organismo del animal.
- Realizar los bioensayos con 2 especies diferentes, a fin de comparar la susceptibilidad de las especies al anestésico.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman PA, JD Morgan, Iwama GK. 2005. Anesthetics. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada.

Champe, P.; Harvey, R. 1997. Bioquímica Ilustrada. 2 ed. Artes Médicas, 445 p.

CUNHA, M.A.2007. Tempo de indução e recuperação anestésica em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas. 2007.63f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

EMPRESA ANCOFARMA SA.

European Medicines Agency. 2007. Guideline on repeated dose toxicity. [Internet], [30 febrero 2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003103.pdf

Façanha, M.F.; Gomes, L.C. A (2005). Eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazônica*, v.35, p.71-75.

Fernandes et al (2013). Benzocaine and clove oil as anesthetics for pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) fingerlings. FAEM, Universidade Federal de Pelotas.Brasil

FLORINDO L., C. LEITE, A. KALININ, S. REID, W. MILSOM Y F. RANTIN. 2006. The role of branchial and orobranchial O₂ chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. *Journal of Experimental Biology*. 209: 1709-1715.

García. A, de la Gándara. F & Raja. T 2002, Utilización del aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* L.(Merr. & Perry), como anestésico eficaz y económico para labores rutinarias de manipulación de peces marinos cultivados

GONZÁLEZ J.A. & B. HEREDIA. 1998. Cultivo de la cachama (*Colossoma macropomum*). Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Guárico. Maracay, Venezuela, p 134.

Goulding, P. 1980. The Nature of Fish Migration in the Rio Madeira basin. *The Fishes and the Forest*. University of California. 40-41 pp.

Hoskonen, P., Pirhonen, J., 2006. Effects of repeated handling, with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquac. Res. 37, 409–415.

Llanos C, et al. (2012). Determinación de la concentración letal media (cl50) y Eficacia del eugenol como anestésico sobre *Xiphophorus Helleri* (heckel, 1848) (cyprinodontiformes: poecilidae)

Llanos C, Scotto C. 2010. Eugenol como anestésico para labores de manipulaciónde *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poecilidae). The Biologist (Lima) 8: 179-188.

Marín. G, Torres. A, Naranjo. L, Chacón. R, Rondón. A. 2012, Concentración letal 50 a 96 horas de eugenol en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)

Mercy, A. et al. (2013). Use of tricaine methanesulfonate (MS-222) to induce anaesthesia in *Puntius denisonii* (Day, 1865) (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae), a threatened barb of the Western Ghats, India.

Millán. L, Torres. A, Marín. J, Ramírez. W, Vásquez. M, Rondón. I. 2012, Concentración anestésica del eugenol en peces escalares (*Pterophyllum scalare*).

Morales-Ventura J, M Hernandez-Martinez, M Ramirez-Flores. 2005. Empleo de la esencia de clavo y el 2-Fenoxietanol como anestésicos en el pescado blanco (*Chirostoma estor*). Memorias XVIII Congreso Nacional de Zoología, Monterrey Nuevo Leon, Mexico, Pp 158.

Moyano,A.(1997) Estudio descriptivo de tres productos anestésicos en Salmón del Atlántico (*Salmo Salar*), tesis para optar grado de veterinaria. Chile.

OIE [Organización Mundial de Sanidad Animal]. 2011. Utilización de animales en la investigación y educación. [Internet], [30 febrero 2012]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.7.8.htm#article_1.7.8.3

Olsen, Y. A., I. E. Einarsdottir, K. J. Nilssen. 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, 134: 155-168

Perez. R, Santos. L , Eloy. A, Vieira. P, Solis, L. 2010, aceite de clavo como anestésico para el pez pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Pottinger, T, Carrick, T. 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress responsiveness in female rainbow trout. *Aquaculture*. 175: 351-363.

Ross L, Ross B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3° ed. Oxford, UK: Blackwell. 222 p

Roubach et al (2000), Safest level of tricaina methanesulfonate (MS 222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã, *Brycon cephalus*

Ruppert, E.E.; Barnes, R.D. 1994. Zoologia dos Invertebrados. 6.Ed. Ed. Roca, São Paulo. 1056pp.

