

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA



**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGROPECUARIO**

Ensayo in vivo de aplicaciones sedativas y antimicrobianas
acuícolas con aceites esenciales amazónicos en *Piaractus*
brachypomus.

AUTORES:

Diana Carolina Moreno Soliz

Bryan Ivan Maroto Castro

DIRECTOR DEL PROYECTO:

MSc. Ricardo Burgos Morán

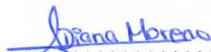
PUYO – ECUADOR

2020



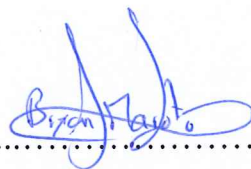
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Nosotros, Moreno Soliz Diana Carolina con C.I: 1600690430 y Maroto Castro Bryan Ivan con C.I 1600625592 según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente declaramos ante las autoridades educativas de la Universidad Estatal Amazónica, que consta en el Proyecto de Investigación bajo el tema: "Ensayo in vivo de aplicaciones sedativas y antimicrobianas acuícolas con aceites esenciales amazónicos en *Piaractus brachypomus*", son de mi autoría y exclusivamente responsabilidad



Moreno Soliz Diana

C.I: 16006904630



Maroto Castro Bryan

C.I: 1600625592

CERTIFICADO DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente, Yo MSc. Ricardo Burgos Moran con C.I:0102431335 que los egresados, Moreno Soliz Diana Carolina y Maroto Castro Bryan Ivan, realizaron el proyecto de investigación titulada: “Ensayo in vivo de aplicaciones sedativas y antimicrobianas acuícolas con aceites esenciales Amazónicos en *Piaractus brachypomus*” previo a la obtención del título de Ingeniería Agropecuaria bajo mi supervisión.



.....

MSc. Ricardo Burgos Morán

C.I: 0102431335

DIRECTOR DEL PROYECTO

CERTIFICACIÓN DE REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADEMICO



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND



Oficio No. 78-SAU-UEA-2020

Puyo, 29 de enero de 2020

Por medio del presente CERTIFICO que:

El Proyecto de Investigación correspondiente a los egresados MORENO SOLIZ DIANA CAROLINA con C.I. 1600690430, y MAROTO CASTRO BRYAN IVAN con C.I. 1600625592, con el Tema: "Ensayo en vivo de aplicaciones sedativas y antimicrobianas acuícolas con aceites esenciales amazónicos en *Piaractus brachipomus*", de la carrera, Ingeniería Agropecuaria. Director del proyecto MSc. Burgos Morán Ricardo, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 3%, Informe generado con fecha 28 de enero de 2020 por parte del director, conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes

Atentamente,

Ing. Italo Marcelo Lara Pilco MSc.
ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .

Puyo, 28 de enero de 2020

MSc.

Ítalo Lara Pico

Administrador del sistema anti plagio Urkund

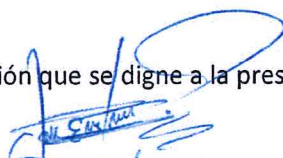
Universidad Estatal Amazónica

De mi consideración:

Por medio del presente solicito a Ud de la manera más comedida se emita el certificado de revisión del sistema anti plagio Urkund para el trabajo de investigación: "Ensayo in vivo de aplicaciones sedativas y antimicrobianas acuícolas con aceites esenciales amazónicos en *Piaractus brachypomus*", de los estudiantes Diana Carolina Moreno Soliz y Bryan Ivan Maroto Castro, de la carrera de Ing. Agropecuaria, de quienes soy Director y cuyo resultado fue de 3%.

En espera de la cordial atención que se digne a la presente; me despido.

Atentamente,


Recibido
28-01-2020



MSc. Ricardo Burgos-Morán

Docente-Investigador Titular Agregado II

Universidad Estatal Amazónica

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis_Ensayo in vivo_Aplicaciones_Sedativas_Antimicrobianas pre_ok..docx (D63110093)
Submitted: 1/28/2020 4:56:00 PM
Submitted By: \${Xml.Encode(Model.Document.Submitter.Email)}
Significance: 3 %

Sources included in the report:

Tesis Carmen Ajila Cuenca.docx (D46723726)
<https://www.vix.com/es/imj/salud/3925/beneficios-y-propiedades-del-clavo-de-olor-7ed03569-8970-4679-bf2b-4fdcc8e0ddf7>
<https://docplayer.es/92325294-Universidad-nacional-de-san-agustin-de-arequipa-facultad-de-ciencias-biologicas-escuela-profesional-de-ingenieria-pesquera.html>
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15790/1/UPS-QT12955.pdf>
<https://docplayer.es/62817415-Macroproceso-de-apoyo-proceso-gestion-apoyo-academico-descripcion-autorizacion-y-licencia-del-repositorio-institucional.html>

Instances where selected sources appear:

FORMATO DE AVAL DOCENTE, PARA LA PRESENTACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIACIÓN

AVAL

Yo, Blgo. MSc. Ricardo Burgos Morán, Docente Titular Agregado II del Departamento de Ciencias de la Tierra de la Universidad Estatal Amazónica, tutor y director de la investigación que ha finalizado en cumplimiento al reglamento interno de titulación, concedo el aval al proyecto de investigación titulado:

“Ensayo in vivo de aplicaciones sedativas y antimicrobianas acuícolas con aceites esenciales amazónicos en *Piaractus brachypomus*.”

Autores: **Diana Carolina Moreno Soliz y Bryan Ivan Maroto Castro**

Certifico haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de Investigación y considero cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la normativa vigente de la institución.

Por lo antes expuesto se avala el proyecto de investigación para que sea presentado ante la Coordinación de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria como requisito de titulación para el grado de Ingeniero en Agropecuaria, y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para constancia, firmo el presente a los 28 días del mes de enero de 2020.

Atentamente,


Blgo. MSc. Ricardo Burgos-Morán
0102431335

FORMATO DE INFORME DEL DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título: "Ensayo in vivo de aplicaciones sedativas y antimicrobianas acuícolas con aceites esenciales amazónicos en *Piaractus brachypomus*."

Autores: Diana Carolina Moreno Soliz y Bryan Ivan Maroto Castro

Unidad de Titulación: Ingeniería Agropecuaria

Director del Proyecto: Ricardo Ernesto Burgos Morán

Fecha: 28 de Enero de 2020

Introducción y contexto de la investigación

Uno de las principales actividades en la piscicultura es la manipulación de los animales para tareas como clasificación, medicación, inducción a la reproducción entre otras, lo que, fomenta el estrés, debilitamiento inmunitario e infecciones; es así como se ha impulsado el uso de anestésicos y antimicrobianos durante estas prácticas de contacto directo con los peces, lo cual contribuye a su mejor sobrevivencia, bienestar y mejor desarrollo productivo. Por otro lado, se debe considerar el uso de agentes químicos locales, siendo una buena opción los aceites esenciales de plantas amazónicas como lo es *Ocotea quixos*, contribuyendo a la generación de economía local complementaria. Así, este proyecto propone determinar la viabilidad de aplicaciones sedativas y antimicrobianas de aceites esenciales amazónicos sobre juveniles de *Piaractus brachypomus*.

Cumplimiento de objetivos

Se realizó ensayos experimentales con aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* (EOSA) y *O. quixos* (EOOQ) con 3 repeticiones, control positivo y control negativo, a $100\mu\text{l.l}^{-1}$, $400\mu\text{l.l}^{-1}$ y $800\mu\text{l.l}^{-1}$ sobre animales sanos y enfermos con saprolegniasis. Se evaluó en juveniles de *P. brachypomus* parámetros de respuesta de inducción, recuperación a la anestesia y curación.

Principales resultados obtenidos

1. Se observó acción anestésica y antimicrobiana de EOSA y EOOQ en juveniles de *P. brachypomus* de forma dosis dependiente.
2. La aplicación de dosis altas permitió la estimación de la DL_{50} ; y, por tanto, la dosis de utilización segura del EOOQ en peces juveniles de *P. brachypomus*.

Los estudiantes **Diana Carolina Moreno Soliz** y **Bryan Ivan Maroto Castro**, han mostrado durante el desarrollo de la investigación una elevada dedicación y un alto grado de independencia, sirviendo como guía de los principales elementos a desarrollar en la investigación.

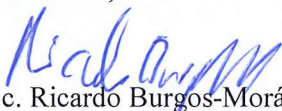
Se destacó la actividad curricular por su rendimiento académico, mostrado durante la investigación interés, motivación en el mismo, lo cual condujo a culminar de forma exitosa el trabajo, cumpliendo con las 400 horas establecidas en el Reglamento de Régimen Académico de la UEA.

La presentación final del trabajo cumple con las normas establecidas en la reglamentación institucional.

La redacción, ortografía, calidad de los gráficos, tablas y anexos es adecuada.

Sin otro particular.

Atentamente,


MSc. Ricardo Burgos-Morán
Docente Titular Agregado 2
CI: 0102431335

CERTIFICADO DE APROBACION POR TRIBUNAL DE SUTENTACION

El proyecto de investigación titulado: "Ensayo in vivo de aplicaciones sedativas y antimicrobianas acuícolas con aceites esenciales amazónicos en *Piaractus brachypomus*", fue aprobado por los siguientes miembros del tribunal:



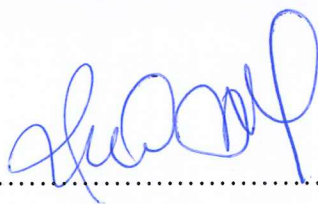
.....

Dra. María Isabel Viamonte
Presidenta del tribunal



.....

Dra. Alexandra Torres
Miembro del tribunal



.....

MSc. Pablo Arias
Miembro del tribunal

AGRADECIMIENTO

Primeramente, quiero darle gracias a Dios, por haberme permitido lograr una meta más en mi vida gracias a El ahora estoy donde estoy, gracias a mis padres por brindarme el apoyo cada día, por estar pendiente de mí siempre, a mi hija que es mi pilar fundamental en mi vida, a mi profesor que siempre ha estado pendiente en todo momento y a todas las personas que siempre me rodean ¡muchas gracias!

Moreno Soliz Diana Carolina

Quiero brindar las gracias a Dios por culminar una etapa más en mi vida, a mi madre que siempre me ayudado incondicionalmente, siendo mi motivación para seguir adelante y seguir cumpliendo todos mis sueños, a mi Tía que siempre ha estado pendiente de mi en todo momento a pesar de su distancia, a mi profesor y a todas las personas que merodean.

¡Gracias!

Maroto Castro Bryan Ivan

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme siempre en todo momento.

A mis padres Maribel Soliz y Cleber Moreno quienes por todo el trayecto de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo un apoyo incondicional en toda la etapa de mi vida.

A mi hija Julieth Aragón siendo la persona más importante en mi vida.

