

ACEITE DE CLAVO COMO ANESTÉSICO PARA EL PEZ PACU (*PIARACTUS MESOPOTAMICUS*)

Clove oil as an anesthetic for pacu fish (*piaractus mesopotamicus*)

Paula Adriane Perez Ribeiro, Leandro Santos Costa, Ângelo Augusto Eloy, Priscila Vieira e Rosa, Luis David Solis Murgas*.

Setor de Fisiologia e Farmacologia, Universidad Federal de Lavras, Lavras-MG, CEP: 37200-000, Brasil.

***Autor de referencia:** Luis David Solis Murgas. Telefax: 00 55 35 38291728. Email: ismurgas@ufla.br

RESUMEN

Con el propósito de minimizar el daño causado a los peces por el uso de sustancias anestésicas, se ha evaluado, en este trabajo, la concentración más adecuada de aceite de clavo como anestésico para el pez pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fueron utilizados 40 peces, con peso promedio de 716,18 g. Los tratamientos fueron compuestos de soluciones con diferentes concentraciones de aceite de clavo, 30, 60, 90, 120 y 150 mg/L. Fueron utilizados dos acuarios de vidrio: uno con 20 litros de agua con la solución anestésica para cada tratamiento y otro con 20 litros de agua limpia, para el regreso de los animales de la condición de sedación. Se observaron de forma individual: el tiempo hasta llegar a la anestesia profunda y el tiempo de recuperación de la anestesia profunda. El diseño experimental fue completamente aleatorizado con cinco tratamientos (concentraciones de aceite de clavo) y ocho repeticiones (peces). Los tiempos hasta anestesia profunda e hasta la recuperación total de los peces fueron evaluados por regresión, con 5% de significancia. Se observó un comportamiento lineal de los tiempos hasta la anestesia profunda y hasta la recuperación total de los peces a concentraciones crecientes de aceite de clavo. 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.

Palabras clave: Anestesia, Concentración, Manipulación, Peces, aceite de clavo.

ABSTRACT

In order to minimize damage to fish caused by the use of anesthetic substances, this study was to evaluate the concentration of clove oil as an anesthetic most appropriate for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A total of

40 fishes, with average weight of 716.18 g. The treatments were: anesthetic procedures with solutions of different concentrations of clove oil, 30, 60, 90, 120 and 150 mg.L⁻¹. We used two glass aquariums: one with 20 liters of water containing the anesthetic solution for each treatment and the other with 20 liters of clean water, the animals return to the condition of sedation. Were observed individually: the time to reach deep anesthesia and recovery time of deep anesthesia. The experimental design was completely randomized design with five treatments (concentrations of clove oil) and eight replicates (individuals). The data were submitted to regression, with 5% significance level. There was a linear time of anesthesia and return of fish to increasing concentrations of clove oil, and 30 mg.L⁻¹ is sufficient for the induction of the animals, but higher concentrations of up to 150 mg.L⁻¹, still show inductions faster, without loss in time and conditions for the recovery of fish.

Keywords: Anesthesia, Concentration, Fish, Management, Clove oil.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es actualmente una de las actividades de más rápido crecimiento en el mundo. Entre las diversas especies de peces de Brasil, el pacu (*Piaractus mesopotamicus*) despierita el interés de los productores por la calidad de su carne y la facilidad de reproducción inducida en cautividad (Tavares-Dias *et al.*, 1999a). Es una especie de la familia Characidae, que se encuentra en América del Sur, en los ríos que conforman la cuenca de La Plata y la Cuenca Alta del Río Paraguay.

En el cultivo intensivo de peces, los procedimientos realizados durante el manejo y el muestreo experimental son esenciales. Sin embargo, estos procedimientos pueden causar daños en proporciones variables, que afectan la tomada de muestras, causando una alta mortalidad de peces. Con el fin de reducir el daño a los peces es común el uso de anestésicos para facilitar el manejo. Un factor que limita el uso de estos productos es la falta de conocimiento de las concentraciones y tiempos de exposición adecuados para cada especie. La elección de un anestésico se suele basar en la viabilidad económica y sus consecuencias jurídicas. Sustancias extraídas de vegetales, como el aceite de clavo y mentol, también pueden ser utilizadas en los procedimientos de anestesia, facilitando el manejo de los animales y contribuyendo significativamente en la reducción del estrés y de la mortalidad en la piscicultura.