Santamaría, Y. Palacios, Cruz-Casalla, P. 2008. Eficiencia anésteica de 2-fenoxietanol, benzocaina, quinaldina y metasulfonato de tricaina en alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus Brachypomus*)

Simões, L&Gomes. C. 2009, Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)

Stoskopf, M. 1993. Anaesthesia. In: BROWN, L. (Ed).Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine. London, UK: Pergamon Veterinary Handbook Series, p.161-168.

Summerfelt, R. C. & L. S. Smith. 1990. Anesthesia, surgery and related techniques. En: Methods for Fish Biology. C. B. Schreck y P. B. Moyle (eds.): 213-272. Am. Fish. Soc. Bethesda, EE UU.

Tavares-DiasM., Sandrin E., Sandrin A. 1998. Característica hematológica de Tambaquí (*Colossoma macropomum*) Cuvier, 1818. (Osteichthyes: Charcidae) en Sistema de Monocultivo Intensivo. I. Serie eritrocitaria. Rev. Brasil. Biol. 58: 197-202.

Tavares-Dias M., Schalch S.H.C., Martins M.L., Silva E.D., Moraes F.R., Perecin D. 1999. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária - Variáveis do *Leporinus macrocephalus* (Garavelo e Bristski, 1988) e *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg,1887) em policultivo intensivo. Acta Sci. Biol. Sci. (Maringá) 21: 337-342.

IX. ANEXOS

ANEXOS Nro. 1



Foto 1. Centro de Investigación Fernando Alcántara Bocanegra. IIAP



Foto 3. Tanques de losetas para aclimatación de los peces



Foto 4. Tanques de aclimatación



Foto 5: Cristales de mentol



Foto 6: Toma de muestras de sangre



Foto 7. Equipo de medición de glucosa



Foto 8. Equipo para determinar hematocritos



Foto 9: Fase experimental de la concentración mínima tóxica

ANEXO Nro. 2: Estadios del anestésico.

La concentración que provoco un efecto más rápido en los peces, fue la concentración de 210 ppm.

Pérdida de reacción a los estímulos

Tabla . Análisis de varianza (Perdida de reacción a los estímulos)

Pérdida de reacción a los estímulos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4135,808	5	827,162	175,950	,000
Intra-grupos	56,413	12	4,701		
Total	4192,222	17			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias

Tabla . Prueba de Tukey (Perdida de reacción a los estímulos)