A mi profesor Ricardo Burgos que, a más de colaborarnos en todo, es nuestro gran amigo.

Moreno Soliz Diana Carolina

A Dios, porque me dio la vida y siempre está guiándome por lo correcto.

A mi madre Mirian Castro quien me brindo su confianza y apoyo en todo momento de mi vida.

A mi tía María Castro que a pesar de su distancia siempre me guio por lo correcto y está al pendiente de mí.

A mi profesor Ricardo Burgos que me brindo su apoyo en todo momento para llegar a cumplir una meta más.

Maroto Castro Bryan Ivan

Resumen

Este estudio determino la viabilidad de aplicaciones sedativas y antimicrobianas del aceite esencial amazónico de *Ocotea quixos* sobre juveniles de *Piaractus brachypomus*. Se evaluó mediante frecuencia ventilatoria expresada en movimientos operculares por minuto (mov-op.min⁻¹) y una escala de etapas clínicas el efecto anestésico del aceite esencial (EO) de *Ocotea quixos* (EOOQ), considerando control positivo *Syzygium aromaticum* (EOSA) y control negativo etanol. 36 individuos fueron expuestos durante 30min a concentraciones de EOOQ y EOSA 100µl.l⁻¹, 400µl.l⁻¹ y 800µl.l⁻¹ disueltos en etanol para identificar el tiempo de sedación y recuperación de la anestesia, en acuarios controlados a 26°C; pH 7,5; NH₄ 5mg.l⁻¹; PO₄ 2mg.l⁻¹, Ca 120mg.l⁻¹ como dureza. Un ensayo de desafío fue realizado para infección por *Saprolegnia* sp valorando la curación con un control positivo de azul de metileno 0, 5mg.l⁻¹. Los análisis realizados demuestran que la sedación por EOOQ a 100µl.l⁻¹, 400µl.l⁻¹ y 800µl.l⁻¹ alcanzan niveles de anestesia leve, profunda y colapso medular respectivamente; mientras que el EOSA a 100µl.l⁻¹ solo consigue una sedación leve; y, entre 400µl.l⁻¹ y 800µl.l⁻¹ una anestesia profunda. La frecuencia ventilatoria provocada por EOOQ a los 10 min del tratamiento fue de 28mov-op.min⁻¹ siendo siempre inferior al de EOSA con 42mov-op.min⁻¹, en el mismo período. La recuperación de los especímenes se logró en intervalos máximos de 12,67 ±4,04min en EOOQ y de 15,0 ±3,0min en EOSA. El experimento ante *Saprolegnia* sp muestra el poder curativo de ambos EOs evaluados con mayor eficacia en EOOQ. A partir de los resultados obtenidos de EOOQ se estimó una dosis letal 50 (DL₅₀) de 597µl.l⁻¹ y una dosis segura de 316µl.l⁻¹ por prueba estadística Probit con una seguridad $\chi^2_{(7, 9)}=0,103$; $p\leq 0,05$.

Palabras claves: Anestesia, Antimicrobiana, Sedación, Recuperación, Frecuencia ventilatoria.

Abstract

This study determines the viability of sedative and antimicrobial applications of *Ocotea quixos* Amazonian essential oil on *Piaractus brachypomus* juveniles. The anesthetic effect of the essential oil (EO) of *Ocotea quixos* (EOOQ) was evaluated by ventilatory frequency expressed in opercular movements per minute (mov-op.min⁻¹) and a clinical stages scale, considering positive control *Syzygium aromaticum* (EOSA) and negative control ethanol. 36 individuals were exposed during 30min to concentrations of EOOQ and EOSA 100µl.l⁻¹, 400µl.l⁻¹ and 800µl.l⁻¹ dissolved in ethanol to identify sedation time and anesthesia recovery, in controlled aquariums at 26°C; pH 7.5; NH₄ 5mg.l⁻¹; PO₄ 2mg.l⁻¹, Ca 120mg.l⁻¹ as hardness. A challenge test was performed for infection by *Saprolegnia* sp evaluating the cure with a positive control of methylene blue 10mg.l⁻¹. Analyses show that EOOQ sedation at 100µl.l⁻¹, 400µl.l⁻¹ and 800µl.l⁻¹ reach levels of mild, deep and medullary collapse respectively; while EOSA at 100µl.l⁻¹ only achieves mild sedation and between 400µl.l⁻¹ and 800µl.l⁻¹ a deep anesthesia. The ventilatory frequency provoked by EOOQ 10 min after treatment was 28mov-op.min⁻¹ being always lower than EOSA 42mov-op.min⁻¹, in the same period. Specimen recovery was achieved at maximum intervals of 12,67 ±4,04min in EOOQ and 15,0 ±3,0min in EOSA. The experiment against *Saprolegnia* sp shows the healing power of both EOs evaluated with greater efficacy in EOOQ. From the results obtained from EOOQ a lethal dose 50 (DL50) of 597µl.l⁻¹ and a safe dose of 316µl.l⁻¹ per Probit statistical test was estimated with a safety of $\chi^2_{(7, 9)}=0,103$; $p\leq0,05$.

Keywords: Anesthesia, Antimicrobial, Sedation, Recovery, Ventilation frequency.

INDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO I.....	9
INTRODUCCIÓN.....	9
1. JUSTIFICACIÓN.....	10
1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	10
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
1.3. OBJETIVOS.....	11
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	11
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
CAPÍTULO II.....	12
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	12
2.1. GENERALIDADES	12
2.1.1. LA CACHAMA BLANCA	12
2.2. APLICACIONES ANESTÉSICAS.....	12
2.2.1. ANESTESIA.....	12
2.3. MEDICAMENTOS DE USO COMÚN EN ACUICULTURA.....	13
2.4. VÍAS DE APLICACIÓN DE FÁRMACOS	13
2.4.1. AGUA.....	13
2.4.2. VÍA PARENTAL	13
2.4.3. VÍA ORAL	14
2.5. MECANISMOS DE SEDACIÓN.....	14
2.5.1. IMPORTANCIA DE LA SEDACIÓN.....	14
2.6. USOS ANTIMICROBIANOS EN LA ACUACULTURA	15
2.6.1. EFECTO ANTIMICROBIANO	15

2.7.	ENFERMEDAD EN LOS PECES <i>Saprolegnia</i> sp.....	15
2.8.	CANELA (<i>Ocotea quixos</i>)	16
2.9.	CLAVO DE OLOR (<i>Syzygium aromaticum</i>)	16
2.10.	ACEITES ESENCIALES.....	16
2.10.1.	ACEITES ESENCIALES COMO TERAPÉUTICO EN PISCICULTURA	16
2.10.2.	ACEITE DE CANELA (<i>Ocotea quixos</i>)	17
2.10.3.	ACEITE DE CLAVO DE OLOR (<i>Syzygium aromaticum</i>)	17
	CAPÍTULO III	19
3.	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	19
3.1.	LOCALIZACIÓN	19
3.2.	TIPO DE INVESTIGACIÓN	19
3.3.	MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN	19
3.3.1.	ORGANISMOS EXPERIMENTALES.....	19
3.3.2.	MANEJO DE INSTALACIONES	20
3.3.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL	20
3.3.4.	VARIABLES A MEDIR	21
3.4.	CONDICIONES DE MANEJO.....	22
3.4.1.	PARÁMETROS DE CALIDAD DE AGUA	22
3.4.2.	MANIPULACIÓN DEL CULTIVO EXPERIMENTAL.....	22
3.5.	INDUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE ANESTESIA	22
3.6.	EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA VENTILATORIA.....	24
3.7.	PRUEBA DE DESAFIO PARA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	24
3.8.	DETERMINACIÓN DE DOSIS SEGURA	24

CAPITULO IV	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 INDUCCIÓN A LA ANESTESIA	¡Error! Marcador no definido.
4.2. RECUPERACION A LA ANESTESIA	¡Error! Marcador no definido.
4.3. FRECUENCIA VENTILATORIA	¡Error! Marcador no definido.
4.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA APLICADA CONTRA <i>Saprolegnia sp</i> ¡Error! Marcador no definido.	
4.5. DETERMINACION DE DOSIS SEGURA.....	31
CAPITULO V	33
5. CONCLUSIONES.....	33
6. RECOMENDACIONES	33
CAPITULO VI.....	34
7. BIBLIOGRAFÍA.....	34
CAPITULO VII.....	37
8. ANEXOS.....	37
8.1. REGISTROS FOTOGRAFICOS.....	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de los EOs	21
Tabla 2. Etapa de anestesia utilizada para verificar el efecto sedativo con sus niveles de <i>P. brachypomus</i>	23
Tabla 3. Estados de recuperación.....	23
Tabla 4. Eventos conductuales de inducción y recuperación a la anestesia en juveniles de <i>P. brachypomus</i>	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de la parroquia 10 de Agosto, en la provincia de Pastaza.....	19
Figura 2. Evaluación de estados clínicos de los EOs.....	25
Figura 3. Evaluación del estado de recuperación.	27
Figura 4. Frecuencia opercular en anestesia y recuperación de EOOQ.	28
Figura 5. Frecuencia opercular en anestesia y recuperación de EOSA.	29
Figura 6. Grado de severidad por <i>Saprolegnia sp</i>	30
Figura 7. Análisis Probit.....	31

INDICE DE ANEXOS

Figura 1. Unidad experimental ddsdsaeedxczzxelkExperimentalexperimental	37
Figura 2. Test profesional análisis de agua.....	37
Figura 3. Muestreo de agua	38
Figura 4. Colocación del anestésico	38
Figura 5. Pez en fase de sedación	39
Figura 6. Pez en fase de anestesia.....	39
Figura 7. Pez en recuperación.....	39
Figura 8. Aceites esenciales.....	39

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La cachama blanca, *Piaractus brachipomus*, es una especie dulceacuícola endémica de gran importancia económica para el desarrollo del sector piscícola, el cual ha servido como modelo biológico en diversos estudios farmacológicos e inmunotoxicológicos (Zapata-Guerra, Rueda-Gómez, y Rondón-Barragan, 2018). Hoy en día su cultivo se ha masificado en todos los países amazónicos, sin ser Ecuador la excepción, por lo que se ha atendido a sistemas más intensivos de producción los cuales quieren un mayor número de insumos para un mejor control de la explotación (MAG, 2016).

Actualmente la piscicultura intensiva se encuentra sometida a un mayor hacinamiento y procedimientos de manipulación durante la clasificación, captura, transporte y comercialización *in vivo*; el manejo implica la introducción de objetos en el agua que inducen a un estrés severo, modificando la fisiología, comportamiento y bienestar de los animales, reflejados principalmente en lesiones físicas, crecimiento lento, inmunosupresión e incluso en altas mortalidades (Vázquez, Castro, Hernández, Castro, y De Lara, 2013) . Para contrarrestar el estrés se ha empleado la anestesia, como una valiosa herramienta durante el manejo de los peces (Perez-Ribeiro, Santos-Costa, Eloy, Vieira, y Solis-Murgas, 2010). La anestesia puede definirse, como la acción de las sustancias para reducir temporalmente la sensibilidad y reflejos de los individuos (Vázquez et al., 2013).