En peces ocurre estrés, muy a menudo, durante el manejo general y el transporte. El contacto de los animales con el aire atmosférico durante el proceso de la biometría, por ejemplo, es suficiente para desencadenar una reacción de estrés (McGee y Cichra, 2002).

Sustancias anestésicas son utilizadas a menudo para reducir la hiperactividad, una fuente importante de lesiones durante los procedimientos de manejo y/o de transporte (Inoue *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2006). Las consecuencias de los daños relacionados con el estrés en los peces incluyen, entre otras, el aumento de la susceptibilidad a enfermedades infecciosas. La disminución de la movilidad de los animales, mediante el uso de anestésicos, torna posible minimizar las consecuencias indeseables.

Muchos productos químicos pueden ser empleados en el cultivo de peces como anestésicos. Entre ellos se utilizan comúnmente la benzocaína, triclaína metanosulfato (MS 222), quinaldina y 2-fenoxietanol (Mgbenka y Ejiofor, 1998; Ross y Ross, 1999; Hovde y Linley, 2000). Sin embargo, estos anestésicos son difíciles de obtenerse, de coste elevado y con frecuencia presentan baja margen de seguridad, lo que puede conducir a la mortalidad de los animales, si superan la dosis recomendada (Roubach y Gomes, 2001).

El "aceite de clavo" es un producto vegetal, actualmente empleado en medicina y odontología (Lapemm, 2005). Es un compuesto fenólico, resultante de la destilación de las hojas, flores y tallos de la planta de clavo (*Syzygium*

aromaticum). Su principio activo es el eugenol, presente en concentraciones que oscilan entre 70 y 95% de la composición total del aceite esencial de clavo (Mazzafera, 2003).

Los estudios sobre el uso del eugenol como anestésico en la acuicultura, empezaron por la necesidad de encontrar nuevas sustancias eficaces, seguras y de bajo costo (Roubach *et al.*, 2005). Algunas investigaciones indican la efectividad del aceite de clavo como anestésico para otras especies de peces como matrinxã (*Brycon cephalus*) (Inoue *et al.*, 2003), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Roubach *et al.*, 2005), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Vidal *et al.*, 2006), bagre (*Rhamdia quelen*) (Cunha *et al.*, 2006) y robalo (*Centropomus undecimalis*) (Souza-Junior y Alves-Junior, 2006), así como la capacidad de la sustancia en reducir la presión sobre el transporte y manipulación (Inoue *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2006). Sin embargo, Davidson *et al.* (2005) han encontrado que la exposición de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) a dosis insuficiente de eugenol, aumenta los niveles plasmáticos de cortisol, en comparación con animales no tratados con el anestésico.

Biológicamente el mecanismo de la anestesia se basa en la reducción de los procesos metabólicos en los peces, sin causar daños en el crecimiento y reproducción. Desde el punto de vista económico, el uso de una dosis correcta de anestesia es esencial para evitar lesiones o la muerte de los animales por la exposición excesiva al producto (Roubach, 2001). Según Woody *et al.* (2002), las etapas de la anestesia en el pez están asociadas 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 y Ackerman, 1994). Muchos factores pueden influir en la acción de los anestésicos. Entre ellos se destacan la cali-

dad 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; Stehly y Gingerich, 1999). 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 (Hikas *et al.* 1986; Hoskonen y Pirhonen, 2004).

Este estudio objetivó evaluar la concentración más adecuada de aceite de clavo como anestésico para pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad José do Rosario Vellano, en la ciudad de Alfenas, Brasil. Se utilizaron 40 peces, con un peso promedio de $716,18 \pm 89,41$ g, mantenidos en condiciones semejantes, alimentados con dietas con 28% de proteína cruda, en fase de crecimiento de los animales. Los tratamientos investigados fueron compuestos de las soluciones de distintas concentraciones de aceite de clavo, 30, 60, 90, 120 y 150 mg/L.

Para el preparo de las soluciones con diferentes concentraciones del anestésico, ha sido utilizado el aceite de clavo puro, conteniendo solamente el principio activo eugenol. Las cantidades exactas de aceite de clavo para cada tratamiento fueron pesadas en balanza analítica y fueron diluidas en alcohol etílico, a una proporción de 2:1 (dos partes de alcohol y una parte de aceite de clavo). Después de la dilución completa, el aceite de clavo fue mezclado con el agua del acuario.