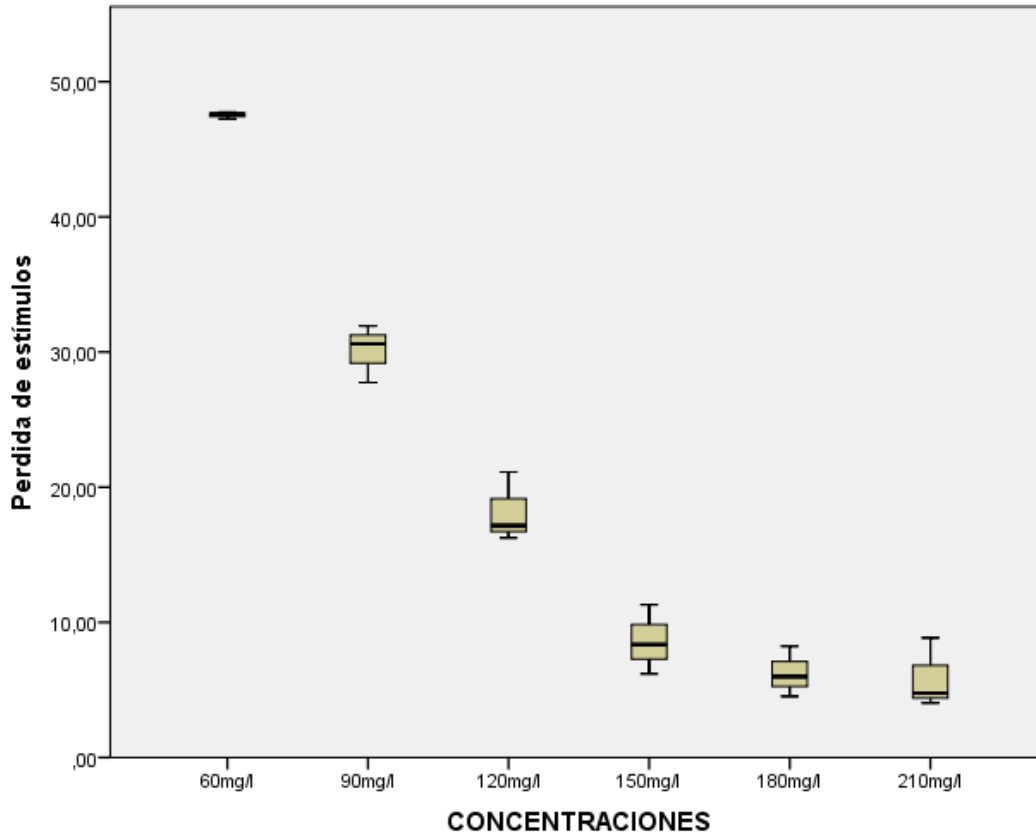
Pérdida de reacción a los estímulos

Prueba de Tukey 5% de probabilidad

Concentraciones	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
210 mg/l	5,8867			
180 mg/l	6,2500			
150 mg/l	8,6200			
120 mg/l		18,1833		
90 mg/l			30,0900	
60 mg/l				47,5267
Sig.	,646	1,000	1,000	1,000

Leyenda: Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO: Pérdida de reacción a los estímulos



El gráfico 1. muestra claramente el tiempo de inducción más rápido para que el pez pierda la reacción a los estímulos fue para la concentración de 210 ppm o mg/L con un tiempo promedio de 5,89 s.

Tabla: Análisis de varianza (Pérdida parcial del equilibrio)

Pérdida parcial del equilibrio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	46738,401	5	9347,680	593,566	,000
Intra-grupos	188,980	12	15,748		
Total	46927,381	17			

Legenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla. Prueba de Tukey (Pérdida parcial del equilibrio)

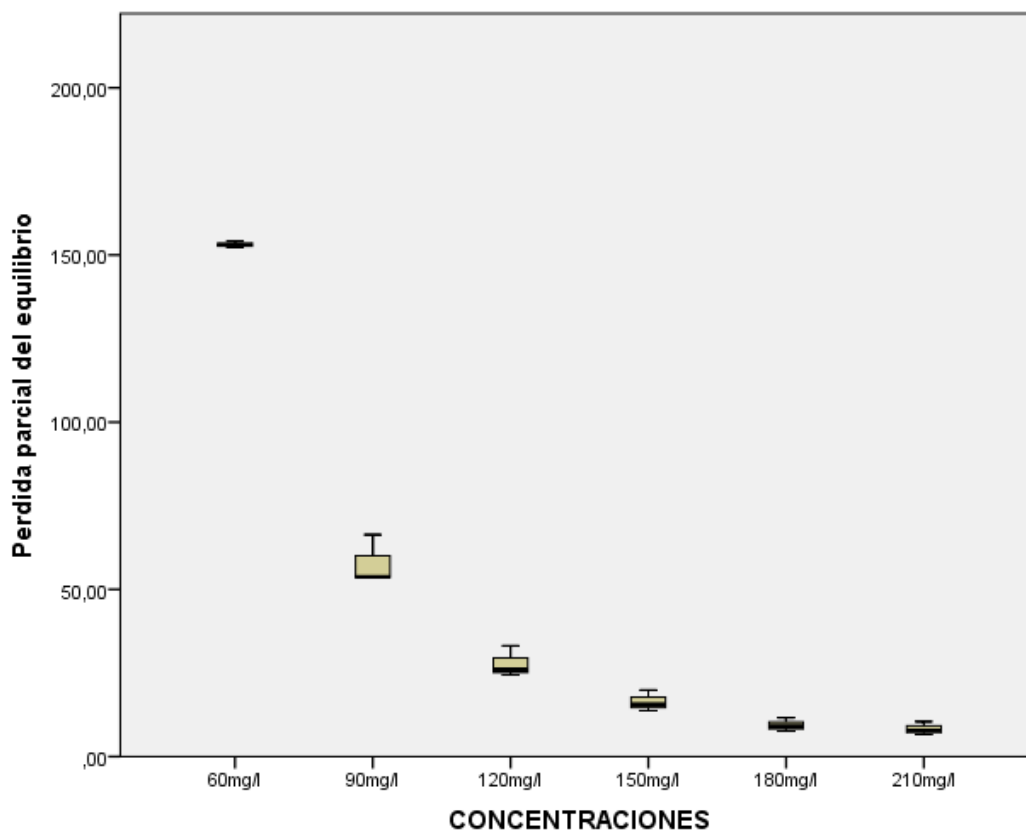
Pérdida parcial del equilibrio

Prueba de Tukey

Concentraciones	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
210 mg/l	8,3267			
180 mg/l	9,4100			
150 mg/l	16,4267			
120 mg/l		27,8233		
90 mg/l			57,8767	
60 mg/l				153,1300
Sig.	,199	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO: Pérdida parcial del equilibrio