El uso de antibióticos en acuicultura genera la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos en los entornos acuáticos donde se desarrolla esta actividad, y existen evidencias epidemiológicas y moleculares, señalando que los genes que median esta resistencia pueden ser transmitidos de bacterias acuáticas a bacterias capaces de producir infecciones en humanos y en animales terrestres (Cabello, 2004). Esto ha demostrado que los compartimientos acuáticos y terrestres carecen de fronteras respecto del flujo de genes de resistencia a antibióticos, y también que el fenómeno de resistencia es un fenómeno global, ya que el uso de antibióticos en un ambiente tendrá, a lo largo del tiempo, repercusiones en otros ambientes aparentemente lejanos (Sørum y L'Abée, 2002).

La acuicultura orgánica son sistemas de crianza orgánicos tradicionales dependen de prácticas basadas en ecología, como por ejemplo el manejo biológico de plagas y el no uso

de químicos sintéticos en la producción, y además de la prohibición del uso de antibióticos y hormonas en la producción de organismos vivos (Chimbor y Lujan, 2007). Asimismo, la sostenibilidad, la administración ambiental, y el enfoque holístico a la producción son el sello de los sistemas orgánicos.

1. JUSTIFICACIÓN

La piscicultura extensiva e intensiva es una fuente de ingresos y aprovechamiento de fuentes hídricas, siendo una alternativa de mejora económica para los piscicultores; sin embargo, la integración de otros insumos locales a esta cadena productiva en la utilización de aceites esenciales amazónicos para el manejo de *P. brachypomus*, son limitados.

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. El estrés en los peces influye por: una manipulación brusca, sobrepoblación, temperatura, pH del agua inadecuada, falta de oxígeno disuelto y contaminación del agua.

Actualmente se utiliza el aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), para la sedación de los peces; el cual se desconoce que otros aceites esenciales tengan las propiedades para poderles sedar y por primera vez se va utilizar el aceite esencial amazónico de Canela (*Ocotea quixos*).

Este aceite esencial beneficiara a piscicultores a evitar grandes pérdidas económicas al manipular a los animales, también ayudara en la industria farmacéutica para la elaboración de productos debido a las propiedades que presenta este aceite esencial.

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Las aplicaciones sedativas y antimicrobianas a través de aceites esenciales amazónicos aplicados al manejo de *P. brachypomus*, son escasos; esto ha llevado a un manejo inadecuado de los animales.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Son los aceites esenciales amazónicos una alternativa de aplicación sedativa y antimicrobiana en la piscicultura de *P. Brachypomus*?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1.OBJETIVO GENERAL

Determinar la viabilidad de aplicaciones sedativas y antimicrobianas de aceites esenciales amazónicos sobre juveniles de *Piaractus brachypomus*.

1.3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar las propiedades sedativas de aceites esenciales mediante la medición de sedación anestesia y recuperación de *Piaractus brachypomus*.

Analizar las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales amazónicos mediante ensayos de aplicación de inmersión *in vivo* para *Piaractus brachypomus*.

CAPÍTULO II

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. GENERALIDADES

Cada país tiene una regulación particular sobre el uso de fármacos en peces, las normas son bastante restrictivas y hasta la fecha solo hay 6 principios aprobados como fármacos piscícolas de consumo por parte de la FDA -Agencia de Administración de Alimentos y fármacos de Estados Unidos (Schnick y Meyer, 2011). La regulación aplicada en cada país si bien es restrictiva tiene como ventaja que los encargados de las explotaciones se vean obligados a vigilar con mayor cuidado los factores de riesgo que desencadenan las enfermedades, dada la reducida disponibilidad de fármacos cuando se den brotes de las mismas (González, 2010).

2.1.1. LA CACHAMA BLANCA

Popularmente conocida como cachama blanca en Colombia y Venezuela, paco en Perú y pirapitinga en Brasil, es una especie originaria de la región amazónica que empezó a producirse en cautiverio desde 1983 con un aporte significativo en la alimentación rural (Abad, Rincón, y Poleo, 2014), es considerada como la especie de mayor potencial productivo y comercial en la piscicultura extensiva, semiintensiva e intensiva de aguas cálidas continentales de América tropical ya que presenta alta resistencia a las enfermedades y es de fácil adaptación a condiciones agrestes (Mesa y Botero, 2006).

2.2. APLICACIONES ANESTÉSICAS

2.2.1. ANESTESIA

Es un acto médico controlado en el que se usan fármacos para bloquear la sensibilidad táctil y dolorosa de un paciente, sea en todo o parte de su cuerpo y sea con o sin compromiso de conciencia (Rodríguez, Ruiz, Domenech, y Ruiz, 2008).

2.3. MEDICAMENTOS DE USO COMÚN EN ACUICULTURA

Según González (2010) menciona, el uso de medicamentos o sustancias químicas en la acuicultura se realiza de forma intencional los pesticidas y antibióticos se identifican como compuestos bioactivos, aunque también son llamados compuestos inhibitorios y deben utilizarse según los códigos de buenas prácticas para evitar efectos secundarios indeseables.

2.4. VÍAS DE APLICACIÓN DE FÁRMACOS

2.4.1. AGUA

De acuerdo con González (2010) menciona, que el medio usado frecuentemente para vehiculizar fármacos y anestésicos. Algunos de los aspectos que deben analizarse al considerar el agua como vehículo de fármacos, son:

- Los peces tienen una epidermis no queratinizada que favorece el ingreso de fármacos por vía cutánea.
- Las branquias por su vascularización y ubicación son otra vía importante de ingreso de fármacos.
- El disolver drogas en el agua determina la necesidad de conocer la vida media del fármaco en el agua, así como en el pez. Dentro de los factores que afectan la permanencia del fármaco en el agua están el pH, temperatura, intensidad lumínica y dureza del agua.
- La aplicación del fármaco en el agua puede tener también efectos ambientales sobre el sistema acuático, esta vía tiene mayor efectividad en patógenos que residen en piel y branquias (parásitos, hongos, bacterias).

2.4.2. VÍA PARENTAL

La inyección de las drogas tiene la ventaja de suministrar la dosis precisa es la vía más usada para aplicación de fármacos mediante inyección intramuscular (IM) y la intraperitoneal (IP) (Brown, 2010).

2.4.3. VÍA ORAL

El suministro de medicamentos en el alimento se hace a través de varias formas o presentaciones. La primera es alimento medicado producido comercialmente. Otra forma de suministrar alimento, particularmente si se trata de pequeñas cantidades, es preparar dieta artificial medicada (Brown, 2010).

2.5. MECANISMOS DE SEDACIÓN

La sedación y anestesia en peces son procedimientos de importancia para favorecer el transporte, manipulación, muestreo y procesos quirúrgicos (Navarro, Ramírez, y Villagrán, 2012). La mayoría de compuestos utilizados como anestésicos se utilizan a través de inmersión en una solución acuosa; y, en su aplicación práctica se debe disponer de un contenedor de anestesia y otro de recuperación (Varela, 2009).

La aplicación de los anestésicos y otros medicamentos dependen de la velocidad de absorción según sus características en términos de su concentración en relación al peso del organismo, liposolubilidad, peso molecular, pKa, pH, temperatura del medio y tiempo de exposición –aguda o crónica- entre otras, entrando en contacto directo con piel, mucosas y agallas del pez (Sneddon, 2012).

Una vez dentro del organismo tiene diferentes vías de interrelación con el sistema nervioso central de vertebrados, a nivel de neurotransmisores como el GABA (ácido γ -aminobutírico) principal neuro-inhibidor, además de respuestas en la modulación de la señal de iones calcio (Ca^{2+}) o bloqueo de la electro sensibilidad de los canales de iones sodio (Na^{+}) en neuronas, es decir un efecto GABAérgico, que es un aumento de la actividad inhibitoria en diversos circuitos neurales que explicarían las distintas facetas de la sedación y anestesia (Sneddon, 2012; Vargas, 2017)

Por tal razón se usa como indicadores del efecto de anestesia, además de la observación visual, los cambios a nivel de electrolitos en agua y glucosa / glucógeno en hígado (Lopes et al., 2018; Souza et al., 2017).

2.5.1. IMPORTANCIA DE LA SEDACIÓN

Uno de los beneficios de la anestesia en los peces es favorecer el transporte, manipulación, muestreos y procesos quirúrgicos al animal durante una fracción de tiempo fuera del agua, minimizando el riesgo que implica el estrés (Hinostroza y Serrano, 2013).

2.6. USOS ANTIMICROBIANOS EN LA ACUACULTURA

El uso de antimicrobianos en acuicultura se realiza para el control de microorganismos patógenos en los sistemas de cultivo; sin embargo, su abuso ha resultado en el surgimiento de bacterias resistentes en peces y otros animales acuáticos, así como en su ambiente (Romero, Navarrete, y Feijoó, 2012). Los impactos en el ambiente y en la salud humana se han producido por la selección de BRA (bacterias resistentes a antimicrobianos) y sus genes de resistencia (Cabello et al., 2013). Su uso puede disminuir la diversidad biológica en el ambiente con el potencial teórico de facilitar la floración de algas tóxicas y la selección de microorganismos patógenos de origen acuático potencialmente zoonóticos para el ser humano (Hernández, Ulloa, Vergara, Espejo, y Cabello, 2005).

Hay diferentes tipos de prácticas para el empleo de antimicrobianos desde inyecciones, aplicaciones alimentarias y baños inmersión (Holloway y Green, 2003). Consecuentemente el uso de agentes antimicrobianos en la acuicultura, resulta una amplia aplicación ambiental que impacta a una amplia variedad de bacterias (Romero et al., 2012).

2.6.1. EFECTO ANTIMICROBIANO

Los agentes antimicrobianos se usan ampliamente en la acuicultura para tratar infecciones debidas a una variedad de patógenos bacterianos en peces (Angulo, 2000). Tienen varias proveniencias bioquímicas, aunque mayormente compuestos de origen microbiano, matando o inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos, estos pueden ser sintetizados, creándose gran variedad de compuestos con distintos métodos de acción, especificidad y toxicidad (Barattini, 2012). Cuando se inhibe el crecimiento bacteriano, el microorganismo permanece viable, de modo que cuando se suspende el tratamiento, y hay estrés inmunitario, el agente patógeno se podría volver a recuperarse y multiplicarse (Pérez, 2018). Para determinar este efecto se realizan pruebas microbiológicas como antibiogramas analizando la susceptibilidad de una bacteria a un grupo de antibióticos (Hazen, 2016).

