



Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud -PUIIS-

INFORME FINAL

Evaluación de los aceites esenciales de boldo, lavanda, salvia sija, y cardamomo como anestésicos para alevines de tilapia

Equipo de investigación

Coordinador	PhD (c). Josué Rodolfo García Pérez.
Investigador	M.Sc. Carlos Humberto Ruiz.
Auxiliar de Investigación I	T.A. Lucia López Ruano.

Centro de Estudios del Mar y Acuicultura -CEMA-
Instituto de Investigaciones Hidrobiológicas -IIH-

Guatemala 14 de febrero 2020.

3. CONTRAPORTADA

Dr. Félix Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Elena Valencia de Abril
Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

PhD (c). Josué Rodolfo García Pérez
Coordinador del proyecto

M.Sc. Carlos Mazariegos Ortiz
Investigador (*Ad honorem*)

T.A Lucía López Ruano
Auxiliar de investigación (*Ad honorem*)

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2019. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.26.1.92. durante el año 2019 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Financiamiento aprobado por Digi: 74,906.38 Financiamiento ejecutado: 64,906.38.

Índice

Índice de contenido general

1.	Resumen	8
2.	Palabras clave	8
3.	Abstract and keyword.....	9
4.	Introducción	10
5.	Planteamiento del problema	13
6.	Pregunta de investigación.....	14
7.	Delimitación en tiempo y espacio	15
8.	Marco teórico	16
9.	Estado del arte	23
10.	Objetivo General	24
11.	Objetivo General	24
12.	Hipótesis.....	25
13.	Metodología	25
14.	Vinculación, difusión y divulgación	31
16.	Discusión.....	47
17.	Conclusiones	49
17.1	Recomendaciones.....	49
18.	Impacto esperado.....	50
19.	Referencias	51
20.	Apéndices	57

Índice de figuras

- Figura 1. Planta de *Elettaria cardamomum* (cardamomo): a) planta y b) semillas
- Figura 2. Planta de *Peumus boldus* (boldo): a) planta de cultivo y b) producto comercial en Guatemala.
- Figura 3. Planta de *Lippia alba* (salvia sija): a) planta de cultivo y b) producto comercial en Guatemala.
- Figura 4. Planta de *Lavandula dentata* (lavanda): a) plantación de lavanda francesa y b) producto fresco comercial en Guatemala.
- Figura 5. Proceso de molienda y almacenamiento del material vegetal a utilizar. Material vegetal de salvia sija.
- Figura 6. Proceso de extracción de aceite esencial técnica de hidrodestilación y cálculo del rendimiento.
- Figura 7. Sistema de Aclimatación y acondicionamiento de los organismos en experimentación.
- Figura 8. Determinación de la concentración letal toxica 50.
- Figura 9. Determinación de tiempo de inducción anestésica (Ti) y tiempo de recuperación (Tr)
- Figura 10. Simulación de transporte a densidad baja: a) empaqueo de los alevines de tilapia para la simulación de transporte y b) evaluación de la mortalidad post transporte.
- Figura 11. Etapas de anestesia III-A, III-B y III-C, con aceite esencial de salvia sija.
- Figura 12. Etapas de anestesia III-A, III-B y III-C, con aceite esencial de boldo.
- Figura 13. Etapas de anestesia III-A, III-B y III-C, con aceite esencial de cardamomo.
- Figura 14. Etapas de anestesia III-A, III-B y III-C, con aceite esencial de lavanda.
- Figura 15. Etapas de recuperación con aceite esencial de lavanda.
- Figura 16. Etapas de recuperación con aceite esencial de salvia sija.

- Figura 17. Etapas de recuperación con aceite esencial de boldo.
- Figura 18. Etapas de recuperación con aceite esencial de cardamomo.
- Figura 19. Socialización del proyecto DIGI 1.92 a miembros de la Agrocadena de la Tilapia en Guatemala.
- Figura 20. Poster presentado en el Capítulo Latinoamericano y del Caribe de la sociedad mundial de acuicultura (LACQUA 2019)
- Figura 21. Flyer promocional del programa de radio: Productos naturales aplicados a la acuicultura. Radio Universidad en el programa Ciencia y Sociedad
- Figura 22. Códigos QR de los videos (Plataforma Youtube): a) Boldo como anestésico en alevines de tilapia y b) Lavanda como anestésico en alevines de tilapia.

Índice de tablas

Tabla 1. Etapas de la sedación en peces

Tabla 2. Rendimientos de extracción de aceites esenciales de plantas estudiadas

Tabla 3. Concentración letal media de las plantas a utilizar.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos en el transporte simulado, utilizando aceite de boldo y cardamomo.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos en el transporte simulado, utilizando aceite de salvia sija y lavanda.

Evaluación de los aceites esenciales de boldo, lavanda, salvia sija, y cardamomo como anestésicos para alevines de tilapia.

1. Resumen

En el presente se utilizaron los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Peumus boldus* (boldo), *Lippia alba* (salvia sija) y *Lavandula dentata* (lavanda), como anestésicos para el transporte de alevines de *Oreochromis niloticus* (tilapia gris). El aceite esencial con mayor eficiencia fue salvia sija, ya que la inducción a la etapa narcosis profunda, fue en rango de 30 - 70 $\mu\text{L/L}$, con tiempo por debajo de los 3 minutos, seguido por boldo, cardamomo y lavanda, con rangos de concentraciones de 40 – 80 $\mu\text{L/L}$ y 60 - 80 $\mu\text{L/L}$, respectivamente, con tiempo por debajo de los 5 min.

Los tiempos de recuperación aumentaron conforme aumentaron las concentraciones del aceite esencial utilizado. El aceite que cumplió con el criterio de recuperación de 5 min post anestesia, fue las concentraciones de lavanda de 20 – 60 $\mu\text{L/L}$, el resto de aceites en las mismas concentraciones el tiempo de recuperación fluctuó de 6 – 11 min. La concentración optima por cada aceite evaluado fue: Salvia sija 30 $\mu\text{L/L}$, boldo 60 $\mu\text{L/L}$, cardamomo 80 $\mu\text{L/L}$ y lavanda 70 $\mu\text{L/L}$.

Con respecto al transporte simulado, los parámetros físico-químicos del agua no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos sometidos bajo las mismas condiciones experimentales. El tratamiento control, la mortalidad a las 12 horas fue 5%, el resto de tratamientos no presento mortalidad. Al finalizar la simulación de transporte 24 h, el aceite con mayor mortalidad durante el transporte fue cardamomo 10%, seguido por lavanda 8%, control 7% y salvia sija 6%. El único aceite que no reportó mortalidad a las 24 horas fue boldo.

2. Palabras clave: acuicultura, *Oreochromis niloticus*, transporte, anestesia y sedación.

3. Abstract and keyword

The essential oils of *Elettaria cardamomum* (cardamom), *Peumus boldus* (boldo), *Lippia alba* (salvia sija) and *Lavandula dentata* (lavender) were used as anesthetic agents for *Oreochromis niloticus* fingerlings (gray tilapia) transportation. The essential oil with higher efficiency was salvia sija, due to the induction time was less than 3 min for deep narcosis with a range of 30 - 70 $\mu\text{L} / \text{L}$, followed by boldo, cardamom and lavender, with ranges of 40-80 $\mu\text{L} / \text{L}$ and 60-80 $\mu\text{L} / \text{L}$, respectively, with induction time less than 5 min.

Recovery times increased as the concentrations of the essential oil increased as well. An efficacious anesthetic should induce anesthesia within 15 min and preferably <3 min with a recovery of 5 min or less. Lavender concentrations of 20 - 60 $\mu\text{L} / \text{L}$, was the only essential oil to accomplish the criteria described above. The rest of essential oils recovery time ranged from 6 - 11 min. The optimum concentration for each essential oil was salvia sija 30 $\mu\text{L} / \text{L}$, boldo 60 $\mu\text{L} / \text{L}$, cardamom 80 $\mu\text{L} / \text{L}$ and lavender 70 $\mu\text{L} / \text{L}$.

According with the simulated transportation, the physico-chemical parameters of the water showed no significant differences between the groups under the same experimental conditions for each treatment. The control treatment, mortality at 12 hours was 5%, the rest of the treatments did not show mortality. At the end of the 24 h transportation, the essential oil with the highest mortality during transportation was cardamom with 10%, followed by 8% lavender, 7% control and 6% salvia sija. The only essential oil did not report 24-hour mortality was boldo.

Keyword: aquaculture, *Oreochromis niloticus*, transportation, anesthesia y sedation.

4. Introducción

La acuicultura a nivel global ha crecido a lo largo de los últimos 50 años. La producción mundial ha aumentado de 28.3 millones de toneladas métricas en 1960 a 73.8 millones de toneladas en 2014. Se considera como el sector de producción de alimentos para animales que crece más rápido y representa actualmente casi la mitad (45.6%) del consumo mundial de pescado alimentario (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación, 2016). La producción de tilapia a nivel mundial crece anualmente desde el año 2000 aproximadamente 4.7%. Para el año 2016 se reportado una producción 5,897,652 Tm, siendo los principales países productores China, Egipto, Indonesia, Brasil, Filipinas y Tailandia, entre otros (Fitzsimmons, 2013; FAO, 2016; FAO, 2018).

En Guatemala la industria acuícola, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año 2017, reporta que durante el 2015 se produjo alrededor de 13,500 Tm de tilapia, lo que trajo consigo un beneficio económico de 51,312,000 USD.

Debido al crecimiento exponencial en la producción nacional, existe una fuerte demanda para la producción de alevines de tilapia para engorde. Actualmente, se produce más de 13 millones de alevines anuales, para satisfacer la demanda de producción de tilapia a nivel local (Agrocadena de la tilapia de Guatemala, 2018). Los centros de producción de alevines de tilapia en Guatemala, no poseen métodos estandarizados sobre el manejo adecuado en el transporte de organismos vivos. Generalmente su transporte, se realiza en bolsas plásticas de dimensiones variadas, con incorporación de agua y oxígeno comprimido de uso industrial. Sin embargo, a pesar que el proceso de empaque se realiza apropiadamente, existe diversos factores que causan mortalidad de los alevines durante el transporte, especialmente cuando los tiempos de transportes son mayores a las 6 horas. Las causas principales de estrés durante el transporte son debido al aumento de biomasa por unidad de agua, deficiencia de oxígeno, acumulación de productos nitrogenados especialmente amonio y amoníaco ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4$), entre otras.

Los efectos del estrés se caracterizan por baja capacidad inmunológica, daño epitelial en branquias, por concentraciones altas de productos de desecho, pérdida de mucus, escamas, reducción de glucosa, proteína en sangre (Moyle & Cech, 1998).

Conjuntamente, los productores de tilapia de engorde también se ven afectados debido que los organismos que logran sobrevivir al transporte y aclimatación en el sistema de cultivo tienden a incrementar la susceptibilidad de enfermedades e incluso mortalidad post transporte, a causa del estrés manejado durante el transporte.

Algunas soluciones propuestas para reducir el estrés en el transporte, que son utilizada en la actualidad son reducir la carga animal, aunque esto conlleva a un alza en el precio de los alevines de tilapia, debido que se utiliza mayor cantidad de agua, oxígeno de uso industrial, número de bolsas. Por lo tanto, los productores de alevines de tilapia deben de buscar alternativas para reducir la mortalidad durante y post transporte, y al mismo tiempo reducir sus costos fijos.

El uso de anestésicos para reducir el estrés y la mortalidad es una práctica común en la acuicultura, especialmente para el transporte de organismos acuáticos (Barton, 2002; Cunha, et al., 2010), aunque muchos de ellos provocan efectos secundarios post anestesia, y se debe de considerar varios factores como: costo, efectos secundarios, condición de empaque, disponibilidad entre otros, para su utilización (Cho & Heath, 2000). En la actualidad existe una gama de compuestos que son utilizados para inducir anestesia en peces, los más utilizados son éter, barbitúricos, quinaldina, metanosulfonato de triclaína (MS 222), clorbutanol, benzocaína, entre otros (Zahl, Samuelsen, Kiessling, 2012).