El gráfico 2, muestra claramente el tiempo de inducción más rápido para que el pez pierda parcialmente el equilibrio que fue para la concentración de 210 ppm o mg/L con un tiempo promedio de 8,33 s.

Pérdida total del equilibrio

Tabla: Análisis de varianza (Pérdida total del equilibrio)

Pérdida total de equilibrio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	246223,651	5	49244,730	1665,872	,000
Intra-grupos	354,731	12	29,561		
Total	246578,382	17			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla: Prueba de Tukey (Pérdida total del equilibrio)

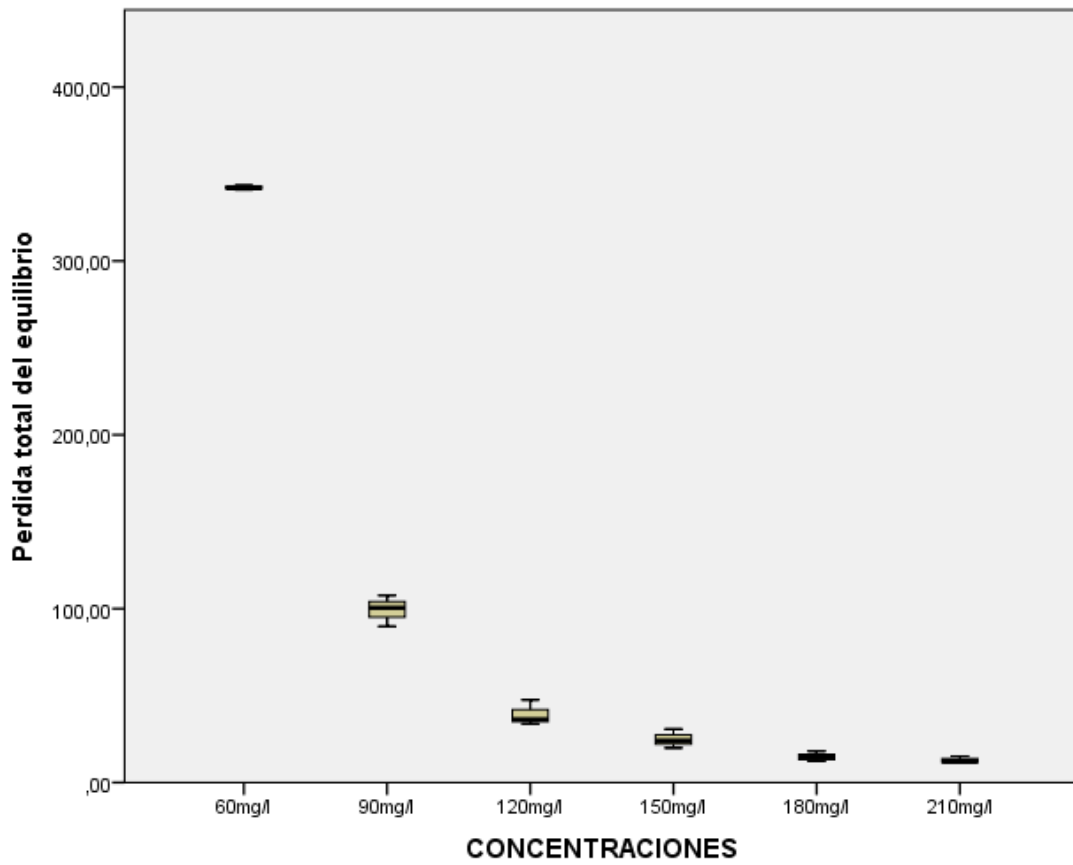
Pérdida total del equilibrio

Prueba de Tukey

Concentraciones	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
210 mg/l	12,8467			
180 mg/l	14,9200			
150 mg/l	24,9167	24,9167		
120 mg/l		39,2600		
90 mg/l			99,3233	
60 mg/l				342,1800
Sig.	,142	,062	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO: Pérdida total de equilibrio



El gráfico 3, muestra claramente el tiempo de inducción más rápido para que el pez pierda totalmente el equilibrio que fue para la concentración de 210 ppm o mg/L con un tiempo promedio de 12,85 s.