2.7. ENFERMEDAD EN LOS PECES *Saprolegnia* sp

Saprolegnia parasítica ha sido reconocida como la principal especie patógena de organismos relacionados con hongos en peces, actuando principalmente como patógeno secundario, es descrita como una micosis superficial que se localiza principalmente en branquias y piel,

particularmente alrededor de la cabeza, aleta caudal y anal (Carraschi et al., 2018). Los brotes de saprolegniosis en cultivo de peces generalmente se limitan a casos crónicos, con pérdidas fijas; sin embargo, la mortalidad en peces puede aumentar rápidamente, causando pérdidas significativas (Torres y Fajardo, 2011).

2.8. CANELA (*Ocotea quixos*)

Es una especie amazónica que en los últimos años está siendo aprovechada, en una diversidad de usos, ya que tradicionalmente se utiliza la corteza interna de las ramas obteniendo varios beneficios de ella, como son: medicinas, alimentos, materiales para la construcción de casas, canoas, colorantes, ingredientes u otros, se encuentra distribuida en Colombia y Ecuador es utilizada en la industria de alimentos como especia, también se aprovecha el cáliz de la flor deshidratado o ishpink, para la elaboración de artesanías (Torres, 2014).

2.9. CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*)

Es un árbol que puede alcanzar los 15 m de altura originario de los climas tropicales, el cual representa una de las fuentes más ricas de compuestos fenólicos con sus propiedades antibacteriales, anestésicas, afrodisíacas, analgésicas, antiespasmódicas y estimulantes. Uno de los compuestos claves para sus capacidades medicinales es el eugenol, un compuesto que previene la coagulación de la sangre, por lo que favorece la salud cardiovascular (Díaz, 2016).

2.10. ACEITES ESENCIALES

Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica (Sierra, Barros, Gómez, Mejía, y Suarez, 2018).

2.10.1. ACEITES ESENCIALES COMO TERAPÉUTICO EN PISCICULTURA

El aumento por la demanda del uso de productos anestésicos a costo razonable, fáciles de adquirir y seguros tanto para el manipulador como para el medio ambiente, es una de las grandes búsquedas actuales, siendo los aceite esenciales, derivados de plantas, una fuente

que ha demostrado ser una alternativa factible, que cumple con los requisitos señalados y han sido usados experimental y cotidianamente en la reducción del estrés en peces durante los procedimientos de captura y manejo (Souza, Baldissera, Baldisserotto, y Lopez, 2019; Vieira, 2017).

Otra aplicación práctica de los aceites esenciales, es su poder antimicrobiano; así de acuerdo a San Martín, Gallardo, Lara, y Medina, (2015) mencionan un conjunto de medidas y recomendaciones para el uso prudente de antimicrobianos, como:

- Mantener la eficacia de los antimicrobianos
- Proteger la salud y el bienestar de los animales.
- Evitar la selección y diseminación de bacterias resistentes o determinantes de resistencia antimicrobiana.
- Entregar productos alimenticios de origen animal inocuos para la población humana.

El uso de aceites esenciales consiste en la sedación suave, para reducir el estrés durante la manipulación y procedimientos no invasivos como pueden ser: medidas de su longitud, peso corporal y transporte; en caso de tener poder antimicrobiano es más pertinente su uso, pues así se puede prevenir infecciones. La anestesia, en cambio, permitiría realizar procedimientos invasivos en un determinado tiempo con su respectiva recuperación (Millán et al., 2012).

2.10.2. ACEITE DE CANELA (*Ocotea quixos*)

Es extraído del tallo y hojas siendo un líquido color marrón pálido, espeso, picante y a la vez dulce, teniendo un aroma diferente a cualquier canela común, tiene los niveles más altos de humuleno alfa de cualquier aceite esencial y tiene propiedades limpiadoras, su principio activo es el β -Cariofileno, molécula con propiedades antiinflamatorios y repercusiones analgésicas (Radice et al., 2017).

2.10.3. ACEITE DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*)

Es un compuesto fenólico producto de la destilación de las hojas, tallos y flores de la planta, siendo un líquido transparente de olor muy intenso, el eugenol es su principio activo cuya concentración oscila entre 85 y 95% de su composición total según (Ajila, 2019)

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. LOCALIZACIÓN

El proyecto se realizó en el km 7½ de la vía Puyo-Arajuno, al este de la ciudad del Puyo, parroquia Diez de agosto, Provincia de Pastaza, región amazónica ecuatoriana, a una altura de 596 msnm, temperatura oscila entre los 21°C a 22°C, pluviosidad de 4700 mm anuales y humedad relativa entre 93 % (CDTER, 2015).

Figura 1. Ubicación de la parroquia 10 de Agosto, en la provincia de Pastaza



Fuente: CDTER, (2015).

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue de tipo experimental, determinándose la viabilidad de aplicaciones sedativas y antimicrobianas del aceite esencial amazónico sobre juveniles de *Piaractus brachypomus*.

3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

3.3.1. ORGANISMOS EXPERIMENTALES

Se seleccionó 75 ejemplares juveniles de *P. brachypomus* con un peso de 300±12 gramos. El material biológico se obtuvo de empresas locales de la Provincia de Pastaza.

3.3.2. MANEJO DE INSTALACIONES

Los animales fueron mantenidos en nueve acuarios experimentales, contruidos con vidrio de 10 mm de grosor, y una capacidad de 75 litros, para su aclimatación y adaptación.

Cada unidad experimental fue un micro acuario con capacidad de 5 litros (**Anexo fig.1**), donde se transfirieron individualmente los peces juveniles para someterlos a los tratamientos experimentales mediante baños de inmersión. Luego, los especímenes, fueron trasladados a acuarios de recuperación. Las instalaciones estuvieron aireadas mediante piedras difusoras y monitoreadas siguiendo el método descrito por Lopes et al., (2018).

3.3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron 2 experimentos, uno de acción anestésica y otro de acción antimicrobiana. La acción anestésica fue determinada mediante tratamientos de control positivo con EOSA, control negativo con etanol y evaluación con EOOQ a tres niveles de concentración con tres repeticiones (Lopes et al., 2018). La acción antimicrobiana fue determinada con pruebas de desafío con tres repeticiones de animales infectados por el agente patógeno *Saprolegnia* sp que fueron tratados terapéuticamente mediante tratamientos de control positivo con ciprofloxacina, control con EOSA, evaluación con EOOQ y control negativo con etanol haciendo una adaptación de Carraschi et al., (2018).

Cada interacción tratamiento-nivel fue considerada como un experimento, así el análisis de datos consideró un diseño completamente aleatorizado, en el que la unidad de muestreo fue cada animal sometido a los agentes sedativos y antimicrobianos evaluados.

Para el manejo de los datos y el análisis estadístico se utilizó el software por SPSS® versión 25, realizándose tres tipos de análisis estadísticos: a) estadística descriptiva mediante gráficos de cajas y bigotes, b) regresión lineal; y, c) dicotómica de probabilidad PROBIT. Los ensayos experimentales consistieron en la exposición de los peces a un período de 30 minutos a los agentes descritos para determinar:

- Tiempo de inducción a la anestesia,
- Tiempo de recuperación,
- Frecuencia ventilatoria de los animales,
- Evaluación de la calidad del agua antes de la aplicación del agente experimental y de 6 horas posterior a la exposición del pez.

3.3.4. VARIABLES A MEDIR

3.3.4.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Tratamientos químicos (anestésicos y antimicrobianos):

- Aceite esencial de canela, *Ocotea quixos* (EOOQ).
- Aceite esencial de clavo, *Syzygium aromaticum* (EOSA).
- Control positivo con Azul de metileno (para prueba de desafío)
- Control negativo con etanol
- Infección por *Saprolegnia* sp

3.3.4.2. VARIABLE DEPENDIENTE

- Niveles de sedación (Tabla1)
- Tiempo de recuperación (Tabla2)
- Frecuencia ventilatoria
- Control de infección por *Saprolegnia* sp
- Mortalidad / Supervivencia

Tabla 1. Composición química de los EOs

Tratamiento	Aceite esencial	Agente principal	Composición (%)	
			máx.	mín.
TC-	Ninguno	Ninguno	-	-
TC+	Aceite de clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Eugenol	87	49
		Acetato de Eugenilo	21	0,5
		Caryophyllene	21	4
T1	Aceite de Canela (<i>Ocotea quixos</i>)	β -Caryophyllene	28,2	10,1
		trans-Cinnamaldehyde	16,6	5,1
		trans-Cinnamyl acetate	11,4	10,0
		Δ -Cadiene	3,1	3,1
		1,8-Cineole	11,4	11,4
		Eremophyllene	8,2	8,2
		Geranial	5,6	5,6
		α -Humulene	14,3	10,1
		trans-Methylisoeugenol	11,9	11,9
		Methyl cinnamate	19,5	7,0
		α -Pinene	9,4	4,3
		Sabinene	7,6	4,6
		β -Selinene	10,4	5,0

Fuente: Radice et al., (2017; Sacchetti et al., (2005); Scalvenzi et al., (2019)

Fueron aplicados 3 niveles de 100, 400 y 800 μ l/l a cada tratamiento.

3.4. CONDICIONES DE MANEJO

3.4.1. PARÁMETROS DE CALIDAD DE AGUA

Los animales fueron mantenidos en acuarios cuyo ambiente estuvo saturado de oxígeno mediante difusores, además de filtros para eliminar impurezas en cada unidad (Lopes et al., 2018). Los parámetros de calidad del experimento fueron: temperatura 26°C; pH 7,5; NH₄ 5mg.l⁻¹; PO₄ 2mg.l⁻¹, Ca 120mg.l⁻¹ como dureza (**Anexo fig. 2 y 3**).

3.4.2. MANIPULACIÓN DEL CULTIVO EXPERIMENTAL

Los animales fueron adaptados por un lapso de 15 días luego de su llegada a las instalaciones experimentales, en sus respectivos acuarios, previo a la aplicación de los ensayos experimentales. Se usó un protocolo previo de sometimiento de ayuno por 24 horas como preparativo para la aplicación del experimento de anestesia (EOSA y EOOQ) descritos anteriormente (**Anexo fig. 4**). Luego de esta primera evaluación, se realizó la inducción de infección de *Saprolegnia* sp (micosis piscícola) mediante manipulación estresante a 23°C adaptando la metodología de Carraschi et al., (2018). La duración total del mantenimiento en acuarios fue de 4 semanas.