Aunque en la última década muchas de esas sustancias han sido prohibidas por los efectos secundarios y su grado de residualidad, provocando el rechazo de los productos hidrobiológicos que han utilizado dichos compuestos (Palić, Herolt, Andreasen, Menzel, & Roth, 2006). Por lo tanto, se ha promovido el uso de sustancias menos tóxicas y amigables con el ambiente, siendo la herbolaria medicinal potenciales sustancias para su uso (Citarasu, 2010; Harikrishnan, Balasundaram, & Heo, 2011). Algunas de las familias de plantas que han presentado efectos anestésicos en peces de diversas especies y edades como las familias Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, las cuales han sido utilizadas para *Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, *Paralichthys orbignyanus*, *Brycon cephalus*, *Rhamdia quelen*, entre otras (Hoseini, 2018). Las plantas más utilizadas como aceites esenciales o extractos acuosos, más utilizados en la industria acuícola son: 1. Aceite de clavo o su compuesto activo "eugenol" (Inoue, Santos, & Morales, 2003; Goncalves, Santos, Fernandes, & Takahashi, 2008), 2. Aceite de Menta o su compuesto

activo "mentol" (Facanha & Gomes, 2005, Goncalves et al., 2008; Simões & Gomes 2009), entre otros.

En Guatemala la herbolaria medicinal con efectos sedativos es muy bien documentada principalmente para seres humanos y algunos animales terrestres o de compañía (Cáceres, 1996). Aunque no se ha realizado investigación sobre el uso de plantas como agentes anestésicos para el transporte de animales acuáticos. Se conoce empíricamente que se utiliza el aceite de clavo y el aceite del árbol de té, pero no han sido validados por el sector acuícola en Guatemala, debido a la ausencia de información científica. Por lo tanto, la presente investigación pretendió evaluar el uso de aceites esenciales de *Elettaria cardamomum*, *Peumus boldus*, *Lippia alba*, *Lavandula dentata* como anestésicos en el transporte de alevines de tilapia.

5. Planteamiento del problema

Durante la última década, el cultivo de tilapia se ha convertido de gran importancia comercial a nivel mundial, la producción global para el año 2013 fue cerca de 4,207,900 TM (Fitzsimmons, 2013), y se aumenta a una tasa del 2.3% anual. En Guatemala la producción asciende a 13,504 TM para el 2015 (FAO, 2016). Debido al crecimiento exponencial en la producción nacional, existe una fuerte demanda para la producción de alevines de tilapia para engorde. Según el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (Maga) la producción de alevines asciende a más de 12 millones anuales (Díaz, 2012). En la actualidad en los centros de producción de alevines de tilapia en Guatemala, no existen métodos estandarizados sobre el manejo adecuado en el transporte de organismos vivos. Generalmente su transporte, se realiza en bolsas plásticas de dimensiones variadas, con incorporación de agua y oxígeno comprimido de uso hospitalario.

Sin embargo, a pesar que el proceso de empaque se realiza apropiadamente, la calidad del agua tiende a deteriorarse, causando la mortalidad de los alevines, especialmente cuando los tiempos de transportes son mayores a las 6 horas, esto como resultado al estrés de los organismos acuáticos durante el transporte.

Las causas principales de mortalidad en el transporte son debido al aumento de estrés por biomasa alta por unidad de agua, deficiencia de oxígeno, acumulación de productos nitrogenados especialmente amonio y amoníaco ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4$), tensión y agotamiento, entre otras. Los efectos del estrés se caracterizan por baja capacidad inmunológica, daño epitelial en branquias por concentraciones altas de productos de desecho. Al mismo tiempo, los productores de tilapia de engorde también se ven afectados debido que los organismos que logran sobrevivir al transporte y aclimatación en el sistema de cultivo tienden a incrementar la susceptibilidad de enfermedades e incluso mortalidad post transporte, a causa del estrés manejado durante el transporte.

Algunas soluciones propuestas en la actualidad son de reducir la carga de organismos en las bolsas de transporte, aunque esto conlleva aumentar la cantidad de agua de transporte,

simultáneamente se utiliza mayor cantidad de oxígeno puro, mayor número de bolsas de despacho y sobre todo mayor espacio en los vehículos de transporte, provocando un alza en el precio de los alevines de tilapia. Por lo tanto, los productores de alevines de tilapia deben de buscar alternativas para reducir la mortalidad durante y post transporte, y al mismo tiempo reducir sus costos fijos.

6. Pregunta de investigación

Pregunta general:

- Los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum*, *Peumus boldus*, *Lippia alba*, *Lavandula dentata*, poseen capacidad anestésica para el transporte de alevines de tilapia.

Preguntas específicas:

- Cuál será la dosis letal media (LD50) de los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum*, *Peumus boldus*, *Lippia alba*, *Lavandula dentata*, en alevines de tilapia
- Qué concentración de los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum*, *Peumus boldus*, *Lippia alba*, *Lavandula dentata*, sirven como anestésico para alevines de tilapia.
- Qué concentraciones en $\mu\text{L/L}$ de los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum*, *Peumus boldus*, *Lippia alba*, *Lavandula dentata*, se deberá utilizar para reducir la mortalidad durante y post transporte con alevines de tilapia.

7. Delimitación en tiempo y espacio

Delimitación en tiempo:

El estudio se realizó en nueve meses y fue dividido en tres fases:

- Primera fase: Obtención y procesamiento del material biológico, dicha fase comprendió: la elaboración de los aceites esenciales, aclimatación y acondicionamiento de los organismos para las etapas dos y tres, conjuntamente se determinó la dosis letal media. Esta fase tuvo una duración de abril a octubre 2019.
- Segunda fase: Concentración anestésica para cada uno de los aceites esenciales propuestos. Dicha fase comprendió evaluar las etapas de anestesia descritas por Zahl, Samuelsen & Kiessling, (2012), y duró de mayo a diciembre 2019. Las variables evaluadas fueron tiempo, estado de anestesia, tiempo de recuperación al anestésico y mortalidad post inducción a la anestesia.
- Tercera fase: Simulación de transporte, para esta fase se realizaron transportes simulados de alevines de tilapia de 6 a 24 horas. Se determinará sobrevivencia durante y post transporte. El tiempo para evaluar dicha actividad fue en diciembre 2019. Al finalizar la simulación de transporte, los alevines fueron colocados en condiciones de cultivo fase engorda, y se evaluó la mortalidad durante una semana de cultivo, esta fase duró de diciembre.
- Los meses de noviembre 2019 a febrero 2020, fueron utilizados para la escritura del proyecto final, así como la presentación de los resultados finales en eventos académicos nacionales e internacionales. Cabe resaltar que el tiempo y la delimitación de espacio del presente proyecto de investigación fue de acuerdo a la ejecución presupuestaria por parte de tesorería de la unidad académica, y a los eventos de cierre de la universidad en el mes de agosto 2019.

7.2 Delimitación espacial:

Todas las actividades se realizaron en el Centro de Estudios del Mar y Acuicultura de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

8. Marco teórico

Tilapia biología general

La tilapia fue derivada de la palabra africana que significa "pescado" y posee un gran número de especies de agua dulce y salobre, todas pertenecen a la familia Cichlidae. Es originaria de África (Oriente Medio). La tilapia se divide en tres géneros, *Tilapia*, *Satrottherodon* y *Oreochromis* (El-Sayed, 2006). Posee una forma similar a la del pez luna o del pez crappie. Se identifica fácilmente mediante una línea lateral interrumpida característica de la familia Cichlidae. Su cuerpo se comprime lateralmente con largas aletas dorsales que son: la columna vertebral, la pelvis y las aletas anales. Esta especie su preferencia alimenticia es omnívora, y está sujeta a cambios diurnos y estacionales (El-Sayed, 2006). Las tilapias son a menudo consideradas como filtradores, debido a la eficiencia de consumir fitoplancton, aunque no son verdaderos filtradores como el caso de la mayoría de ciprinidos (Popma & Masse, 1999).

Transporte y empaque de alevines de peces

El transporte de peces vivo constituye una práctica común en muchas granjas y se utiliza, por ejemplo: 1. Después de la cosecha, 2. Durante la clasificación para trasladar los peces a un lugar de almacenamiento a corto plazo, 3. Durante la comercialización y el manejo de fases de alevines. La duración del transporte varía según la distancia a cubrir y los métodos utilizados: 1. Dentro de la granja, la duración del transporte es generalmente muy corta (unos minutos) o corta (hasta 30 minutos); 2. Fuera de la granja, el tiempo de transporte es normalmente más largo, variando desde unas horas hasta uno o dos días. Ésta actividad tiene que realizarse en horas

frescas o tempranas, para evitar cambios bruscos de temperatura. Se debe trasladar en vehículo, para evitar altas mortalidades.

Usualmente se utilizan desinfectantes como yodo, BKC o formalina que evitan las infecciones causadas por parásitos y/o bacterias del agua en los organismos durante el transporte.

En la acuicultura a menudo se utilizan bolsas grandes de plástico para transportar los alevines. Los peces se transportan dentro de un reducido volumen de agua situado en la porción inferior de la bolsa, con el volumen restante ocupado con oxígeno comprimido de uso hospitalario. El gas a presión permite la difusión lenta del oxígeno en el agua.

Se debe de colocar una carga de 50 – 70 gramos de biomasa por litro de agua en las bolsas plásticas (60 cm x 90 cm x 0.8 mm), aunque la cantidad de transporte dependerá de la especie, variedad de pez, calidad de agua inicial, alimenticia y variables ambientales durante el transporte.

Para el transporte de los alevines de tilapia hay que equilibrar la temperatura del agua, con un poco de hielo, en rangos entre 22°C y 24°C. Se debe de realizar un conteo de organismos en un litro de agua, pesando un kilogramo de alevines para obtener la cantidad promedio de carga de transporte.

Anestesia de peces: procedimiento habitual para el transporte

En general los anestésicos y/o sedativos pueden definirse como la acción de las sustancias para reducir temporalmente la sensibilidad y reflejos de los individuos. Los anestésicos ideales son aquellos que actúan rápidamente, con poca hiperactividad, a dosis bajas y con períodos cortos de recuperación (Ross & Ross, 1999, Coyle, Durborow, & Tidwell, 2004). En la acuicultura es indispensable elegir anestésicos con alta eficiencia, disponibilidad y bajo costo, además que no sean un factor tóxico para los peces y el personal que los aplica.

Entre los anestésicos más empleados en peces se encuentran la benzocaína, metomidato, etomidato, fenoxietanol, quinaldina (Coyle, Durborow, & Tidwell, 2004), Isoeugenol (Bosworth, Small, Gregory, Kim, & Black, 2007) MS-222 (metanosulfonato de triclaína) y aceite de clavo (eugenol) (García-Gómez, De la Gándara, & Raja 2002, Ghazilou, Saedi, Chenary, Nateghi, Haghi, & Mohammad, 2010; Peake, 1998).

Sedación en peces

La sedación es importante para la manipulación en las diferentes actividades que se hacen en una granja acuícola como los muestreos, tratamiento de enfermedades.

Según (González, 2010) la sedación es el estado en el que el organismo no manifiesta actitudes de agitación y no demuestra una preocupación ante su entorno, por estresante que este pudiera ser. Este estado puede minimizar el impacto fisiológico de cambios ambientales, siendo una herramienta importante en el manejo de los peces.

Se deben de observar los distintos movimientos de los peces durante la dosificación, lo que indicara el plano de sedación o anestesia en que se encuentran, estos comportamientos se definen en la tabla 1.

Tabla 1: etapas de la sedación en peces

ESTADIO	PLANO	ESTADO	COMPORTAMIENTO
I	1	Sedación ligera	Tras un pequeño periodo aparente de excitación, los peces reducen su movimiento.
	2	Sedación profunda	Los peces están prácticamente quietos y solo responden a estímulos fuertes. La analgesia es ligera.
II	1	Anestesia ligera	Los peces empiezan a perder el equilibrio, pero luchan por no ponerse de costado. La analgesia es local.
	2	Anestesia profunda	Los peces se echan de costado, al levantarlos la cola y las aletas caen hacia abajo. Respiración esporádica.
III		Anestesia quirúrgica	Completa ausencia de tono muscular y respuesta a estímulos.
IV		Colapso medular	Cese de la respiración durante varios minutos. Paro cardiaco. Muerte del animal.