El procedimiento para la anestesia de los peces se llevó a cabo en acuarios de vidrio, con capacidad de 30 L. Fueron utilizados en cada

tratamiento, dos acuarios de vidrio: uno con 20 L de agua con la solución anestésica para cada tratamiento y el otro con 20 L de agua limpia, para el regreso de los animales de la anestesia. El agua del acuario se intercambiaba al final de cada prueba.

Los protocolos experimentales siguieron la metodología propuesta por Waterstrat (1999) y Gomes (2001). Los peces fueron individualmente expuestos a las concentraciones de aceite de clavo (30, 60, 90, 120 y 150 mg/L). Para determinar la eficacia de las concentraciones del ensayo, se observaron de forma individual el tiempo para llegar a la etapa de anestesia profunda en acuario con la solución anestésica y cronometrado desde el momento de la introducción del pez en este acuario; y el tiempo para regresar del estado de anestesia profunda en el acuario con agua limpia y cronometrado desde el momento de la introducción del pez en este sistema. La etapa de anestesia profunda se confirmó cuando los peces mostraron una pérdida total del tono muscular, pérdida total del equilibrio y ritmo opercular despacio pero regular. Los peces fueron considerados "recuperados" del efecto de la anestesia, al regresar a la normalidad de los movimientos operculares y de la capacidad de natación activa (Gomes, 2001). Los tiempos fueron obtenidos con ayuda de un cronometro digital.

Durante las evaluaciones de cada concentración de anestésico, se controlaron los parámetros limnológicos, como la temperatura y el pH del agua, utilizando termómetro de mercurio Incoterm® y kit comercial Labcon Test®, respectivamente. El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con cinco tratamientos (concentraciones de aceite de clavo) y ocho repeticiones (peces). El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa SISVAR (Ferreira, 2000), donde se sometieron los datos a análisis de variación, considerando la desviación estándar, y los valores promedios de los tratamientos fueron evaluados en ecuaciones de regresión, con el nivel de significación del 5%.

RESULTADOS

Los parámetros limnológicos controlados en los acuarios de experimentación estuvieron dentro del rango considerado óptimo para la especie. Los valores de pH fueron de $7,1 \pm 0,1$ y $7,0 \pm 0,0$, para el acuario con la solución anestésica y aquel con agua limpia, respectivamente, y las temperaturas fueron de $23,8 \pm 1,2$ °C $23,2 \pm 0,7$ °C, para el acuario con la solución anestésica y aquel con agua limpia, respectivamente.

En la Tabla 1 se resumen los valores promedios y desviación estándar, del tiempo de anestesia y del regreso a las condiciones normales

Tabla 1. **Tiempos de anestesia y regreso a las condiciones normales, de los pacus sometidos a diferentes concentraciones de aceite de clavo**

CONCENTRACIONES DE ACEITE DE CLAVO	TIEMPOS (en segundos)	
	ANESTESIA	REGRESO
30 mg/L	51,00 ± 8,86	50,75 ± 4,04
60 mg/L	50,63 ± 8,01	69,63 ± 5,02
90 mg/L	50,00 ± 10,70	113,13 ± 2,08
120 mg/L	28,75 ± 5,63	125,88 ± 2,50
150 mg/L	23,25 ± 1,98	156,50 ± 5,95