3.5. INDUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE ANESTESIA

La evaluación del tiempo de inducción y recuperación de la anestesia se realizó en seis acuarios de 5L de agua, aireados continuamente (**Anexo fig. 5**). Los animales fueron expuestos a concentraciones de 100; 400; 800µl/l del EOOQ, previamente diluido en etanol (1:10). Se realizó experimentos control positivo con EOSA diluido en etanol (1:10) en el mismo nivel de concentración del tratamiento experimental; además de un control negativo sólo con alcohol.

El tiempo máximo de exposición al aceite fue de 30 minutos y sólo se utilizó un pez por acuario, y cada animal fue utilizado sólo una vez.

Se monitoreó la etapa de inducción de anestesia con sus respectivos niveles según una matriz de observación cronometrada (Tabla2) de *P. brachypomus*, adaptado de Vargas, (2017)

Tabla 2. Etapa de anestesia utilizada para verificar el efecto sedativo con sus niveles de *P. brachypomus*.

	Estado clínico	Criterio de evaluación				
		Movimiento	Reflejos	Equilibrio	Tono muscular	Respiración
0	Normal	Nado activo	Adecuado	Normal	Normal	Normal
1.1	Sedación	Normal	Respuesta disminuida	Normal	Normal	Normal
1.2		leve				
		profunda	Disminución	Leve respuesta	Alteración leve	Disminución leve
2.1		leve	Con cambios de posición	Leve repuesta	Perdida de equilibrio	Disminución moderada
2.2		profunda	Ausente	Estímulos vibratorios	Ausente	Disminución moderada
3.1		leve	Ausente	Respuesta al dolor	Ausente	Disminución moderada
3.2		profunda	Ausente	Analgesia	Ausente	Disminución moderada
4	Colapso medular	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Disminuida (muerte)

Fuente: Vargas, (2017).

Después de la inducción, los juveniles fueron transferidos a acuarios libres de anestesia, para la observación del tiempo de recuperación (**Anexo fig. 1**), el cual será inverso a la inducción de la anestesia:

Tabla 3. Estados de recuperación

Estado	Característica
I	Inmovilidad, pero movimiento opercular
II	Movimientos corporales incoordinados y movimiento opercular
III	Movimiento normal

Fuente: (Vargas, 2017).

3.6. EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA VENTILATORIA

La frecuencia ventilatoria se cuantificó mediante identificación visual de 20 movimientos operculares sucesivos y su tiempo de ejecución a través de un cronómetro.

3.7. PRUEBA DE DESAFIO PARA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El ensayo de desafío se realizó para evaluar el control de la infección por *Saprolegnia* sp. La micosis fue generada por manipulación de los animales a baja temperatura, identificando la formación de micelios visibles sobre el tejido tegumentario de los individuos experimentales. Se valoró el control de la curación contrastando las observaciones con un control positivo de Azul de metileno 0,5 mg.l⁻¹, un control de EOSA y el agente a evaluar EOOQ en la misma dosificación del ensayo anestésico.

3.8. DETERMINACIÓN DE DOSIS SEGURA

Se realizó mediante el cálculo de la DL₅₀ (dosis letal 50). Se utilizó la estimación del modelo Probit, que a través de análisis de probabilidad dicotómica (sobrevivencia / mortalidad) permitió la identificación de las concentraciones en las cuales EOOQ puede causar riesgo de mortalidad en sus aplicaciones.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto anestésico de EOOQ se demuestra mediante la respuesta de los animales sometidos a su aplicación; así, los juveniles de *Piaractus brachypomus* tuvieron una respuesta gradual según la concentración de aceite esencial aplicado, expuestos en la Figura 2.

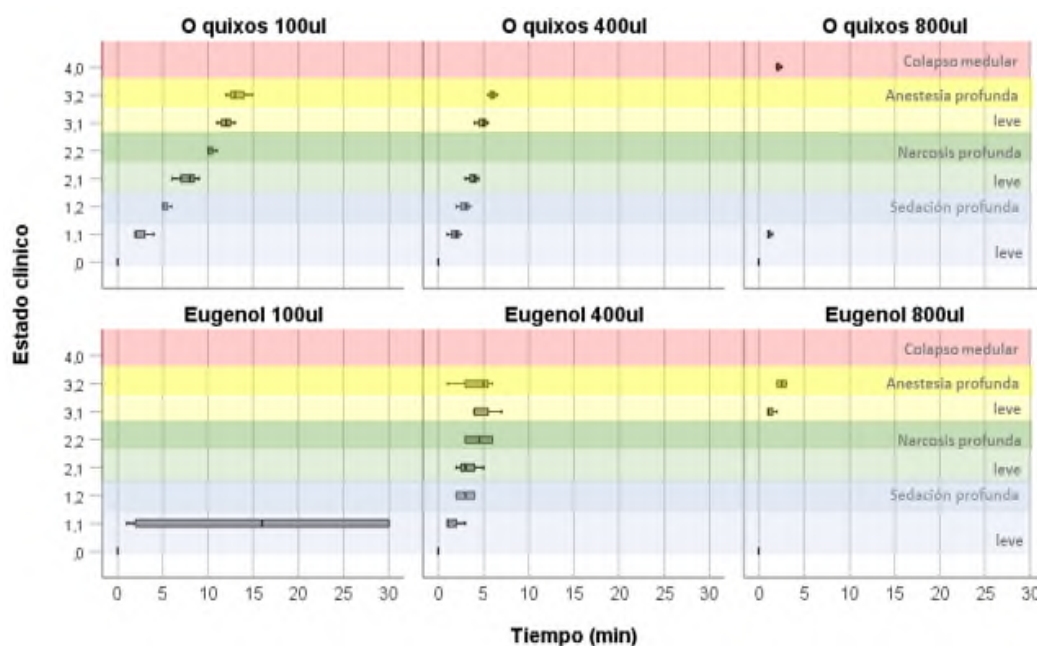


Figura 2. Evaluación de estados clínicos de los EOs.

Los tiempos registrados con diferentes concentraciones según la Tabla 4 muestra diferencias significativas obteniendo a EOSA con una dosis de 400 $\mu\text{l. l}^{-1}$ la inducción y recuperación más rápida.

Tabla 4. Eventos conductuales de inducción y recuperación a la anestesia en juveniles de *P. brachypomus*.

Concentración (μl. l ⁻¹)	EOSA		EOOQ	
	----- tiempo (minutos) -----			
	Inducción	Recuperación	Inducción	Recuperación
100	n. a	0,3 ± 0,01 ^a	13,33 ± 1,53 ^c	11,0 ± 2,0 ^{bc}
400	4,0 ± 2,65 ^a	8,0 ± 5,29 ^b	6,0 ± 0,5 ^{ab}	12,67 ± 4,04 ^{bc}
800	2,67 ± 0,58 ^{ab}	15,0 ± 3,0 ^c	n.a	n. a

Nota: superíndices muestran grupos con diferencia significativa por ANDEVA con discriminación *a posteriori* de Duncan con $p \leq 0,05$. / n.a = no aplica

Los animales de este ensayo se evaluaron según la Tabla 2 mencionada por Vargas, (2017), así en la **Figura 2** se observa que los 36 individuos fueron expuestos durante 30 minutos a concentraciones de EOOQ y EOSA con dosis de: $100\mu\text{l.l}^{-1}$, $400\mu\text{l.l}^{-1}$ y $800\mu\text{l.l}^{-1}$ disueltos en etanol. Dosis de $100\mu\text{l.l}^{-1}$ con EOOQ producen un estado de anestesia profunda (valor 3.2) a los $13,33\pm 1,53\text{min}$, con menor ritmo opercular a diferencia de EOSA que llega solo al estado de sedación leve (valor 1.1) en la que se mantiene durante los 30 minutos de exposición.

Dosis de EOOQ y EOSA a $400\mu\text{l.l}^{-1}$ generan un estado de anestesia profunda (valor 3.2) a los $6,0 \pm 0,5\text{min}$ con EOOQ mientras que EOSA a $4,0 \pm 2,65\text{min}$. En la dosis $800\mu\text{l.l}^{-1}$ la aplicación de EOOQ provoca colapso medular (valor 4), es decir la muerte de los individuos, en tan sólo un minuto de exposición, mientras EOSA logra anestesia profunda (valor 3.2) a los $2,67\pm 0,58\text{min}$. Además se debe mencionar que los animales sometidos a etanol como control negativo no evidenciaron cambios en su comportamiento o algún estado anestésico o tóxico, similares a los reportados por Marín-Mendez, Torres-Cortes, Naranjo-Suárez, Chacón-Novoa, y Rondón-Barragan, (2012) y Lopes et al., (2018).

Según Ross, Ross, y Ross, (2008), un anestésico eficiente es aquel que puede tener un efecto en bajas dosis, en un tiempo mínimo y su recuperación es rápida; al comparar los datos obtenidos con Roubach, Gomes, Leão Fonseca, y Val, (2005), se observa que el tiempo de inducción y recuperación en juveniles de $57,6 \pm 7,72\text{g}$ a una dosis de 100mg.l^{-1} es de $2,28 \pm 0,47\text{min}$ y $9,25 \pm 3,81\text{min}$ respectivamente, datos que están cercanos a los obtenidos en el presente experimento, considerando que los animales empleados fueron de un peso significativamente superior. Otros resultados orientan a que si bien no se puede llegar a la sedación profunda, este efecto podría ser narcótico para facilitar el manejo y transporte con dosis variadas de diversos aceites esenciales como ha sido la aplicación de EOSA (Souza et al., 2019), por otro lado no se reporta usos de EOOQ en la literatura a disposición.

La recuperación de los individuos se realizó observando y midiendo el tiempo de traspaso de un estado de recuperación a otro según la Tabla 3 citado por Vargas,(2017).

Con el fin de lograr el efecto de recuperación, los juveniles fueron transferidos a acuarios libres de anestesia. Así, tal como se puede apreciar en la **Figura 3**, los tiempos registrados, muestran que los peces a concentraciones más altas necesitan mayor tiempo de recuperación.