Reducción parcial del movimiento opercular

Tabla: Análisis de varianza (Reducción parcial del movimiento opercular)

Reducción parcial del movimiento opercular

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	637249,950	5	127449,990	687,490	,000
Intra-grupos	2224,613	12	185,384		
Total	639474,563	17			

Leyenda: gl= Grados de libertad; F= F calculado; Sig: Significancia al 0.05 % de Probabilidad

La significancia (Sig.) al resultar menor o igual a cero (0), implica que si existe diferencia significativa entre las medias.

Tabla: Prueba de Tukey (Reducción parcial del movimiento opercular)

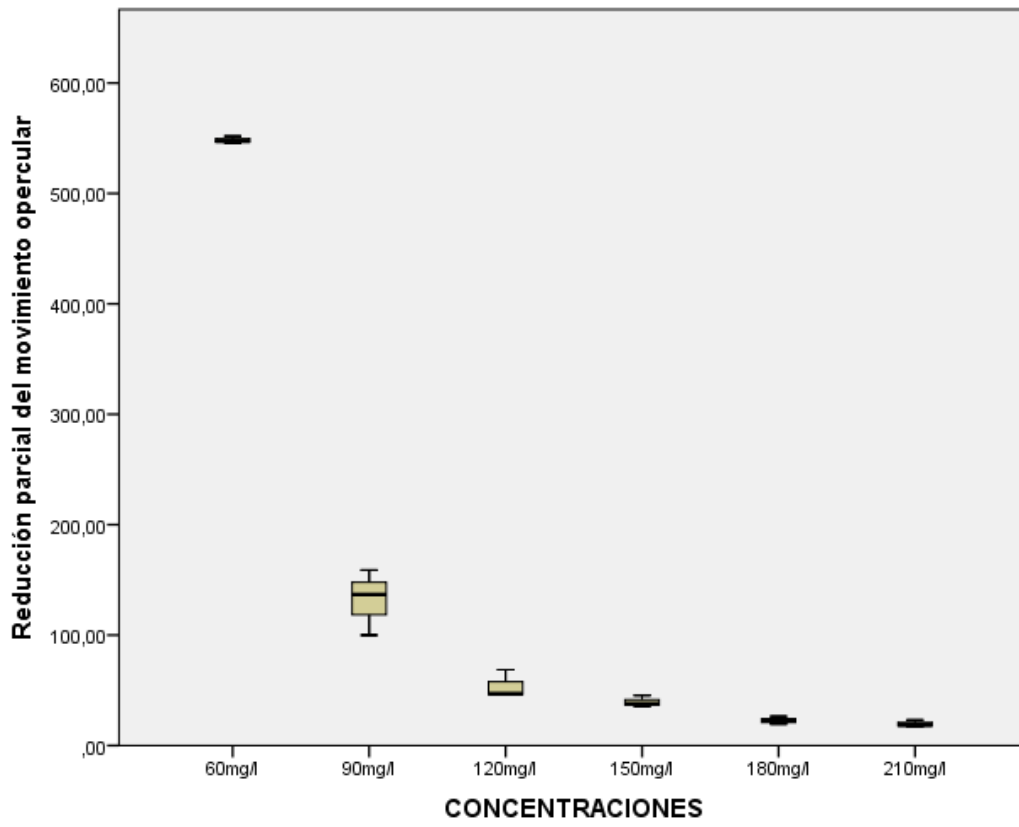
Reducción parcial del movimiento opercular

Prueba de Tukey

Concentraciones	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
210 mg/l	19,6567		
180 mg/l	22,7167		
150 mg/l	39,5933		
120 mg/l	53,8167		
90 mg/l		131,9533	
60 mg/l			548,2900
Sig.	,080	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

GRÁFICO: Reducción parcial del movimiento opercular



El gráfico 4, muestra claramente el tiempo de inducción más rápido para que el pez reduce parcialmente su movimiento opercular que fue para la concentración de 210 ppm o mg/L con un tiempo promedio de 19,66 s.