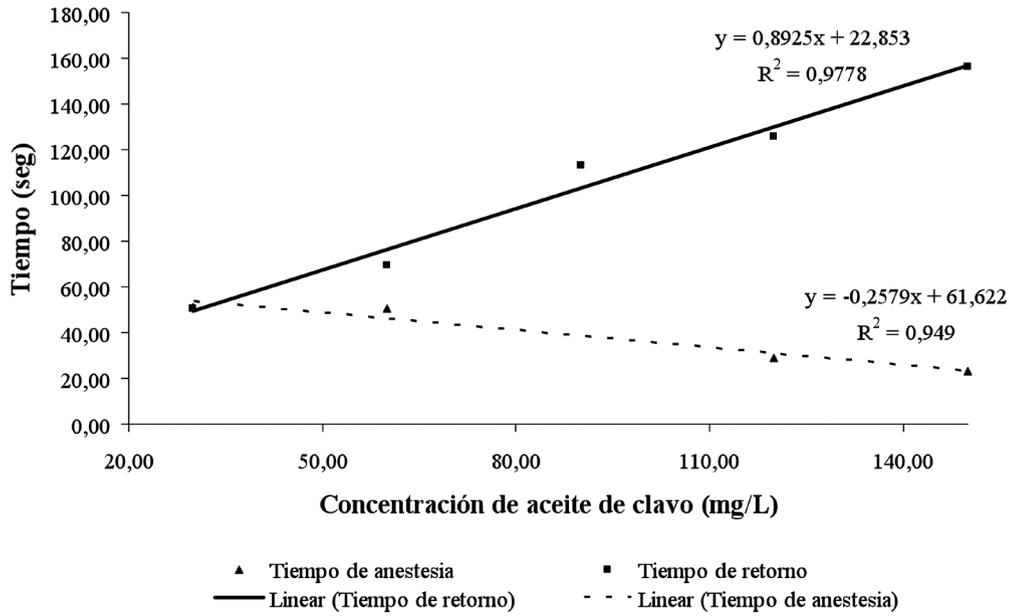


Figura 1. Tiempo de anestesia y de regreso, en segundos, de pacus sometidos a las concentraciones de aceite de clavo de 30, 60, 90, 120 y 150 mg/L.

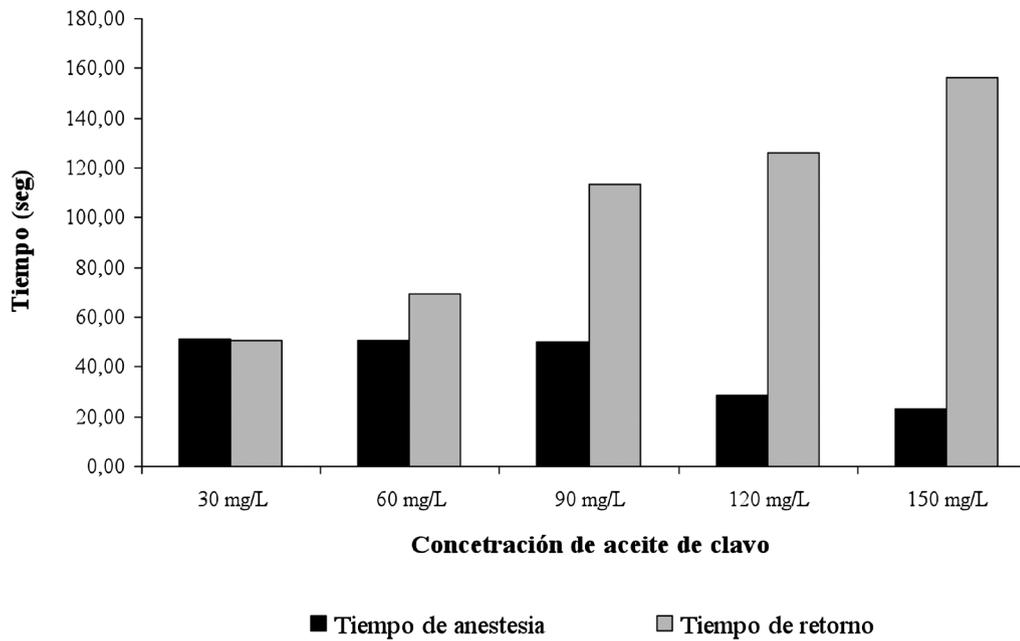


Figura 2. Tiempos de anestesia y regreso de pacus sometidos a diferentes concentraciones de aceite de clavo.

de los pacus expuestos a diferentes concentraciones de aceite de clavo.

Los tiempos de anestesia y regreso de los peces a las condiciones normales muestran un comportamiento lineal, cuando evaluados en concentraciones crecientes de aceite de clavo ($P < 0,05$). La Figura 1 representa el gráfico de estas observaciones.

La Figura 2 muestra el histograma de los tiempos de anestesia y regreso de pacus sometidos a diferentes concentraciones de aceite de clavo.