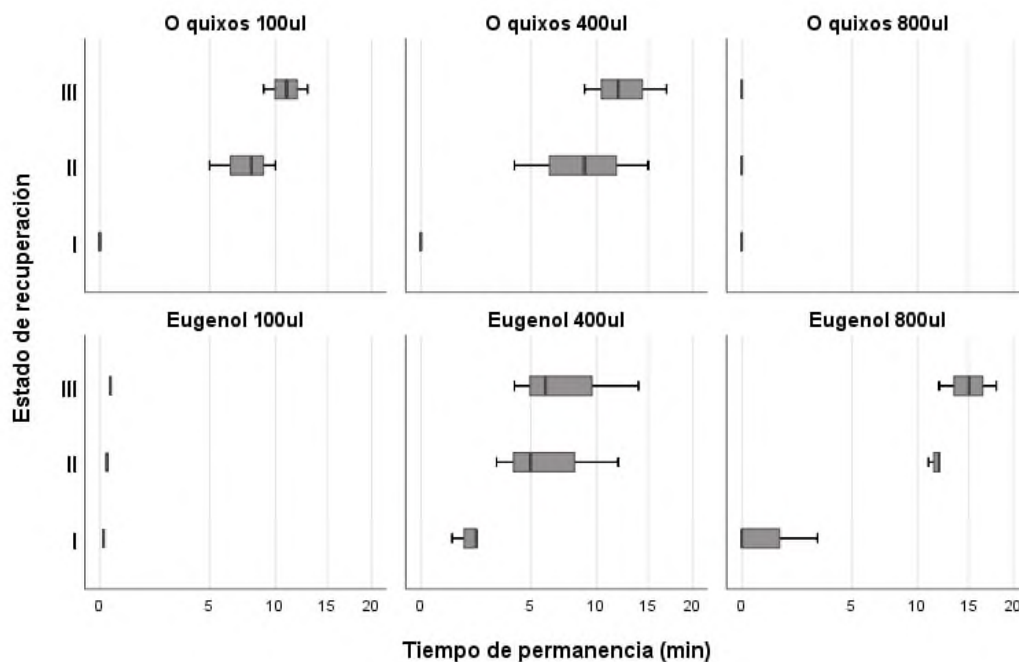


Figura 3. Evaluación del estado de recuperación.

Asimismo, se observa que entre los 8 a 15min los animales están totalmente recuperados, a pesar que este período es heterogéneo, siendo diferente para cada aceite y cada nivel de concentración (ver Tabla 4) aunque es más rápida en EOSA que en EOOQ. Estas diferencias se podrían explicar según Ross et al., (2008) por la variabilidad fisiológica individual.

Se debe poner especial atención a que los tiempos de recuperación, obtenidos en este estudio son más lentos, comparados con otros agentes anestésicos, como 2-fenoxietanol, benzocaína, quinaldina y metasulfonato de tricaina probados por Velasco-Santamaría, Palacios-Ruiz, y Cruz-Casallas, (2008).

Otras aplicaciones de Eugenol mencionadas por Perez-Ribeiro et al., (2010) con *P. brachypomus* con el doble del tamaño del presente estudio ($716,18 \pm 89,41g$) a dosis de $120\mu l.l^{-1}$ muestran tiempos de recuperación más rápidos de aproximadamente 2,30min.

La frecuencia ventilatoria fue expresada como movimientos operculares por minuto (mov.op.min⁻¹) realizada cada 10 minutos durante la exposición a los agentes anestésicos y en los cambios de estado de recuperación, la **Figura 4** muestra que los movimientos operculares tienen un descenso al inducir la anestesia.

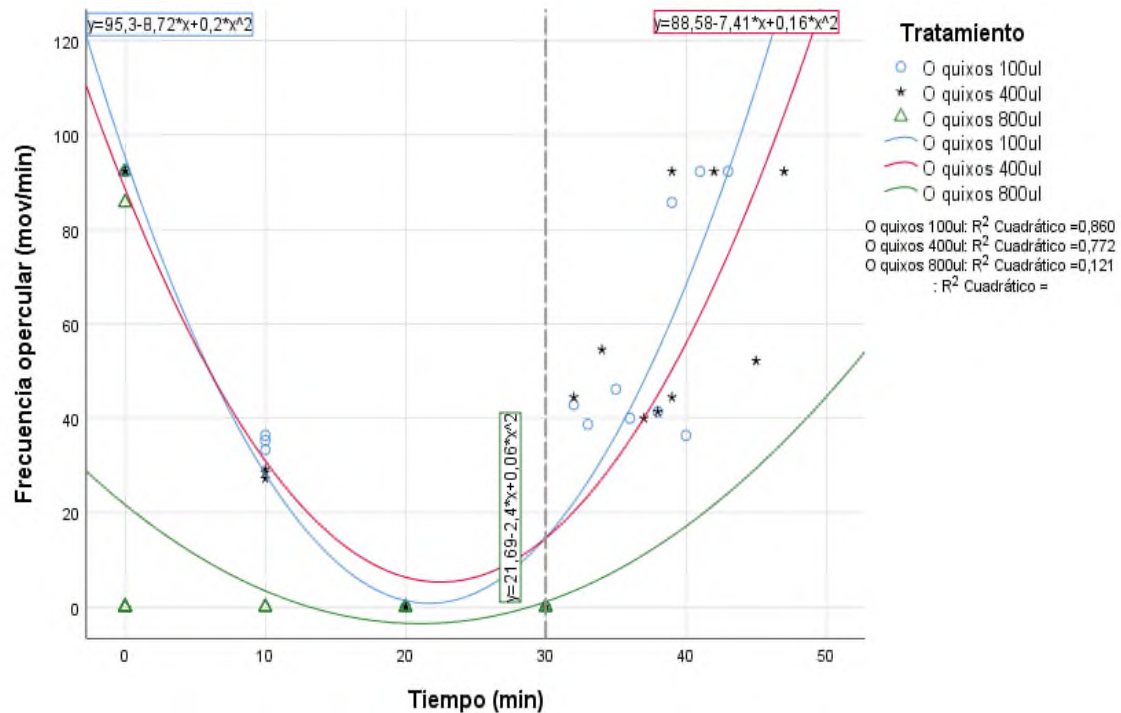


Figura 4. Frecuencia opercular en anestesia y recuperación de EOOQ.

Así, la regresión lineal en el gráfico de dispersión de la figura 4, refleja un comportamiento ventilatorio que se acerca a un modelo matemático polinómico cuadrático con coeficientes de regresión R^2 de 0,860 para 100ul.l⁻¹; y 0,772 para 400ul.l⁻¹, ambos casos significativos ($p \geq 0,05$), es decir hay un período previsible de inducción y recuperación a las dosis mencionadas, mientras para 800ul.l⁻¹ no hay respuesta debido a colapso medular y mortalidad ocasionada a esta concentración.

La **Figura 5** sigue el patrón anteriormente observado en la Figura 4, con un descenso en el movimiento opercular menos pronunciado y coeficientes de regresión R^2 , con 0,137 para 400ul.l⁻¹ y 0,590 para 800ul.l⁻¹ ambos sin una correlación claramente determinada. Además, en el caso de la dosis de 100ul.l⁻¹, no hubo una inducción a anestesia profunda.

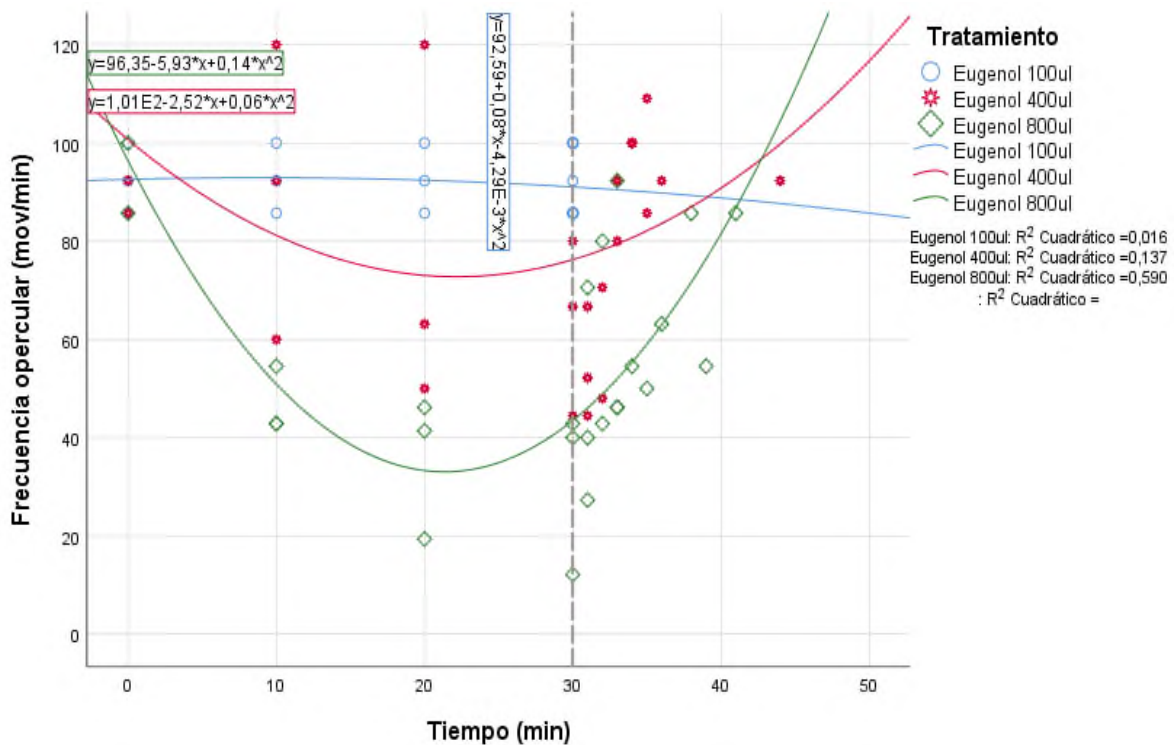


Figura 5. Frecuencia opercular en anestesia y recuperación de EOSA.

Lopes et al., (2018) reportan que en el bagre *Rhamdia quelen* de $17,88 \pm 3,42g$ inducido a anestesia con una dosis de 100ul.l⁻¹ de aceite esencial de *Citrus x aurantium*; presentó valores iniciales de $28,5 \pm 0,6$ mov-op.min⁻¹, y después de 30 minutos de tratamiento una leve disminución a $27,3 \pm 1,3$ mov-op.min⁻¹, estimaciones sumamente bajos comparados a los obtenidos en el actual experimento, pues se tiene valores iniciales en torno a los 95 mov-op.min⁻¹, descensos pronunciados con EOOQ cercanos a los 10 mov-op.min⁻¹ y descensos leves con EOSA mínimos de 35 mov-op.min⁻¹ y valores de recuperación muy similares a los iniciales. La discrepancia numérica con Lopes et al., (2018), se podría deber a que los valores aquí expuestos fueron transformados de manera estándar en cantidad de movimientos operculares por minutos, mientras ellos destacan el registro cronométrico en segundos de 20 movimientos operculares sin transformación aparente alguna; lo cual es corroborado por los datos de Velasco-Santamaría et al., (2008), quienes reportan intervalos de frecuencia opercular en una escala similar de valores que los obtenidos en esta investigación.

La prueba de desafío demostró en la **figura 6** el poder curativo de ambos EOs ante *Saprolegnia* sp con mayor eficacia de EOOQ en la dosis de 400ul.l⁻¹ con un tiempo de 72horas animal totalmente recuperado, a comparación con EOSA en 400ul.l⁻¹ no se curó por completo en el mismo tiempo mencionado anteriormente.