Fuente: Prados, (2005).

Mortalidades asociadas al post transporte

Las alteraciones producidas a los individuos por los efectos del transporte en algunos casos se asocian con mortalidades después de la siembra de los organismos. La mortalidad ocurrida dentro de los primeros siete días post transporte generalmente es considerada por un transporte inadecuado, reflejando condiciones malas de la calidad de agua, aumento del estrés

reflejado en el desencadenamiento de procesos patológicos que conducen a pérdidas por agentes infecciones post transporte (El-Sayed, 2006).

Plantas con potencial sedante-hipnótica:

Las plantas medicinales continúan teniendo una gran importancia, ya que poseen principios activos que ayudan aliviar y/o curar ciertas patologías en la salud pública y animal. Dentro de las principales características de las plantas medicinales, son las que poseen un potencial sedante e hipnótico.

Las sustancias sedantes son aquellas que disminuyen la actividad, modera la excitación y calma al que la recibe, mientras una sustancia hipnótica produce somnolencia y facilita el inicio y el mantenimiento de un estado de sueño parecido al normal.

A este efecto se le ha llamado hipnosis, sin que esto tenga relación con ese estado inducido artificialmente. Existe una gran diversidad de plantas con capacidad sedante e hipnótica, entre algunas de mayor uso en Guatemala se encuentran:

Elettaria cardamomum

El nombre común cardamomo (Figura 1), es un miembro de la familia del jengibre (Zingiberaceae). A veces se la conoce como la "reina de las especias" junto con la pimienta negra (*Piper nigrum*). Los extractos de cardamomo tienen actividad antiinflamatoria, y en altas concentraciones pueden ser anestésicos. El aceite de cardamomo es generalmente rico en monoterpenos, monoterpenos oxigenados, acetatos, sesquiterpenos y estrés ácidos grasos. Dentro de los cuales son más abundantes 4-terpineol, 1:8 cienol, seguido por α -Terpinolene, p-Cymene, α -Terpinene, α -Tujene, α -Pinene, Sabinene, γ -Terpiene, Linalool, Menth2en-1-ol, α -Terpineol y Endbornyl acetato, entre otros (Ríos, Lopera, Caicedo, Granda, Montoya, Restrepo, & Suárez, 2007; Mahmud, 2008).

a)

b)



Figura 1: Planta de *Elettaria cardamomum* (cardamomo): a) planta y b) semillas

En Guatemala la producción de cardamomo se concentra principalmente en cinco departamentos: Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Huehuetenango y Quiché, en todos los departamentos productores, se estima que en 2012 se alcanzó una producción de 38.000 Tm, lo que situó al país como el principal exportador mundial de esta especia (El Proyecto AdA-Integración, 2014).

Peumus boldus

Es la única especie del género monotípico *Peumus*, de la familia de las monimiáceas, comúnmente conocida como boldo (Figura 2), posee una gran variedad de usos medicinales, entre los principales se reportan actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, citotóxico, hipotensor, espasmódico entre otras. Los principales compuestos bioactivos de las hojas de boldo son flavonoides, alcaloides y aceites esenciales (Silva, Jopia, Edwards, Lemp, de la Fuente, & Lissi, 2002). El aceite esencial posee una gran variedad de metabolitos volátiles entre lo que destacan Boldine, ascaridole, p-Cymene, Cineol, Limonene y terpinene (Vogel, Razmilic, Muñoz, Doll, & San Martin, 1999). Existen otros estudios que también reportan dentro de los compuestos mayoritarios: abietane, diterpenoides y diterpenoides 8,13-epoxi-labd-14-en11 (Alasbahi, &, Melzig, 2010).

a)

b)



Figura 2: Planta de *Peumus boldus* (boldo): a) planta de cultivo y b) producto comercial en Guatemala.

Lippia alba

Planta medicinal nativa de América, conocida como Salvia Sija o Santa María (Figura 3), crece de México hasta el Sur América y el Caribe, en Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Sacatepéquez, Sólola y Suchitepéquez (Cáceres, 1996; Standely & Williams, 1970).

El tamizaje fotoquímico demuestra la presencia de: monoterpenos (Geraniol, neral, β -cariofileno, metilheptona, citronelal, borneol, óxido de cariofileno, allo-aromadendreno, cis- α bisaboleno, germacreno -D Piperitone, timol, borneol, alcanfor, 1.8-cineole, citronellol, geranial, linalool, myrcene, neral, piperitone, sabinene, 2-undecanone), sesquiterpenos (α -Muuroleno, β -cariofileno, β -cubebeno, β -elemeno, γ -cadineno, alo-aromadendreno, óxido de cariofileno), flavonoides (Flavonoides 4-sulfatos), y otros componentes (taninos, recinas, mucilagos, alcaloides, saponinas, esteroides) entre otros componentes (Jayves-Reyes et al., 2006; Pérez-Sabino et al., 2011)

a)

b)



Figura 3: Planta de *Lippia alba* (salvia sija): a) planta de cultivo y b) producto comercial en Guatemala.

Lavandula dentata

Planta medica conocida como lavanda, el género *Lavandula* pertenece a la familia de las Lamiaceae, actualmente se encuentra distribuida alrededor del mundo, no como planta nativa, si no como especie introducida. En general se utiliza para el tratamiento de diversas enfermedades. El constituyente principal del aceite de lavanda es 1.8 – cineole, cis-verbenol, p-cymen-8-ol y fechone (Dob, Dahmane, Tayeb, & Chelghoum, 2005). Aunque también se ha reportado Mytenal, pinocarvone, a-terpineol y a-terpinen-7-al (Marqués-Camarena, 2015).

Las proporciones de cada metabolito presente en la planta, dependerá de procesos adaptativos en las condiciones ecológicas encontradas.

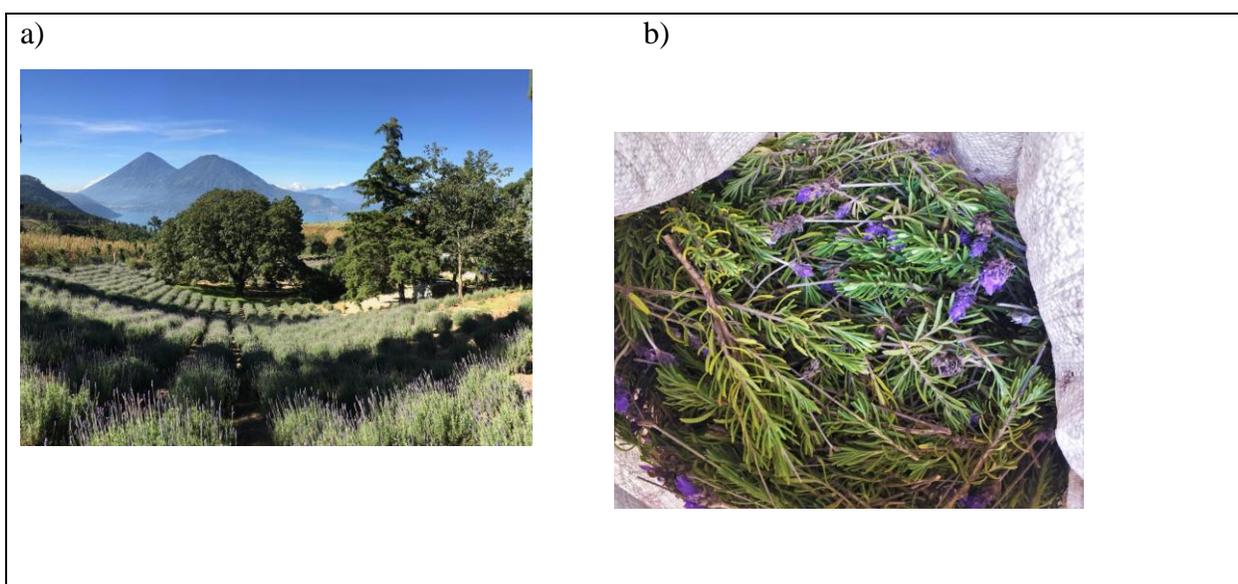


Figura 4: Planta de *Lavandula dentata* (lavanda): a) plantación de lavanda francesa y b) producto fresco comercial en Guatemala.

El cultivo de lavanda en Guatemala aun es insípido, principalmente la producción se concentra en el departamento de Sacatepéquez y Sololá, siendo este último el de mayor producción.

9. Estado del arte

Una de las terapias alternativas más utilizadas a nivel mundial es el uso de fitoterapéuticos, los cuales cumplen con funciones inmunológicas, antibacterianas y anestésicas a través de sus estructuras celulares (Sutili, et al., 2017). Las plantas contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y hongos. Existen más de 40 extractos esenciales que sirven como fitoterapeutas para el tratamiento de las enfermedades acuícolas (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn 2009; 2010; Silveira 2006), y como agentes anestésicos (Cárdenas, Toni, Martos-Sitcha, Cárdenas, de las Heras, Baldisserotto, Heinzmann,

Vázquez, &, Mancera, 2016; Rivas, Cordeiro, Cedraz, Baldisserotto, Heinmann, Couto, & Copatti, 2017; Salbego et al., (2014).

Los compuestos anestésicos en las plantas, se encuentran generalmente en el aceite esencial y extractos secos, obtenidos a partir de hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos. La mayoría de los compuestos también poseen actividad antimicrobiana encontrados en plantas, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, alcaloides, taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, terpenoides, simarubalidanos, melicianinas, limonoides, lactosas y lignanos entre otros (Jayves-Reyes et al., 2006). Todos los metabolitos secundarios generalmente ejercen una función inmunológica, antibacteriana, antioxidante, antifúngica, analgésica, anticancerígena, insecticida, anticoccidial y como promotores de crecimiento (Tipu, Pasha, & Alie, 2002).

Estudios han reflejado que el uso de *Lippia alba* a concentraciones de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ reduce la tasa de ventilación del bagre plateado durante los primeros 30 min de transporte, lo que indica una tasa menor de consumo durante su transporte (Salbego et al., 2014).

10. Objetivo General

- Validar el uso de los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum*, *Peumus boldus*, *Lippia alba*, *Lavandula dentata*, como anestésicos para el transporte de alevines de tilapia.

11. Objetivo General

- Calcular la concentración letal media (CL50) de los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum*, *Peumus boldus*, *Lippia alba*, *Lavandula dentata*, en alevines de tilapia.
- Determinar la concentración del aceite esencial como anestésico en alevines de tilapia.
- Establecer la concentración (mg/L) adecuada de los aceites esenciales en el transporte de los alevines de tilapia para reducir mortalidad, durante y post transporte.

12. Hipótesis

Al menos un aceite esencial presenta capacidad anestésica en alevines de tilapia, reduciendo la mortalidad durante y post transporte de alevines de tilapia

13. Metodología

Colecta y procesamiento del material vegetal

Para determinar el efecto de los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Peumus boldus* (boldo), *Lippia alba* (salvia sija) y *Lavandula dentata* (lavanda) como agentes anestésicos para el transporte de alevines de tilapia, *Oreochromis niloticus*, se

utilizó material vegetal de cultivos comerciales y/o productos certificados. El material vegetal de *E. cardamomum* se colectó únicamente el fruto con cascara, en el departamento de Alta Verapaz. Para *L. dentata* se colectó la planta con flor, en el departamento de Sololá, *L. alba*, se colectó únicamente hojas, en el departamento de Guatemala, en la colección de plantas medicinales del Centro experimental docente de agronomía de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (CEDA-FAUSAC), y finalmente para el material vegetal de *P. boldus* se compraron hojas secas en la Droguería y laboratorios Quinfica, el cual fue un producto de importación certificado. Todo el material vegetal fue secado en un horno de aire forzado a temperatura de 45°C, hasta alcanzar una humedad relativa $\leq 12\%$. Posteriormente, el material vegetal seco fue molido para obtener partículas de tamaño de 300-500 μm (Figura 5), exceptuando la semilla de cardamomo ya que la cubierta de la semilla es muy fibrosa, quedando de tamaño por arriba de 500 μm . Todo el material vegetal fue almacenado en bolsas herméticas, con su ficha de identificación de procedencia y colecta.