DISCUSIÓN

Al analizar el comportamiento de los animales expuestos a diferentes concentraciones de aceite de clavo se ha observado que este compuesto es efectivo en el proceso de anestesia en pacus en concentraciones superiores a 90 mg/L, ya que los tiempos necesarios para la anestesia de los peces fueron significativamente menores en las concentraciones de 120 y 150 mg/L, en comparación con otras concentraciones ($P < 0,05$). Aunque no se ha observado mortalidad en este experimento, son importantes más estudios sobre la concentración máxima de anestésico para los peces, ya que el retraso en el regreso de los animales a las condiciones normales puede causar daños al sistema nervioso central.

Las concentraciones de aceite de clavo de 30, 60 y 90 mg/L, son también satisfactorias, aunque el tiempo para inducir la anestesia profunda de los animales sea más elevado. Según Roubach y Gomes (2001), la inducción debe ocurrir entre un y tres minutos y la recuperación no debe exceder cinco minutos. Varios investigadores encontraron una reducción en el tiempo requerido para la anestesia de los peces, cuando se aumenta la concentración del anestésico en el agua (Keene *et al.* 1998; Waterstrat 1999; Inoue *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2006).

Los valores encontrados en este estudio son superiores a aquellos reportados para otras

especies de peces como el pintado (*Pseudoplatystoma* spp.), 50 mg/L (Vidal *et al.*, 2006), por ejemplo. El aumento de las concentraciones de aceite de clavo ha influido en el momento de la inducción a sedación de los pacus. Como otros investigadores han señalado, en este trabajo también se ha constatado que la recuperación de los peces fue influenciada por las diferentes concentraciones del anestésico, aunque en pequeña escala. Los tiempos de inducción observados en algunas concentraciones (120 y 150 mg/L) son adecuados para la inducción anestésica de la especie, de acuerdo a lo que se recomienda como una buena concentración para la anestesia profunda. El uso de aceite de clavo ha facilitado el manejo de los peces, como también lo ha confirmado Vidal *et al.* (2006). Según Inoue *et al.* (2003), las sustancias anestésicas se utilizan para reducir la hiperactividad causada por la manipulación de los animales, por lo tanto, se reduce el riesgo de daño a los peces y para aquellos que conducen el trabajo.

Investigaciones con el uso de anestésicos sintéticos, como tricaina metanosulfato (MS 222), por ejemplo, muestran que las concentraciones necesarias para una anestesia efectiva de los animales son mucho más elevadas que las observadas con anestésicos naturales, como el aceite de clavo. El MS 222 ha sido eficiente como anestésico para matríncha (*Brycon cephalus*), en la concentración mínima de 150 mg/L, con un tiempo aproximado de inducción 122 segundos (Roubach *et al.*, 2001), cuando con 50 segundos en promedio, es posible anestesiarse pacus con una concentración cinco veces menos de aceite de clavo (30 mg/L), como observado en este experimento.

Las concentraciones elevadas de anestésicos sintéticos, como el MS 222, tienen margen de seguridad pequeño, es decir, puede representar un riesgo para los peces, ya que su exceso conduce fácilmente a mortalidad (Roubach *et al.*, 2001).

CONCLUSIÓN

El aceite de clavo es eficaz para la anestesia profunda del pacu (*Piaractus mesopotamicus*), en las concentraciones investigadas. La concentración de 30 mg/L es suficiente para la inducción anestésica de los peces, aunque concentraciones más elevadas, hasta 150 mg/L, determinan inducciones aún más rápidas, sin daños en la recuperación de los animales.