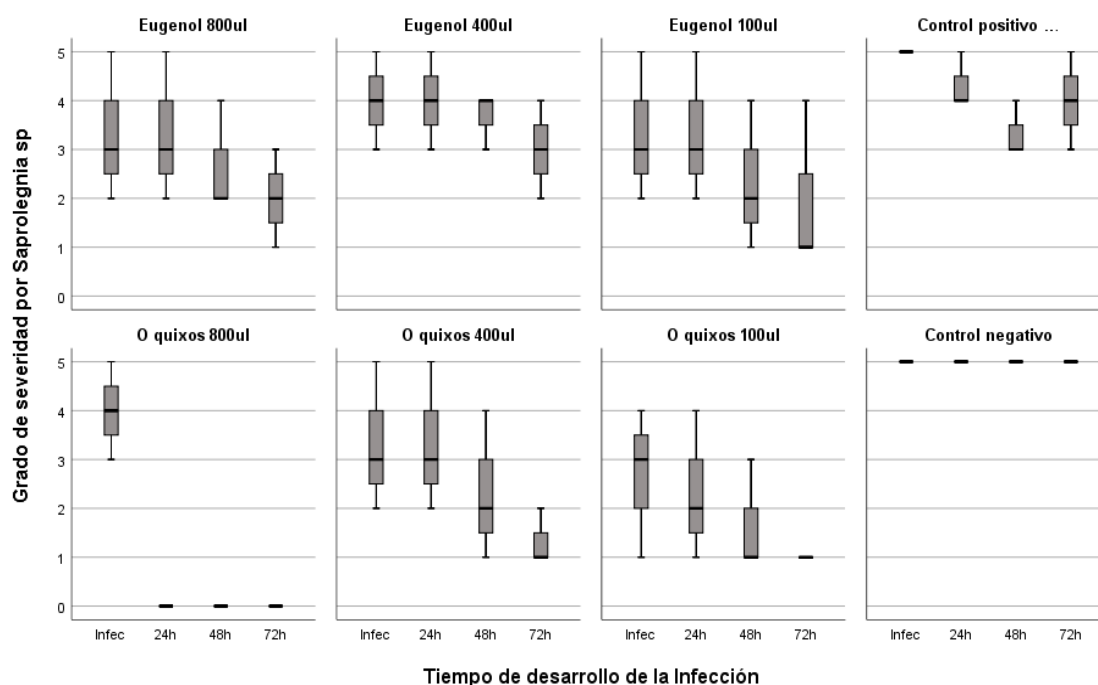


Figura 6. Grado de severidad por *Saprolegnia* sp

Según Torres y Fajardo, (2011) la saprolegniosis se manifiesta mediante la formación de un revestimiento de hifas que *Saprolegnia* sp causa a peces generando mortalidad rápidamente y causando pérdidas económicas significativas. Además, es un organismo saprófito oportunista que suele aparecer cuando los animales se someten a descensos de temperatura y manipulación (Carraschi et al., 2018); por tanto la infección que se puede reproducir con cierta facilidad para la realización de pruebas de control.

De acuerdo con Millán et al., (2012); y Souza et al., (2019), los aceites esenciales tienen un poder antimicrobiano, demostrando ser una alternativa viable para reducir el estrés durante la manipulación y procedimientos no invasivos. Los resultados aquí expuestos en la figura 6, demuestran un sensible descenso de la infección por *Saprolegnia* sp, tanto con EOSA como EOOQ. Coherente con la actividad antimicótica in vitro reportada para EOOQ por Noriega y Dacarro, (2008); y Scalvenzi, Yaguache-Camacho, Cabrera-Martínez, y Guerrini, (2016), y antimicrobiana para EOSA por (Díaz, 2016); siendo esta investigación la primera aplicación *in vivo* para peces nativos de cultivo como *P. brachypomus*.

A partir de los resultados obtenidos de EOOQ se estimó una dosis letal 50 (DL₅₀) de 597µl.l⁻¹ y una dosis segura de 316µl.l⁻¹, con la prueba estadística Probit con una confianza del 95% ($\chi^2_{(7,9)}=0,103$; $p\leq 0,05$), (**Figura 7**).

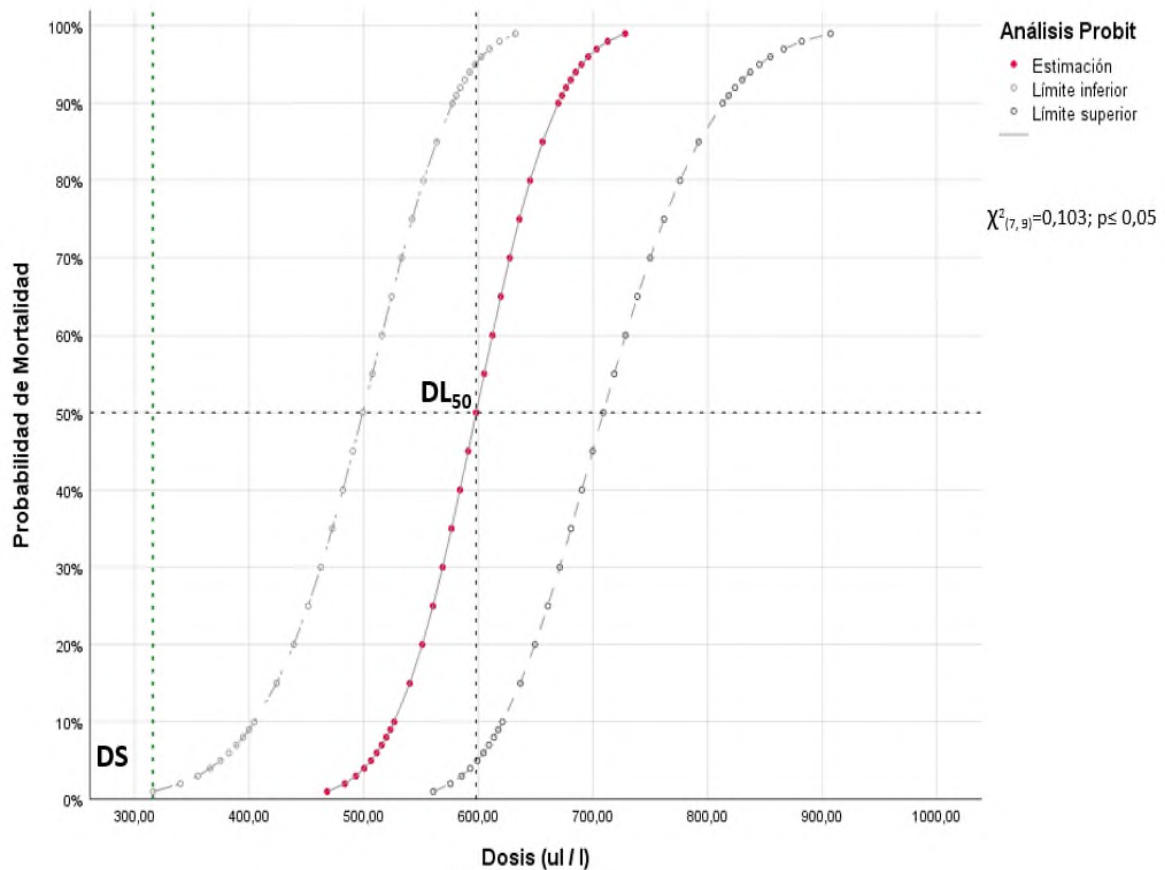


Figura 7. Análisis Probit

Al respecto Marín-Mendez et al., (2012), reportan la aplicación de Eugenol a diferentes dosis exponiendo alevines de *P. brachypomus* ($3,5\pm 0,5g$) durante 96 horas según el protocolo de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos), estimando una dosis letal 50 (DL₅₀) de $18\mu l.l^{-1}$, mientras no hay reportes de estimaciones con EOOQ. Así, los valores mencionados, se contrastan con la DL₅₀ de EOOQ estimada en $597\mu l.l^{-1}$ ($p\leq 0,05$), la cual es muy superior considerando dosis altas en exposiciones agudas de máximo 30 minutos, ya que el objetivo fue determinar la aplicación segura para la acuicultura.

La actividad anestésica identificada de EOOQ se la atribuye a uno de sus componentes principales llamado β -Cariofileno, molécula con propiedades antiinflamatorias sin ser de naturaleza esteroidal mencionado por Scalvenzi et al., (2016). Las acciones antiinflamatorias, tienen repercusiones analgésicas, antipiréticas e inhibidoras de plaquetas;

bloqueando la síntesis de prostaglandinas como es el sistema GABA de acuerdo a Brown, (2010); Ryan, Griffin, y Connor, (2011).

En cuanto a la actividad antimicrobiana, esta puede ser el resultado de una compleja interacción en la mezcla de los aceites esenciales de *O. quixos* según el estudio de Noriega y Dacarro, (2008), como son los derivados del ácido cinámico y sus variantes como el cineol también conocido como eucalipto y de uso antiséptico como enjuague bucal (Díaz, 2016).

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales *Ocotea quixos* y *Syzygium aromaticum* son efectivos bajo distintas dosis logrando inducción anestésica de juveniles de *P. brachypomus*, así como el tiempo de recuperación depende de la dosis de exposición.
- *Ocotea quixos* tiene propiedades anestésicas que pueden ser atribuibles a su contenido de β -cariofileno; mientras que su poder curativo ante la Saprolegniosis se atribuye al cineole y derivados del ácido cinámico.
- Dosis de $800\mu\text{l.l}^{-1}$ de *Ocotea quixos* alcanza un nivel de actividad muy alta lo que determina colapso medular y por tanto la muerte de los animales expuestos. Éste fenómeno contribuyó para establecer el cálculo de DL_{50} y la dosis segura de $316\mu\text{l.l}^{-1}$ (confianza del 95%) y con esto aplicaciones sedativas y antimicrobianas en *P. brachypomus*.

6. RECOMENDACIONES

- Investigar otras alternativas de anestésicos para tener más herramientas disponibles que nos ayuden a mejorar el proceso de manipulación de los peces.
- Utilizar dosis de hasta $300\mu\text{l.l}^{-1}$ de EOOQ, que asegura, según los datos presentados, tanto poder anestésico como antimicrobiano en peces de la especie *P. brachypomus*.
- Profundizar los estudios de toxicidad en peces de aceites esenciales amazónicos como un modelo biológico que identifica riesgos en su utilización práctica.