Figura 5: Proceso de molienda y almacenamiento del material vegetal a utilizar. Material vegetal de salvia sija.

Obtención del aceite esencial

Para la obtención del aceite esencial, se utilizó la técnica de hidrodestilación directa (Figura 6), con agua como agente extractor de aceites esenciales (Sarker & Nahar, 2012). El aceite fue colectado en *n*-pentano, y se dejó reposar por 24 horas en campana de extracción de gases. Al finalizar los aceites fueron pesados para determinar el rendimiento de cada aceite esencial. Al finalizar fueron almacenados en viales herméticos de vidrio color ámbar a

temperatura ambiente. Previo a utilizar cada uno de los aceites esenciales obtenidos, se diluyeron 1:10 en alcohol etílico 95%, como solución de trabajo.



Figura 6: Proceso de extracción de aceite esencial técnica de hidrodestilación y cálculo del rendimiento.

Aclimatación y acondicionamiento de los organismos.

Los alevines de tilapia fueron aclimatados durante siete días previo a ser utilizados en cada uno de los experimentos diseñados. Las condiciones de acondicionamiento fueron en acuarios con capacidad de 70 L (Figura 7) con los siguientes parámetros: temperatura de $23 \pm 2^\circ$, oxígeno disuelto (OD): ≥ 3 ppm, nitritos: ≤ 1 ppm, amonio: ≤ 1 ppm. Durante el periodo de acondicionamiento fueron alimentados *ad libitum* tres veces al día, con concentrado de marca comercial y con un porcentaje de proteína cruda de 45%. Cada dos días se realizó limpieza de fondo para remover el exceso de alimento y excretas, además se realizó un recambio de agua del 40%, con agua previamente ciclada.



Figura 7: Sistema de aclimatación y acondicionamiento de los organismos en experimentación.

Determinación de la concentración letal toxica 50 (CL50)

Para determinar la CL50 se realizó una modificación a la metodología de Llanos, Monteza y Scotto, (2012). Se utilizaron diez concentraciones de aceite esencial de cada una de las plantas previamente seleccionadas. Los tratamientos utilizados fueron: Lavanda: 0.5 – 10 $\mu\text{L/L}$; Boldo: 5- 100 $\mu\text{L/L}$; Cardamomo: 1 – 50 $\mu\text{L/L}$; Salvia sija: 0.5 – 10 $\mu\text{L/L}$ y Control: tratamiento sin poseer aceite esencial únicamente el agente disolvente (ETOH 95). Las concentraciones fueron seleccionadas en base a pruebas preliminares en alevines de distintas especies de interés comercial (Tilapia, carpa y poecílidos), ya que no existen trabajos recientes sobre la toxicidad de dichos aceites esenciales en tilapia.

Para el presente experimento se utilizaron bolsas de plástico con una capacidad de 5 L, las cuales fueron llenadas con 60% de oxígeno comprimido de uso industrial y 20% de agua a temperatura de 23 ± 1 °C. Cada bolsa represento una concentración de cada uno de los aceites seleccionados. En general se incorporaron 10 peces por tratamiento, con un peso promedio 2.1 ± 0.7 g (Figura 8).



Figura 8: Determinación de la concentración letal toxica 50.

El experimento duro 48 horas, y diariamente se cuantificó la mortalidad para cada uno de los tratamientos. Los organismos muertos fueron removidos con el fin de no incrementar los productos nitrogenados tóxicos para los organismos vivos. Los valores de la CL50 fueron calculados a través del método Probit mediante análisis gráfico.

Determinación de tiempo de inducción anestésica (Ti) y tiempo de recuperación (Tr)

Para determinar el tiempo de inducción anestésica y tiempo de recuperación de los distintos aceites esenciales en alevines de tilapia, se utilizaron 20 organismos con peso promedio de 2.1 ± 0.7 g. El procedimiento para la inducción anestésica de los organismos se llevó a cabo en beakers de vidrio con capacidad de 600 mL con distintas concentraciones (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 $\mu\text{L/L}$), y se utilizó como control el uso de etanol 95% equivalente a la concentración más alta de anestésico utilizada (80 $\mu\text{L/L}$). Para determinar las fases de anestesia se utilizó el método de acuerdo a Zahl, Samuelsen & Kiessling, (2012), tomando como referencia el tiempo en segundos que tardan los organismos en alcanzar las siguientes etapas de anestesia: Anestesia ligera (III-A), Anestesia quirúrgica (III-B) y Narcosis profunda (III-C), cada etapa fue evaluada de forma visual en función de la apariencia, nadado, equilibrio, respuesta a estímulo táctil, y espiración. El tiempo máximo de exposición a evaluar fue de 10 min (Figura 9). Una vez alcanzada la etapa III-C los organismos fueron trasladados en acuarios de 5 L con aireación continua y niveles de oxígeno ≥ 4 ppm.

Los organismos se consideraron como recuperados cuando demostraron recuperar su actividad natatoria, equilibrio y comportamiento. Los organismos estuvieron en observación por 48 h para cuantificar la mortalidad post anestesia. Durante el tiempo de post anestesia, fueron alimentados con normalidad (tres veces al día a saciedad).

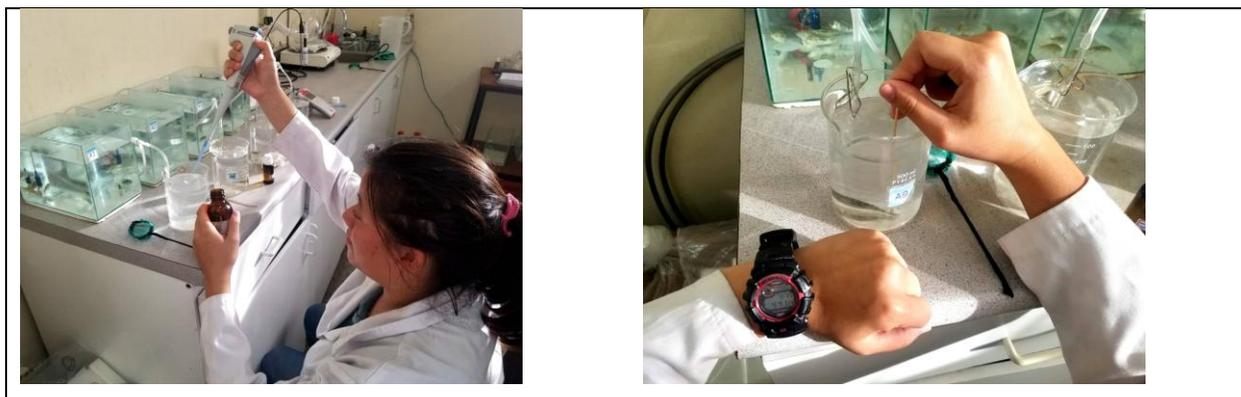


Figura 9: Determinación de tiempo de inducción anestésica (T_i).

Determinación de la dosis óptima

Para la determinación del anestésico y la dosis óptima para alcanzar el estado de anestesia Narcosis profunda (III-C), se utilizó el criterio de Purbosari, Warsiki, Syamsu & Santoso (2019), el cual deberá realizar rápidamente el proceso de anestesia entre 1 - 5 min, y con un tiempo de

recuperación 5 min. El producto a utilizar debe de ser económico, practico de usar, tener solubilidad alta, no dejar residuos en el ambiente.

Simulación de transporte a densidad baja

Para evaluar los cambios fisicoquímicos de agua, así como la mortalidad durante el transporte de alevines de tilapia a densidad de 45 g/L, se realizó un transporte simulado durante 3, 6, 12 y 24 h. Los organismos fueron transportados en bolsas plásticas de 5 L de capacidad, las cuales fueron llenadas 20% de agua y 60% de oxígeno de uso industrial. La concentración de cada una de los aceites esenciales fue seleccionada de acuerdo a la concentración más baja en la prueba de CL50, que no produjo mortalidad durante 24 h. Debido a limitación de espacio, se decidió realizar dos pruebas de transporte. La primera fue el aceite esencial de boldo y cardamomo, y la segunda fue salvia sija y lavanda, cada simulación tuvo su control, para poder realizar la comparación necesaria.

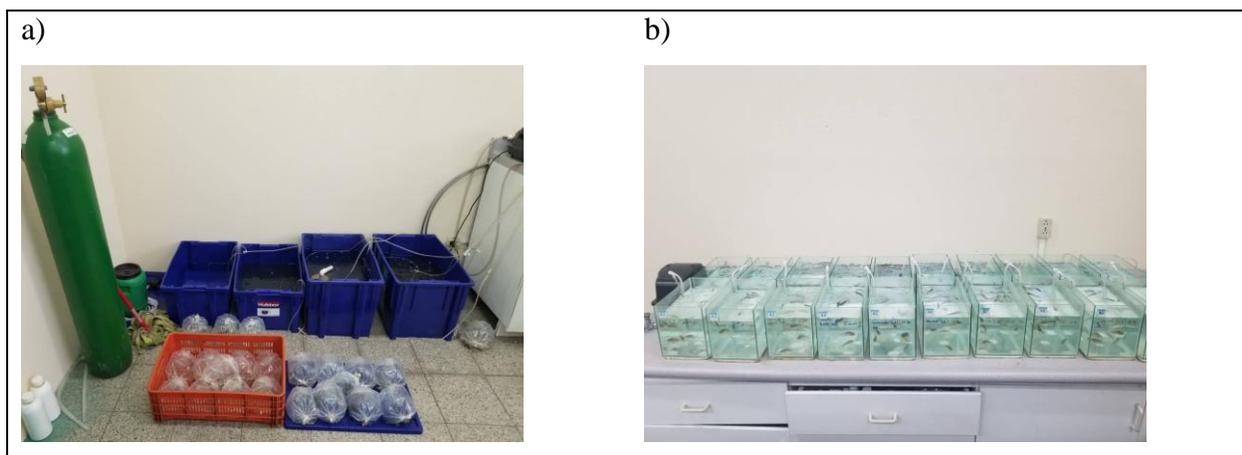


Figura 10: Simulación de transporte a densidad baja: a) empackado de los alevines de tilapia para la simulación de transporte y b) evaluación de la mortalidad post transporte.

Para la evaluación de los cambios en las propiedades de agua se evaluó: temperatura ($^{\circ}$ C), oxígeno disuelto (mg/L), pH; estos parámetros fueron medidos con ayuda de sonda paramétrica. Amonio ($\text{NH}_3\text{-N}$) y nitritos (NO_2), se midieron a través de los métodos colorimétricos de HACH: silicato (10023) y sulfato ferroso (8153), respectivamente. La mortalidad fue cuantificada durante el transporte y post transporte, hasta un máximo de 72 h.

Análisis de datos

Los resultados fueron analizados a través del programa estadístico INFOSTAT. La normalidad y homogeneidad de varianzas de las variables fueron comprobadas mediante la prueba de Shapiro-Wilks y Prueba de Levene ($\alpha = .05$). Dado que no se cumplió el supuesto de homogeneidad, fue necesario transformar las variables utilizando log base 10 (Apéndices 1-2). Los resultados se analizaron con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis ($\alpha = .05$) y posteriormente una comparación de medias de los rangos con la prueba de Dunn ($\alpha = .05$).

14. Vinculación, difusión y divulgación

Dentro del marco de las actividades del proyecto: Evaluación de los aceites esenciales de boldo, lavanda, salvia sija, y cardamomo como anestésicos para alevines de tilapia. Se celebraron actividades de divulgación las cuales tenían el objeto de impulsar el uso de nuevos productos en la acuicultura, los cuales son amigables con el medio ambiente y a la salud pública. Todas las actividades fueron realizadas en base a los objetivos de desarrollo sostenible, principalmente el OBD 14.