BIBLIOGRAFÍA

- CUNHA M.A., COPATTI C.E., GARCIA L.O., FONSECA M.B., FERREIRA F.W., MALDANER G., MOREL A.F., LORO V.L., BALDISSEROTTO B. Níveis de cortisol em jundiás (*Rhamdia Quelen*) expostos ao óleo de cravo (Eugenol) e extrato de *Condalia Buxifolia*. 2006. Resúmenes AQUACIENCIA, Bento Gonçalves, CD-ROM.
- DAVIDSON G.W., DAVIE P.S., YOUNG G., FOWLER R.T. 2005. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUIS. J. World Aquac. Soc. (Baton Rouge) 31: 105-114.
- GOMES L.C. 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. J. World Aquac. Soc. (Baton Rouge) 32 (4): 426-431.
- HIKASA Y., TAKASE K., OGASAWARA T., OGASAWARA S. 1986. Anesthesia and recovery with tricaine methene-sulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. Jap. J. Vet. Sci. (Tokyo) 48: 341-351.
- HOVDA J., LINLEY T.J. 2000. The potential application of hypothermia for anesthesia in adult pacific salmon. North Am. J. Aquac. 62: 67-72.
- INOUE L.A.K.A., SANTOS NETO C., MORAES G. 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). Ciênc. Rur. (Santa Maria) 33(5): 943-947.
- IWANA G., ACKERMAN A. 1994. Anaesthetics. En: Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes, pp.1-5. Eds. Hochachka P.W., Mommsen T.P. Elsevier Science. Amsterdam. 220 pp.
- KEENE J.L., NOAKES D.L.G., MOCCIA R.D., SOTO C.G. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquac. Res. 29: 89-101.
- LAPEMM. Histoquímica do Cravo, 2005. Disponible en: <http://www.lapemm.ufba.br/cravo.htm>>Acesso em: 28 de outubro de 2009.
- MARKING L.L., MEYER F.P. 1985. Are better anaesthetics needed in fisheries? Fish. 10: 2-5.
- MAZZAFERA P. 2003. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. Rev. Bras. Bot. (São Paulo) 26(2): 231-238.
- MCGEE M., ICHRA C. 2005. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FA/FA01900.pdf>>Acesso em: 28 de outubro de 2005.
- MGBENKA B.O., EJIOFOR E.N. 1998. Effects of extracts of dried leaves of *Erythrophleum suaveolens* as anesthetics on clariid catfish. J. Appl. Aquac. 8: 73-80.
- ROSS L.G., ROSS, B. 1999. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Blackwell Science. Oxford. 159 pp.
- ROUBACH R., GOMES L.C., VAL A.L. 2001. Safest level of tricaine methanosulfonate (MSS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã (*Brycon cephalus*). Acta Amaz. 31: 159-163.
- ROUBACH R., GOMES L.C., LOURENÇO J. N. P., FONSECA F.A.L., VAL A.L. 2002. Efficacy of eugenol as anaesthetic for tambaqui Juvenile (*Colossoma macropomum*). En: Tropical Fish: News and Reviews. Eds. Val A.L., Almeida-Val V.M.F., Mckinley D. Intern. Cong. Biol. Fish. (Vancouver), pp. 93-96.

- ROUBACH R., GOMES L.C. 2001. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. Pan. Aqüic. 11: 37-40.
- ROUBACH R., GOMES L.C., FONSECA F.A.L., VAL A.L. 2005. Eugenol as an efficient anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). Aquac. Res. (Oxford) 36(11): 1056-1061.
- SLADY K.K., SWANSON C.R., STOSKOPF M.K., LOOMIS M.R., LEWBART G.A. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachipomus*). Am. J. Vet. Res. 3: 337-342.
- SOUZA JUNIOR V.B., ALVES JUNIOR T.T. 2006. A eficácia do óleo de cravo (eugenol) como anestésico no manejo de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis*, mantidos em cativeiro. Resúmenes AQUACIENCIA 2006. (Bento Gonçalves).CD-ROM.
- TAVARES-DIAS M., SCHALCH S.H.C., MARTINS M.L., SILVA E.D., MORAES F.R., PERECIN D. 1999a. 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.
- TAVARES-DIAS M., TENANI R.A., GIOLI R.D., FAUSTINO C.D. 1999b. Características hematológicas de teleósteos brasileiros - Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) em policultivo intensivo. Rev. Bras. Zool. (Curitiba) 16(2): 423-431.
- VIDAL L.V.O., ALBINATI R.C.B., ALBINATI A.C.L., MACÊDO G.R. 2006. Utilização do Eugenol como Anestésico para o Manejo de Juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Acta Sci. Biol. Sci. (Maringá) 28(3): 275-279.
- WOODY C.A., NELSON J., RAMSTAD K. 2002. Clove oil as an anesthetic for adult sockeye salmon: field trails. J. Fish Biol. (London) 60: 340-347.
- ZIMMERMANN S., MOREIRA H.L.M., VARGAS L., RIBEIRO R.P. 2001. Fundamentos da moderna aqüicultura. Ulbra. Canoas. 199 pp.