CAPITULO VI

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, D., Rincón, D., & Poleo, G. (2014). Índices de rendimiento corporal en morocoto *Piaractus brachipomus* cultivado en sistemas Biofloc. *Zootecnia Tropical*, 32(2), 119–130.
- Ajila, C. (2019). *Aplicación de Anestésico artesanal de aceite de clavo de olor (Syzygium aromaticum) en vieja azul (Andinoacara rivulatus)* (UTMACH). Retrieved from http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/13828/1/DE00001_TRABAJODETITULACION.pdf
- Angulo, F. (2000). Agentes antimicrobianos en acuicultura: Impacto potencial en la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 20(6), 217–219.
- Barattini, P. (2012). Antibióticos en acuicultura. In *Resultados preliminares sobre el uso de lodos de pisciculturas sobre suelos agropecuarios origen volcánico de la patagonia* (AYSEN). (pp. 61–68). Retrieved from <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR40081.pdf>
- Brown, L. (2010). Anaesthesia. In *Aquaculture for veterinarians*. L. Brown (ed). *Tarrytown (USA)* (pp. 161–167). Retrieved from <https://www.bookdepository.com/es/Aquaculture-for-Veterinarians-Lydia-Brown/9780080408354>
- Cabello, F. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile : consecuencias para la salud humana y animal. 2004, 1001–1006.
- Cabello, F. ., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917–1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
- Carraschi, S. P., Garlich, N., de Souza-Pollo, A., Brayer, D. I., da Cruz, C., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2018). Isolation of *Saprolegnia aenigmatica* oomycetes and protocol for experimental infection of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Scientiarum, Zoology*, 40(e38186), 1–8. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v40i1.38186>
- CDTER. (2015). Actualización del plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia rural diez de agosto. *Consultora Desarrollo Territorial Cia. Ltda*, (33). Retrieved from <https://odsterritorioecuador.ec/wp-content/uploads/2019/04/PDOT-PARROQUIA-10-DE-AUGUSTO-2015-2019.pdf>
- Chimbor, M., & Lujan, M. (2007). Acuicultura Orgánica: Una moda o el futuro de la acuicultura. Retrieved from AQUAHOY website: <https://aquahoy.com/no-categorizado/52-acuicultura-organica-iuna-moda-o-el-futuro-de-la-acuicultura>
- Díaz, V. (2016). *Efecto inhibidor del aceite esencial de clavo de olor “ Syzygium aromaticum ” como agente antimicrobiano , sobre cepas de Streptococcus mutans. Estudio in vitro* (UCE). Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7375/1/T-UCE-0015-380.pdf>
- González, J. (2010). Farmacología, terapéutica y anestesia de peces. *Memorias de La Conferencia Interna En Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre*, 6(March), 50–62. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/297224525_Farmacologia_Terapeutica_y_Anestesia_de_Peces
- Hazen, K. (2016). Enfermedades infecciosas diagnóstico de laboratorio pruebas de sensibilidad o antibiogramas. Retrieved from Manual MSD website: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/diagnóstico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Hernández, C., Ulloa, J., Vergara, J. A., Espejo, R., & Cabello, F. (2005). Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: Problemas emergentes de salud pública en Chile. *Revista Medica de Chile*, 133(9), 1081–1088.
- Hinostroza, E. M., & Serrano-Martínez, E. (2013). Efecto anestésico del metasulfonato de triclaína en paiches (*Arapaima gigas*) juveniles. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 24(4), 451–458. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i4.2736>
- Holloway, K., & Green, T. (2003). Comités de farmacoterapia Guía práctica. *Organización Mundial de La Salud*, 155.
- Lopes, J. M., Souza, C. D. F., Schindler, B., Pinheiro, C. G., Salbego, J., Siqueira, J. C. De, ... Baldisserotto, B. (2018). Essential oils from *Citrus x aurantium* and *Citrus x latifolia* (Rutaceae) have anesthetic activity and are effective in reducing ion loss in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical*

- Ichthyology*, 16(June), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170152>
- MAG. (2016). Cachama, alternativa de producción para familias de la Amazonía. Retrieved from eltelegrafo website: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/cachama-alternativa-de-produccion-para-familias-de-la-amazonia>
- Marín-Mendez, G. A. M., Torres-Cortes, A., Naranjo-Suárez, L., Chacón-Novoa, R., & Rondón-Barragan, I. (2012). Concentración letal 50 a 96 horas de eugenol en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Orinoquia*, 16(2), 62–66.
- Mesa, M., & Botero, M. (2006). Desempeño fenotípico del número de espinas intramusculares (EIMT), en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). In *Plant and Cell Physiology* (Vol. 34, pp. 2–7).
- Millán, L., Torres, A., Marín, G. A., Ramírez, W., Vásquez, M., & Rondón, I. (2012). Concentración anestésica del eugenol en peces Escalares (*pterophyllum scalare*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 23(2), 171–181.
- Navarro, J., Ramírez, R., & Villagrán, C. (2012). *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales* (Samsara Ed; K. Betancourt & A. Cruz, Eds.). Mexico.
- Noriega, P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.17163/lgr.n7.2008.01>
- Perez-Ribeiro, P., Santos-Costa, L., Eloy, Á. A., Vieira, P., & Solis-Murgas, L. (2010). Aceite de clavo como anestésico para el pez pacú (*Piaractus mesopotamicus*). *Anales de Veterinaria de Murcia*, 26, 69–76.
- Pérez, S. (2018). *Subcomisión de antibióticos y otros antiinfecciosos, Comisión farmacoterapéutica redactaron: documento*. 1–30. Retrieved from http://www.upiip.com/sites/upiip.com/files/01 Susana Melendo-Quin antibiòtic i quan_2.pdf
- Radice, M., Silva, J., Perez, A., Correa, C., Moya, A., & Escobar, A. (2017). Ocotea quixos essential oil: A systematic review about the ethno- medicinal uses, phytochemistry and biological activity. *International Conference on Multidisciplinary Sciences, 2nd Edition*, (2), 1–8. <https://doi.org/10.3390/MOL2NET-02-M>
- Rodríguez, A., Ruiz, N., Domenech, B., & Ruiz, F. (2008). Monitorización de la consciencia mediante el índice biespectral (BIS) en el paciente pediátrico. In *Índice biespectral (BIS) para la monitorización de la consciencia en anestesia y cuidados críticos: guía de práctica clínica*. Retrieved from http://www.soclarid.org.es/files/publicaciones/BIS_guia_clinica0.pdf
- Romero, J., Navarrete, P., & Feijóo, G. (2012). Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In *Institute for Nutrition and Food Technology (INTA)* (pp. 159–185).
- Ross, L. G., Ross, B., & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals* (3rd ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Roubach, R., Gomes, L. C., Leão Fonseca, F. A., & Val, A. L. (2005). Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36(11), 1056–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x>
- Ryan, K. J., Griffin, É. W., & Connor, T. J. (2011). Complementary anti-inflammatory actions of the β 2-adrenoceptor agonist clenbuterol and the glucocorticoid dexamethasone in rat brain. *Journal of Neuroimmunology*, 232(1–2), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.001>
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- San Martín, B., Gallardo, A., Lara, M., & Medina, P. (2015). Manual De Antimicrobianos Y. In *Manual de buenas prácticas en el uso de antimicrobianos y antiparasitarios en salmonicultura chilena* (tercera ed, pp. 1–34). Retrieved from www.veterinaria.org
- Scalvenzi, L., Radice, M., Toma, L., Severini, F., Boccolini, D., Bella, A., ... Luca, M. Di. (2019). Larvicidal activity of Ocimum campechianum, Ocotea quixos and Piper aduncum essential oils against Aedes aegypti. *EDP Sciences*, 26, 1–8. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019024>
- Scalvenzi, L., Yaguache-Camacho, B., Cabrera-Martínez, P., & Guerrini, A. (2016). Actividad antifúngica in vitro de aceites esenciales de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm. y Piper aduncum L. *Bioagro*, 28(1), 39–46.
- Schnick, R., & Meyer, F. (2011). Agencia de Administración de Alimentos y fármacos de Estados Unidos. In *A Guide to Approved Chemicals in Fish Production and Fishery Resource Management* (University). Minnesota.
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suarez, D. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. In *UNIAGRARIA* (pp. 16–17–18). Colombia.
- Sneddon, L. (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21(1), 32–43. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2011.11.009>
- Sørum, H., & L'Abée, T. (2002). Antibiotic resistance in food-related bacteria - A result of interfering with

- the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 43–56. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00241-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00241-6)
- Souza, C. D. F., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., & Lopez, J. F. (2019). Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture: A review. *Frontiers in Physiology*, 10(June). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>
- Souza, C. D. F., Baldissera, M. D., Bianchini, A. E., Gomes, E., Mourão, R., Silva, L., ... Baldisserotto, B. (2017). Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish : a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiol Biochem*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0410-z>
- Torres, G. (2014, March). El aprovechamiento del shpink Ocotea quixos manual de nuevas practicas de recolección. *Fundación Chankuap*, 39. Retrieved from <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Ishpink.pdf>
- Torres, J., & Fajardo, C. (2011). Tratamientos profilácticos anti-saprolegniasis para mejorar la sobrevivencia embrionaria en ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Zootecnia Tropical*, 29(2), 235–239. Retrieved from <http://www.bioline.org.br/pdf?zt11022>
- Varela, J. (2009). *Implantación de un Sistema de Gestión Ambiental basado en el Reglamento Comunitario EMAS en instalaciones acuariológicas* (Coruña). Retrieved from www.veterinaria.org
- Vargas, R. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia En México*, 29(1), 86–96.
- Vázquez, G., Castro, T., Hernández, A., Castro, J., & De Lara, R. (2013). Comparación del efecto anestésico del aceite de clavo, solución salina y solución coloidal en juveniles de *Chirostoma jordani* (Woolman, 1894). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 45(1), 59–66. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000100010>
- Velasco-Santamaría, Y., Palacios-Ruiz, C., & Cruz-Casallas, P. (2008). Eficiencia anestésica de 2-fenoxietanol, benzocaína, quinaldina y metasulfonato de triclaína en alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*). *Rev. MVZ Córdoba*, 13(3), 1435–1445.
- Vieira, J. (2017). *Atividade anestésica do óleo essencial de Cymbopogon flexuosus em alevinos de tambatinga*. Universidade federal do maranhão.
- Zapata-Guerra, N. A., Rueda-Gómez, D., & Rondón-Barragan, S. (2018). Concentración anestésica del mentol en alevinos de cachama blanca *Piaractus brachipomus*; Cuvier, 1818. *Conexión Agropecuaria JDC / SENISPA 2018/ Resúmenes Para El Área de Farmacología y Toxicología*, 611–612.

CAPITULO VII

8. ANEXOS

8.1. REGISTROS FOTOGRAFICOS



Figura 1. Unidad experimental



Figura 2. Test profesional análisis de agua



Figura 3. Muestreo de agua



Figura 4. Colocación del anestésico



Figura 5. Pez en fase de sedación



Figura 6. Pez en fase de anestesia



Figura 7. Pez en recuperación



Figura 8. Aceites esenciales