En este sentido se realizó un mini-taller de divulgación y socialización con miembros de la Agrocadena de la tilapia. A través del taller se incorporaron aportes teórico-metodológicos por parte de miembros de la Agrocadena, así como apoyo de recursos económicos por parte de los miembros (Figura 19), para el proyecto DIGI 1.92.



Figura 19: Socialización del proyecto DIGI 1.92 a miembros de la Agrocadena de la Tilapia en Guatemala.

Por otra parte, se realizaron dos exposiciones de avances de resultados a nivel internacional y una a nivel nacional, para la comunidad científica, siendo:

1. Charla magistral: El uso de plantas medicinales para la industria acuícola. Capítulo: anestésicos en tilapia, en el III Simposio Internacional de Acuicultura y XIX Foro de Pesca y Acuicultura (AQUADACA 2019), realizado en Villahermosa, Tabasco, México por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
2. Presentación del trabajo modalidad poster: Essential oil from *Peumus boldus*: a new anesthetic for tilapia fingerlings, en Capítulo Latinoamericano y del Caribe de la sociedad mundial de acuicultura (LACQUA 2019), realizado en San José Costa Rica (Figura 20).
3. Presentación del trabajo modalidad oral: Evaluación de los aceites esenciales de boldo, cardamomo y lavanda como anestésicos para alevines de tilapia, en el I congreso de ciencia animal, realizado por parte de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. En dicho evento la investigación obtuvo el premio a la mejor investigación del congreso.

ESSENTIAL OIL FROM *Peumus boldus*: A NEW ANESTHETIC FOR TILAPIA FINGERLINGS.



Josué García-Pérez^{1*}, Lucía López-Puano¹ & Francisco Pérez-Sabino²

¹Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Edificio T-14, ciudad Universitaria, zona 12.
²Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Edificio T-12, ciudad Universitaria, zona 12.
 *Email: josgar85@gmail.com

Summary

The aim of this study was to identify the times of anesthetic induction and recovery in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) that were exposed to the essential oil: *Peumus boldus*. A 20 tilapia fingerlings were placed in aquarium containing different concentrations of oil (200 - 800 mg L⁻¹). Fish were exposed to 500 - 800 mg L⁻¹ essential oil of *P. boldus* reached stage: Deep narcosis, in less than 4 min. The recovery time ranged from 2.8 - 4.5 min. The essential oil induced anaesthesia without mortality in tilapia fingerlings.

Introduction

In the last decade, several studies investigating alternatives to replace the synthetic anesthetics. A novel alternative could be the essential oils (EO). To date, EO of different plants have been studied for fish anaesthesia; most of them belong to Lamiaceae, Verbenaceae, Lauraceae and Myrtaceae (Hoseini et al., 2018). However, there is few evidence using *Peumus boldus* as anesthetics in aquatic animals. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of EO as an anaesthetic in tilapia fingerlings.

Material and Methods

To obtain EO from *P. boldus*, it was used dry leaves of the plant by hydrodistillation for 2 h using Clevenger type apparatus. A gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed at Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, to determinate the percentage of the EO compounds.

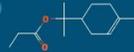
Previous to record the anaesthesia in fish, an acute toxicity test was evaluated, lethal doses (LD50) at 48 h. The concentration of the EO ranged from 0, 50, 100, 200, 300 up to 800 µL L⁻¹. A 10 tilapia fingerlings were used for each concentration tested, all organism was introduced in a plastic bag with a 10 L of cycled water and each bag was filled with O₂. The mortality was recorded every 24 h. To determinate the doses a Probit regression analysis was conducted.

For anaesthesia induction and recovery, tilapia fingerlings (2.10 ± 0.59 g) were transferred individual to aquarium that contained 500 mL of water at different concentration of *P. boldus* EO (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, and 800 µL L⁻¹). A 20 tilapia fingerlings were used for each concentration tested, and each fingerling was used once. The stages of anaesthesia in fish was according to Zahl, Samuelson & Kiessling (2012).



The major components of the EO of *P. boldus* was:

- 3-Cyclohexene-1-methanol, alpha, alpha, 4-trimethyl-, acetate (41.46%)



- Eucalyptol (14.11%)



- 2-Piperidinone, N-[4-Bromo-n-butyl] (17.98)



- α-Cymene (11.00%)



Results and Discussion.

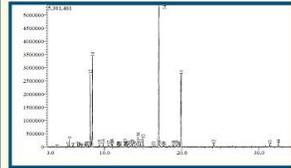


Figure 1. Chromatogram of *P. boldus*.

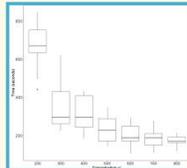


Figure 2. Time required for anesthesia induction using essential oil of *P. boldus* in tilapia fingerlings.

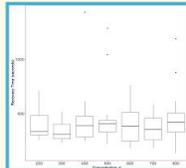


Figure 3. Time required for recovery from anesthesia using essential oil of *P. boldus* in tilapia fingerlings.

Table No. 1: Time required for induction and recovery using the essential oil of *P. boldus* in tilapia fingerlings.

Concentration µL L ⁻¹	Light anaesthesia (s)	Surgical anaesthesia (s)	Deep narcosis (s)
800	43.80 ± 10.95	75.30 ± 24.81	55.33 ± 26.84
700	43.85 ± 15.98	78.60 ± 25.08	63.45 ± 26.04
600	48.65 ± 9.62	82.20 ± 36.07	66.35 ± 33.86
500	51.00 ± 15.16	92.20 ± 43.60	90.00 ± 55.67
400	64.15 ± 17.48	112.85 ± 34.84	142.30 ± 52.99
300	81.95 ± 32.71	128.45 ± 66.04	142.55 ± 66.11
200	143.47 ± 75.58	345.58 ± 125.22	205.88 ± 101.60

- The LD50 at 48 h was 109 µL L⁻¹. An efficacious anaesthetic should induce anaesthesia within 15 min and preferably <3 min with a recovery of 5 min or less (Marking & Meyer 1985).

Acknowledgements

This work was supported by Dirección General de Investigación (Proyecto 1.92), Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.



Figura 20: Poster presentado en el Capítulo Latinoamericano y del Caribe de la sociedad mundial de acuicultura (LACQUA 2019)

Para la comunidad guatemalteca en general se realizó un programa de radio: productos naturales aplicados a la acuicultura, a través de la Radio Universidad en el programa Ciencia y Sociedad (Figura 21), donde se creó un espacio participativo que sirvió como herramienta para divulgar el trabajo, esto con el fin de crear y generar información social, en los distintos ámbitos tanto académicos, como sectores productivos.

Además, fueron creados dos videos informáticos, sobre el uso de lavanda y boldo como anestésicos en tilapia. Los videos fueron subidos a las redes sociales, en las plataformas: Youtube y Facebook a través de la cuenta del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura (Figura 22).



Figura 21: Flyer promocional del programa de radio: Productos naturales aplicados a la acuicultura. Radio Universidad en el programa Ciencia y Sociedad.

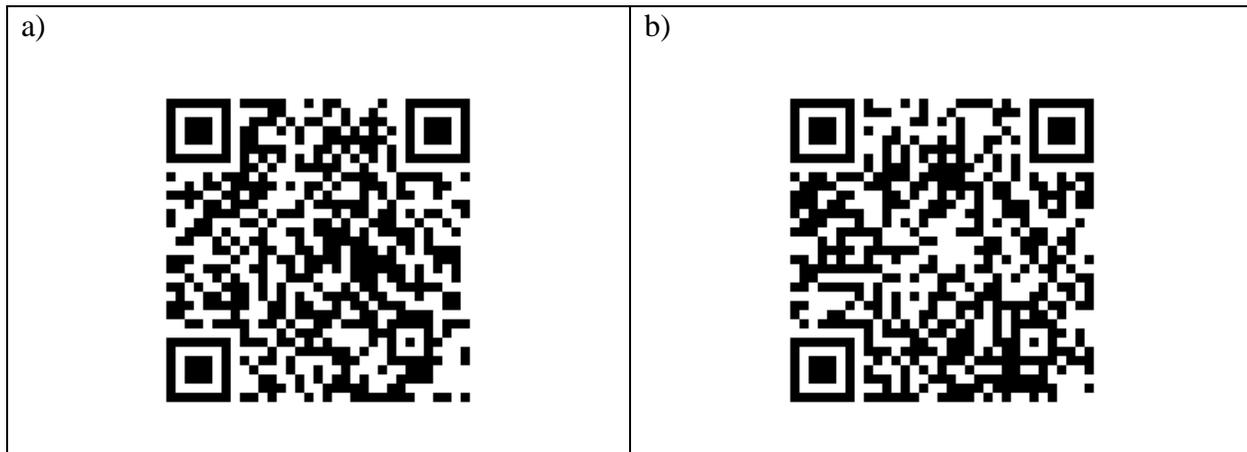


Figura 22: Códigos QR de los videos (Plataforma Youtube): a) Boldo como anestésico en alevines de tilapia y b) Lavanda como anestésico en alevines de tilapia.

15. Productos, hallazgos, conocimiento o resultados

Extracción del aceite esencial

Los resultados obtenidos corresponden al promedio de valores del aceite recuperado por biomasa vegetal. La tabla 2 indica los rendimientos de aceite esencial por cada 100 g de material

vegetal extraído. Se observa que las plantas de cardamomo, lavanda y boldo presentan altos rendimientos para la extracción de aceite esencial, contrario para la planta salvia sija, que presentó un rendimiento bajo.

Tabla 2: Rendimientos de extracción de aceites esenciales de plantas estudiadas

Plata utilizada	Presentación	̄ Rendimiento por cada 100 g de MV (%)
<i>Peumus boldus</i>	Hoja	2.68
<i>Lavandula dentata</i>	Hoja + flor	2.50
<i>Elettaria cardamomum</i>	Fruto	3.76
<i>Lippia alba</i>	Hoja	0.59

ID: MV: material vegetal

Determinación de la concentración letal toxica 50 (CL50)

En la tabla 3 se observa los valores de CL50 a 96 horas de las plantas utilizadas. El aceite esencial con mayor toxicidad a las 96 h fue salvia sija, el cual obtuvo el valor más bajo para provocar el 50% de mortalidad en alevines de tilapia, seguido por cardamomo, lavanda y boldo. Cabe resaltar que la CL50 a las 24 h para lavanda no se pudo calcular debido a que la concentración a la cual ocurre la mayor y menor mortalidad es 7.5 y 6.5 $\mu\text{L/L}$, respectivamente, limitando el cálculo, por la cercanía de valores.

Tabla 3: Concentración letal media de las plantas a utilizar.

Plantas a utilizar	Nombre común	CL50 (24 h)	CL50 (48 h)
		$\mu\text{L/L}$	$\mu\text{L/L}$
<i>Lavandula dentata</i>	Lavanda	SD	4.1
<i>Peumus boldus</i>	Boldo	28.3	10.9

<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamomo	7.8	4.1
<i>Lippia alba</i>	Salvia sija	2.48	1.38

ID: SD: sin datos.

Determinación de tiempo de inducción anestésica (Ti) y tiempo de recuperación (Tr)

Todos los aceites esenciales de plantas en experimentación lograron alcanzar la fase de anestesia: narcosis profunda (III-C). Y mostraron diferencia significativa en tiempo por la fase de anestesia alcanzada por los alevines de tilapia (Tabla 4).

Todos los aceites resultaron ser efectivos, la dosis inicial efectiva para salvia sija fue 10 $\mu\text{L/L}$ y 20 $\mu\text{L/L}$ para el resto de las plantas evaluadas. Cabe resaltar que las concentraciones en el rango de 40 – 80 $\mu\text{L/L}$, son las más efectivas debido a la reducción de tiempo para alcanzar la etapa de narcosis profunda. El uso de etanol al 95% no tuvo efecto anestésico sobre los organismos en tratamiento. En general no se evidencia mortalidad post anestesia en el rango de 10 – 80 $\mu\text{L/L}$.

Tabla 4: tiempo de inducción anestésica total (Fase narcosis profunda III-C)

Aceite	Concentración (µL/L)							
	10	20	30	40	50	60	70	80
Tiempo total de sedación (seg)								
<i>Lippia alba</i>	379.20 (45.58)	215.36 (37.24) ^a	186.50 (34.58) ^a	150.35 (45.76) ^a	129.95 (35.96) ^a	129.58 (23.21) ^a	112.67 (11.35) ^a	--
<i>Peumus boldus</i>	---	680.42 (110.10) ^b	350.26 (130.36) ^b	319.30 (83.20) ^b	233.20 (66.05) ^b	197.20 (47.31) ^b	185.90 (47.48) ^b	171.47 (24.46) ^a
<i>Elettaria cardamomum</i>	---	527.85 (162.74) ^b	497.21 (140.78) ^c	405.90 (126.38) ^{bc}	353.57 (106.36) ^c	310 (61.48) ^c	270.32 (85.05) ^c	170.61 (35.69) ^a
<i>Lavandula dentata</i>	---	927.65 (183.37) ^c	622.42 (108.49) ^c	442.05 (44.21) ^c	345.95 (106.36) ^c	312.12 (62.71) ^c	291.68 (66.61) ^c	277.75 (30.61) ^b

Nota: Media con letra común no son significativamente diferentes ($p > .05$) entre columnas. Casillas con ---: son pruebas no realizadas por no cumplir el requisito establecido.

El aceite esencial con mayor eficiencia fue *L. alba*, ya que la inducción a la etapa sedación profunda (III-C) fue en rango de 30 - 70 $\mu\text{L/L}$, con tiempo por debajo de los 3 minutos, seguido por boldo, cardamomo y lavanda, con rangos de concentraciones de 40 – 80 $\mu\text{L/L}$ y 60 - 80 $\mu\text{L/L}$, respectivamente (Figura 11-14).

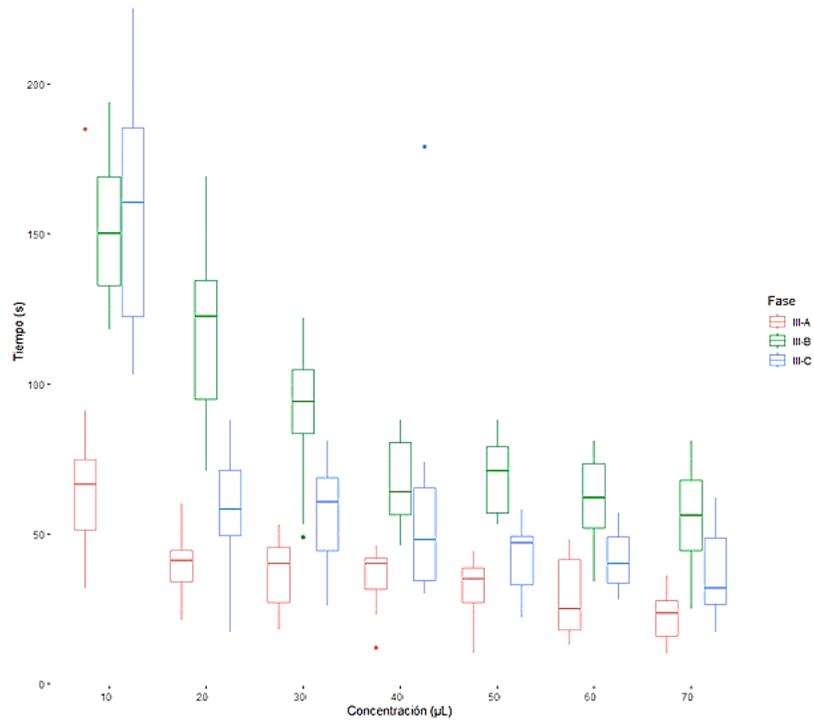


Figura 11: Etapas de anestesia III-A, III-B y III-C, con aceite esencial de salvia sija.

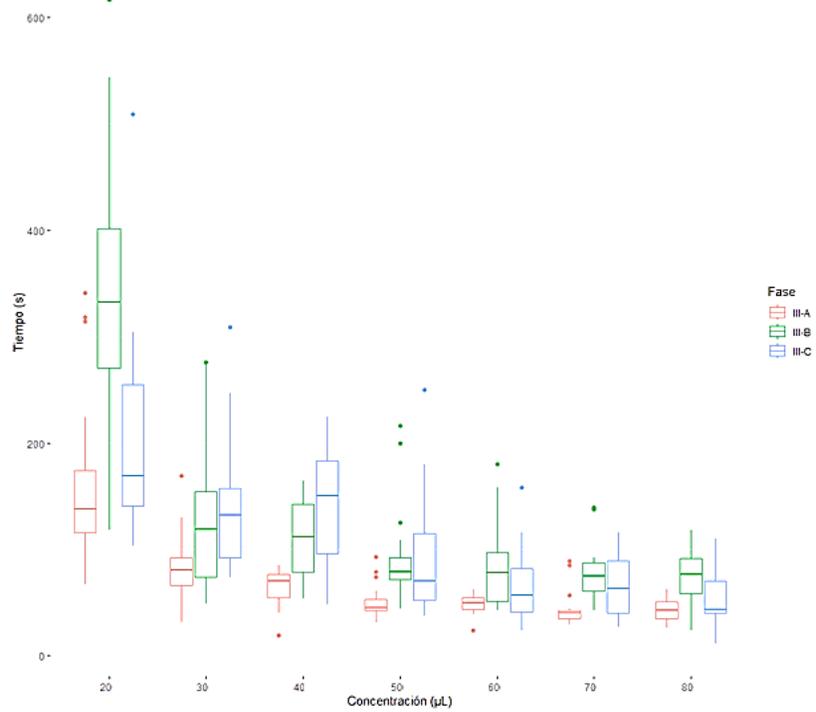


Figura 12: Etapas de anestesia III-A, III-B y III-C, con aceite esencial de boldo.

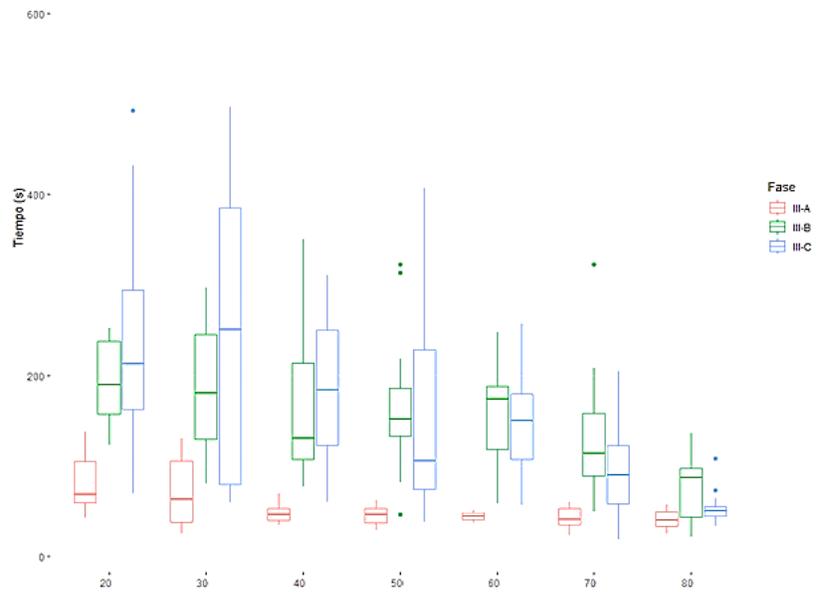


Figura 13: Etapas de anestesia III-A, III-B y III-C, con aceite esencial de cardamomo.

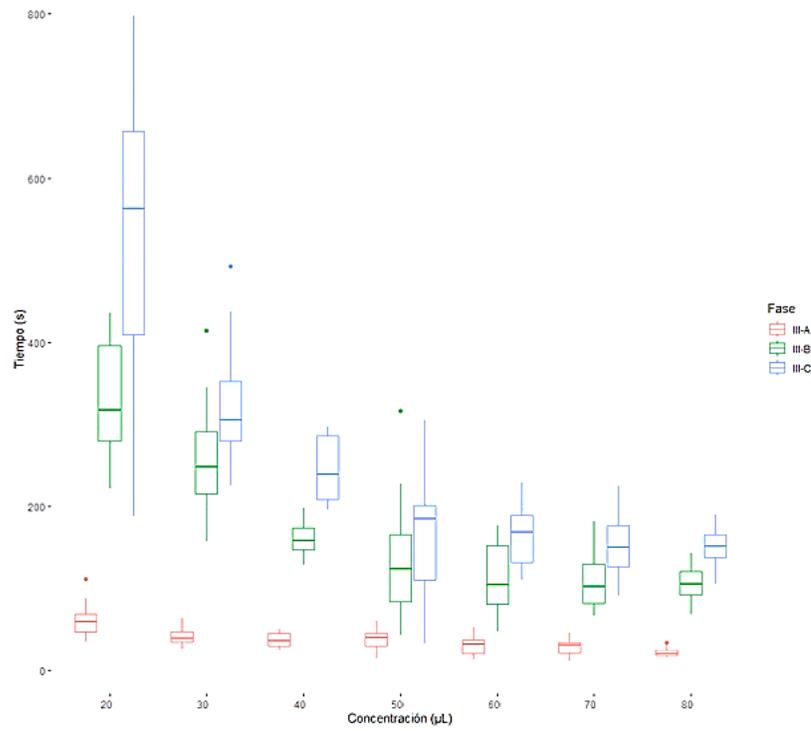


Figura 14: Etapas de anestesia III-A, III-B y III-C, con aceite esencial de lavanda.

Los tiempos de recuperación aumentaron conforme aumentaron las concentraciones del aceite esencial utilizado. De acuerdo con el criterio establecido por Purbosari, Warsiki, Syamsu & Santoso (2019) "el proceso de anestesia entre 1 - 5 min, y con un tiempo de recuperación 5 min", el aceite que cumplió con dicho criterio fueron las concentraciones de lavanda de 20 – 60 µL/L, el resto de aceites en las mismas concentraciones el tiempo de recuperación fluctuó de 6 – 11 min (Figura 15-18). La concentración óptima por cada aceite evaluado en este experimento es: salvia sija 30 µL/L, boldo 60 µL/L, cardamomo 80 µL/L y lavanda 70 µL/L.

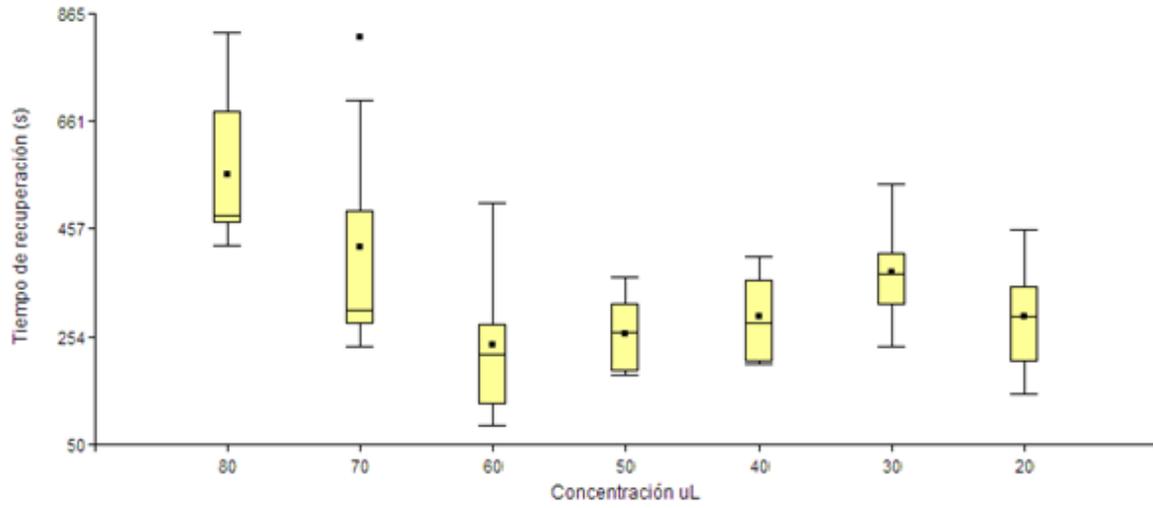


Figura 15: Etapas de recuperación con aceite esencial de lavanda.

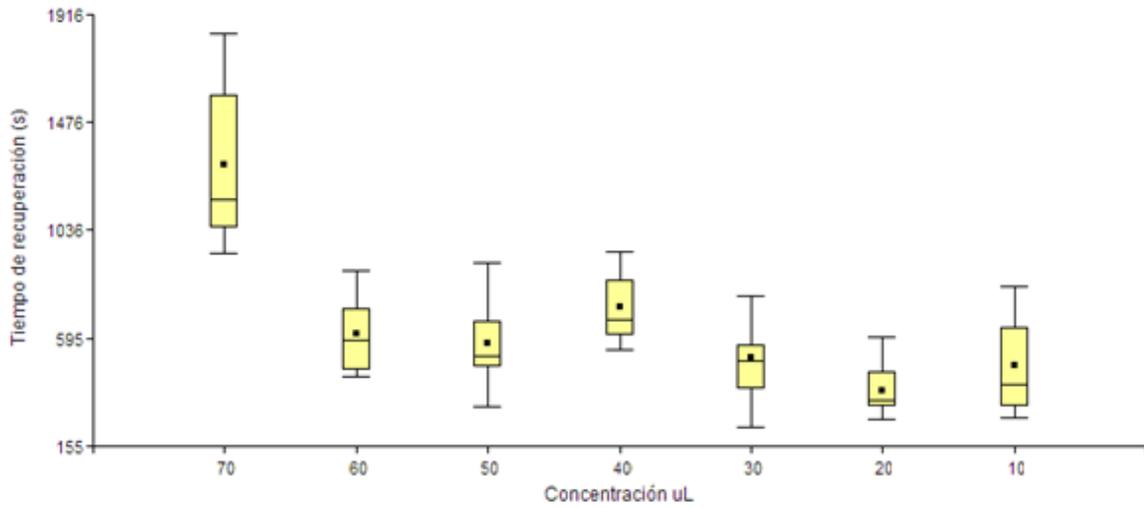


Figura 16: Etapas de recuperación con aceite esencial de salvia sija.

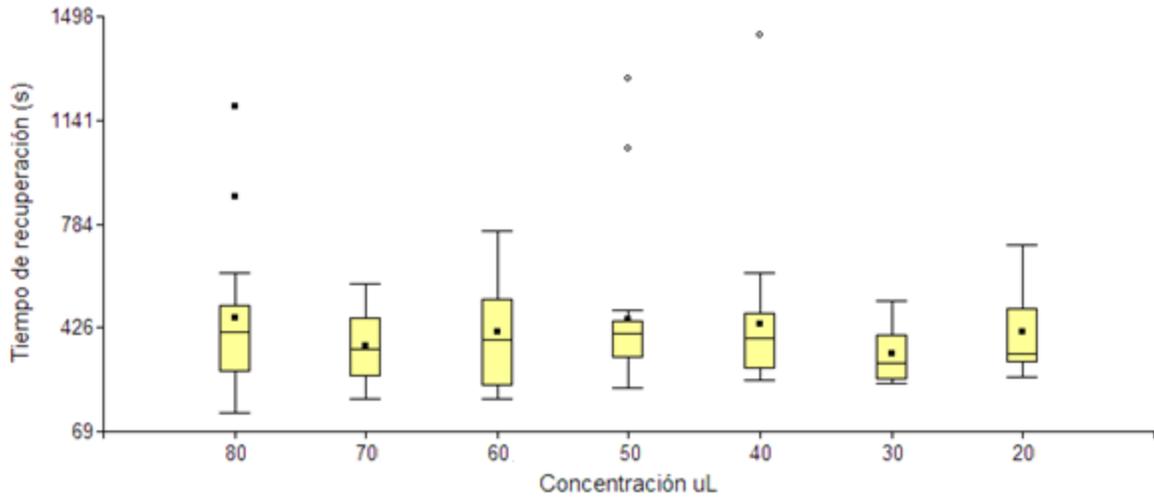


Figura 17: Etapas de recuperación con aceite esencial de boldo.

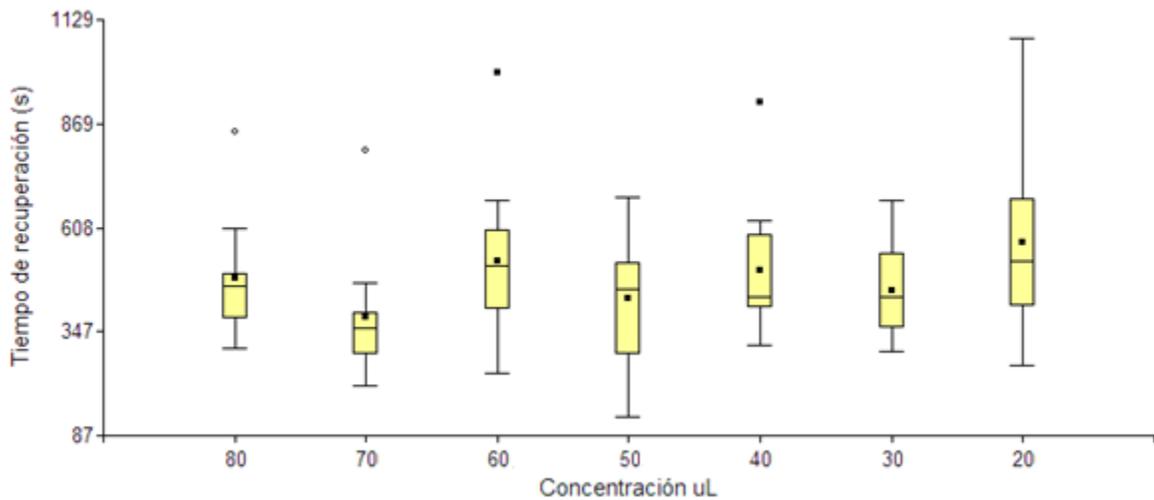


Figura 18: Etapas de recuperación con aceite esencial de cardamomo.

Simulación de transporte a densidad baja

En general todos los aceites esenciales utilizados (salvia sija, boldo, cardamomo y lavanda), resultaron eficientes como anestésicos en alevines de tilapia. Las concentraciones seleccionadas por cada uno de los aceites esenciales no provocaron ningún estado de anestesia dentro de un periodo de transporte. Todas las concentraciones utilizadas no reflejaron hiperactividad en peces, el patrón de conducta fue muy similar con los controles (Tabla 4-5).

En la tabla 4-5 se observa los parámetros de calidad fisicoquímica del agua. Durante la simulación de transporte, el amonio en agua fue significativo más alto en todos tratamientos comparados con la hora cero. Pero no se observa diferencia significativa entre tratamientos a las 3, 6, 12, 24 h. Aunque se puede observar que los niveles de $\text{NH}_3\text{-N}$ y oxígeno disuelto son ligeramente bajos en el tratamiento de boldo comparados con el resto de los tratamientos. El resto de parámetros fisicoquímicos no presentan diferencia significativa ($p > .05$) durante la simulación de transporte.

Durante la simulación de transporte en el tratamiento control la mortalidad a las 12 horas fue 5%, el resto de tratamientos no presento mortalidad. Al finalizar la simulación de transporte 24 h, el aceite con mayor mortalidad durante el transporte fue cardamomo con 10%, seguido por lavanda 8%, control 7% y salvia sija 6%. El único aceite que no reportó mortalidad a las 24 horas fue boldo.

Tabla 4: Parámetros fisicoquímicos en el transporte simulado, utilizando aceite de boldo y cardamomo.

Tiempo	Aceite	Mortalidad (%)	pH	OD promedio (mg/L)	T (° C)	NH₃-N (mg/L)	NO₂ (mg/L)
3	Boldo	0.00	7.05 ^a ± 0.12	16.79 ^a ± 1.12	22.07 ^a ± 0.06	2.53 ^a ± 0.08	6.00 ^a ± 1.00
	Cardamomo	0.00	6.98 ^a ± 0.03	16.09 ^a ± 0.86	22.20 ^a ± 0.17	2.67 ^a ± 0.53	5.00 ^a ± 1.00
	Control	0.00	7.01 ^a ± 0.06	15.81 ^a ± 1.59	22.30 ^a ± 0.17	2.7 ^a ± 0.23	6.00 ^a ± 1.00
6	Boldo	0.00	6.68 ^a ± 0.06	11.0 ^a ± 1.33	22.63 ^a ± 0.06	2.93 ^a ± 0.1	13.01 ^a ± 1.73
	Cardamomo	0.00	6.65 ^a ± 0.07	9.78 ^a ± 0.42	22.52 ^a ± 0.23	3.88 ^a ± 0.2	16.33 ^a ± 6.11
	Control	0.00	6.8 ^a ± 0.14	10.75 ^a ± 1.27	22.97 ^a ± 0.15	4.20 ^a ± 0.49	14.50 ^a ± 1.50
12	Boldo	0.00	6.54 ^a ± 0.03	13.52 ^a ± 0.82	24.03 ^a ± 0.21	5.95 ^a ± 1.05	28.67 ^a ± 4.04
	Cardamomo	0.00	6.48 ^a ± 0.05	13.17 ^a ± 1.56	24.33 ^b ± 0.06	6.28 ^a ± 1.27	26.01 ^a ± 4.01
	Control	4.17	6.5 ^a ± 0.02	7.13 ^a ± 0.24	24.30 ^{ab} ± 0.01	5.65 ^a ± 0.69	22.33 ^a ± 4.51
24	Boldo	0.00	6.52 ^a ± 0.08	14.67 ^a ± 1.39	23.43 ^a ± 0.06	17.2 ^a ± 0.98	13.11 ^a ± 1.54
	Cardamomo	9.70	6.54 ^a ± 0.03	13.67 ^a ± 1.73	23.40 ^a ± 0.10	22.50 ^b ± 0.46	21.67 ^a ± 3.06
	Control	6.36	6.57 ^a ± 0.03	12.58 ^a ± 0.96	23.27 ^a ± 0.06	19.73 ^{ab} ± 1.19	19.01 ^a ± 3.01

Tabla 5: parámetros fisicoquímicos en el transporte simulado, utilizando aceite de salvia sija y lavanda.

Tiempo	Aceite	Mortalidad (%)	pH	OD promedio (mg/L)	T (° C)	NH ₃ -N (mg/L)	NO ₂ (mg/L)
3	Lippia	0.00	6.97 ^b ± 0.06	17.69 ^a ± 2.41	22.27 ^a ± 0.06	2.63 ^a ± 1.41	7.70 ^a ± 1.15
	Lavanda	0.00	6.86 ^{ab} ± 0.12	14.04 ^a ± 0.67	22.2 ^a ± 0.10	3.59 ^a ± 0.2	6.00 ^a ± 1.00
	Control	0.00	6.64 ^a ± 0.10	16.16 ^a ± 1.1	22.23 ^a ± 0.15	3.52 ^a ± 0.54	7.70 ^a ± 1.15
6	Lippia	0.00	6.71 ^a ± 0.01	15.00 ^a ± 0.99	22.80 ^a ± 0.00	6.18 ^a ± 0.12	7.33 ^a ± 1.53
	Lavanda	0.00	6.72 ^a ± 0.03	13.75 ^a ± 0.16	22.67 ^a ± 0.12	6.35 ^{ab} ± 0.25	7.67 ^a ± 1.53
	Control	0.00	6.65 ^a ± 0.06	13.01 ^a ± 2.86	22.57 ^a ± 0.06	7.10 ^b ± 0.23	5.33 ^a ± 1.53
12	Lippia	0.00	6.58 ^a ± 0.05	14.86 ^a ± 2.1	23.97 ^a ± 0.81	11.13 ^{ab} ± 1.10	6.00 ^a ± 4.00
	Lavanda	0.00	6.58 ^a ± 0.05	13.45 ^a ± 0.15	23.5 ^a ± 0.20	9.40 ^a ± 0.35	12.67 ^a ± 1.53
	Control	4.76	6.61 ^a ± 0.03	12.51 ^a ± 1.45	23.93 ^a ± 0.12	12.23 ^b ± 0.81	11.67 ^a ± 3.06
24	Lippia	5.59	6.51 ^a ± 0.01	13.34 ^a ± 1.34	22.97 ^a ± 0.06	28.20 ^a ± 2.27	29.67 ^a ± 10.12
	Lavanda	7.72	6.40 ^a ± 0.02	11.49 ^a ± 1.71	22.93 ^a ± 0.06	21.33 ^a ± 1.33	47.33 ^a ± 4.16
	Control	6.73	6.47 ^a ± 0.07	12.54 ^a ± 1.28	23.03 ^a ± 0.06	29.20 ^a ± 6.93	27.67 ^a ± 13.5

16. Discusión

Los organismos en cultivo están sujetos a condiciones de estrés debido al confinamiento y al manejo, siendo lo más estresante para los organismos: el transporte y mediciones biométricas. Por lo tanto, el uso de anestésicos es una herramienta muy utilizada para la reducción de estrés en organismos de cultivo. En la actualidad existen agentes de origen sintético y natural, siendo este último, uno de los agentes con mayor interés a nivel mundial. Aunque el uso plantas medicinales, posee desventajas para su uso efectivo, debido a la composición química de las plantas a utilizar, ya que depende de las especies de plantas, área geográfica, edad de la planta, época de cosecha, técnica de secado y extracción de los metabolitos primarios y secundarios (Jamshidi, Afzali, Afzali, 2009; Gilles, Zhao, An, Agboola, 2010). Para seleccionar una planta como anestésicos en peces, debe de ser económico, practico de usar, tener solubilidad alta, no dejar residuos en el ambiente y sobre todo no ser dañino para el ser humano (Summerfelt, Smith, Schreck, Moyle, 1990). En la actualidad la mayoría de las plantas que son utilizadas como anestésicos pertenecen a las familias: Lamiaceae, Verbenaceae, Lauraceae y Myrtaceae. También son muy utilizados compuestos como menthol, linalool, myrcene, cineole, globulol, spathulenol, guaiol, caryophyllene oxide, terpinen-4-ol y dehydrofukinone, los cuales son algunos compuestos que poseen efectos anestésicos en organismos acuáticos (Hoseini, Mirghaed, & Yousefi, 2018).

En el presente se utilizaron los aceites esenciales de *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Peumus boldus* (boldo), *Lippia alba* (salvia sija) y *Lavandula dentata* (lavanda), estas plantas pertenecen a las familias de Zingiberaceae, Monimiaceae, Verbenaceae y Lamiaceae, respectivamente. Cabe resaltar que son nuevos hallazgos en el uso de dichas plantas, como agentes anestésicos para el transporte de alevines de *O. niloticus*. A pesar que son plantas poco estudiadas como anestésicos en peces, los componentes principales con potencial anestésico, son muy similares a lo que reporta Hoseini, Mirghaed, & Yousefi (2018): 1. Cardamomo: 4-terpineol, 1:8 cineol, 2. Boldo: eucalyptol, p-Cymene y Cineol, 3. Salvia sija: citral, linalool, β -myrcene y limonene, 4. Lavanda: 1:8 – cineole, cis-verbenol, p-cymen-8-ol.

Se demostró que la concentración optima por cada aceite evaluado, para alcanzar la fase de anestesia narcosis profunda son: 1. Salvia sija (30 μ L/L), 2. Boldo (60 μ L/L), 3. Lavanda (70 μ L/L), y 4. Cardamomo (80 μ L/L).

En el caso de *L. alba* el valor recomendado para alevines de tilapia, es ligeramente bajo comparado con otras especies acuáticas como *Litopenaeus vannamei*, *Rhamdia quelen*, *Sparus aurata*, ya que varios estudios recomiendan utilizar entre 50-100 $\mu\text{L/L}$, con tiempo de inducción anestesia de 75 – 1,771 seg (Cunha et al., 2010; Parodi et al., 2012; Toni et al., 2015). Al igual que para *L. dentata* la concentración recomendada se encuentra por debajo de lo que recomienda por otros autores para organismos acuáticos como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) que se recomienda 200 $\mu\text{L/L}$ para alcanzar un efecto anestésico (Metin, Didinen, Kubilay, Pala, & Aker, 2015), y para *Amatitlania nigrofasciata* se recomienda una dosis de aceite esencial de *Lavandula hibrida* de 150 $\mu\text{L/L}$, a pesar que no es la misma especie de lavanda utilizada en el estudio, el componente mayoritario sigue siendo Linanool (Can, Kızak, Seyhaneyıldız-Can, & Özçiçek, 2019).

Todos los aceites esenciales cumple con el criterio establecido por Purbosari, Warsiki, Syamsu & Santoso (2019), el proceso de anestesia debe de ser entre 1 - 5 min, pero no cumple con el tiempo de recuperación que debe ser en no más de 5 min. El aceite que cumplió con dicho criterio fueron las concentraciones de lavanda de 20 – 60 $\mu\text{L/L}$, el resto de aceites la recuperación fue entre 6 – 11 minutos, a pesar que no cumplieron con dicho criterio, no se debe de descartar uso como anestésicos en acuicultura. Se presume que la eficiencia de los aceites esenciales, son por los compuestos: 4-terpine-ol, 1:8 cineol, eucalyptol, p-Cymene, citral, linalool, β -myrcene y limonene, que las plantas poseen, ya que en algunos casos estos compuestos poseen una acción inhibitoria sobre los canales de sodio y calcio (Park et al., 2006), dado que provocan la disminución en la liberación de neurotransmisores dependientes de calcio en las terminaciones presinápticas neuronales (Lee et al., 2005). O bien afectan la modulación de las benzodiazepinas (BDZ) de los receptores GABA, produciendo efectos sedante, hipnóticos, relajantes musculares y ansiolíticos en animales (Foster & Kemp, 2006; dos Santos et al., 2017).

En los parámetros físicoquímicos del agua no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos sometidos bajo las mismas condiciones experimentales por cada tratamiento, y no se observó un efecto anestésico del alcohol diluyente, similar lo reportan otros autores (Inoue, Afonso, Iwama, & Moraes, 2005; Simões, Lombardi, Gomide, & Gomes, 2011).

17. Conclusiones

- La concentración letal media a las 48 para para los aceites esenciales fue para *Lavandula dentata* (4.1 $\mu\text{L/L}$), *Peumus boldus* (10.9 $\mu\text{L/L}$), *Elettaria cardamomum* (4.1 $\mu\text{L/L}$) y *Lippia alba* (1.38 $\mu\text{L/L}$).
- La concentración anestésica para los aceites esenciales fue para *Lavandula dentata* (40 - 80 $\mu\text{L/L}$), *Peumus boldus* (40 - 80 $\mu\text{L/L}$), *Elettaria cardamomum* (60 - 80 $\mu\text{L/L}$) y *Lippia alba* (20 - 70 $\mu\text{L/L}$).
- Las concentraciones de los aceites esenciales para el transporte de los alevines de tilapia para reducir mortalidad durante y post transporte fue calcula para: *Peumus boldus* (5 $\mu\text{L/L}$), *Lavandula dentata* (6.5 $\mu\text{L/L}$), *Elettaria cardamomum* (6.5 $\mu\text{L/L}$) y *Lippia alba* (1 $\mu\text{L/L}$), ya que se obtuvo una mortalidad del 0% de mortalidad a las 12 h.

17.1 Recomendaciones

El uso de aceites esenciales como anestésicos en tilapia ha demostrado ser una alternativa natural a los productos sintéticos, ya que existen diversas ventajas como lo son: bajo precio, baja residualidad, eco amigable con el medio ambiente, no toxico para la salud pública.

Aunque se necesita conocer más sobre la fisiología y respuesta al comportamiento a diversos tiempos y dosis de cada uno de los aceites esenciales estudiados. Ya que los tiempos prolongados de exposición pueden suprimir algunas actividades fisiológicas. Además, es necesario comprender que el uso de aceites esenciales no siempre será efectivo, debido a: origen y pureza del aceite, cantidad de metabolitos principales, edad y tamaño del organismo en que se utilizará, condiciones fisicoquímicas del agua, entre otras. Previo a utilizar los aceites, evaluados en este proyecto, se recomienda estandarizar la metodología bajo las condiciones, para garantizar los resultados.

18. Impacto esperado

En Guatemala existen alrededor de diez centros de producción de alevines de tilapia, que en su conjunto producen más de 12 millones de alevines destinados a la producción de engorde de tilapia. Dicha producción que genera en ventas más de Q. 6,0000,000 anuales. Sin embargo, la industria de la producción de alevines de tilapia tiene en algunas ocasiones, sobrevivencias durante el transporte del 85% y del 80% post transporte, lo cual refleja una necesidad de mejorar el proceso de manejo y transporte. Con el presente proyecto de investigación se fomentó el uso de aceites esenciales, los cuales son sustancias no tóxicas y biodegradables para el medio ambiente y los organismos de transporte, pueden reducir el estrés durante y post transporte, para mejorar la tasa de sobrevivencia, así como su uso en los procesos de producción.

19. Referencias

- Agrocadena de la tilapia de Guatemala. (2018). *Análisis y plan de trabajo de la Agrocadena de la tilapia 2018-2022*. Secretaria ejecutiva de CONADEA-MAGA, 30 p.
- Alasbahi, R., & Melzig, M. (2010). *Plectranthus barbatus*: A review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology – Part 2. *Planta Médica*, 76 (1), 753-765.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to change in circulating corticosteroids. *Integrate and Comparative Biology*, 42, 517-525.
- Bosworth, B. G., Small, B., Gregory D., Kim, J., & Black, S. (2007). Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-STTM on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. *Aquaculture*, 262, 302-318.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cárdenas, C., Toni, C., Martos-Sitcha, J. A., Cárdenas, S., de las Heras, V., Baldisserotto, B., Heinzmann, B., Vázquez, R., & Mancera, J. M. (2016). Effects of clove oil, essential oil for *Lippia alba* and 2-phe anaesthesia on juvenile meagre, *Argyrosomus regius*, (Asso, 1801). *Journal Apply Ichthyology*, 32, 693-700.
- Cho, G. K., & Heath, D. D. (2000). Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 31, 537-546.
- Coyle, S. D., Durborow, J. H., & Tidwell, A. (2004). *Anesthetics in aquaculture*. Texas: Southern Regional Aquaculture Center, & Kentucky State University Aquaculture Research Center.
- Cunha, M. A., Barros, F. M. C., Garcia, L. O., Veeck, A. P. L., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., Emanuelli, T., & Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306, 403-406.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18, 403-414.
- Cunha, M. A., Barros, F. M. C., Garcia, L. O., Veeck, A. P. L., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., Emanuelli, T., & Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306, 403-406.

- Díaz, V. (2012). *Perfil comercial de tilapia Guatemala: Proyecto de facilitación de la participación de Guatemala en el proceso de integración regional y en el acuerdo de asociación entre Centroamérica y la UE*. [en línea]. Recuperado junio 10, 2018, de <https://www.education/ras/publications/species/283fsTilapia%20life%20history>
- Dob, T., Dahmane, D., Tayeb, B., & Chelghoum, C. (2005). Chemical composition of the essential oil of *Lippia* from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*, 15(2), 110–114. doi:10.1016/j.ijat.2005.03.010
- Dos Santos, A. C., Junior, G. B., Zago, D. C., Zeppenfeld, C. C., Da Silva, D. T., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., & da Cunha, M. A. (2017). Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 44, 106-113
- El Proyecto AdA-Integración. (2014). *Perfil comercial del cardamomo en Guatemala*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación -MAGA-
- El-Sayed, A. F. M. (2006). *Tilapia culture*. Massachusetts, CABI Publishing.
- Facanha, M. F., & Gomes, L. C. (2005). Efficacy of menthol as an anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazonica*, 35,71-75.
- FAO, (2016). *The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA) 2016*. [En línea]: Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>
- FAO, (2018). *FishStat fishery statistical collections: aquaculture production (2017)*. [En línea]: Disponible en <http://www.fao.org/fhishery/statitics/software/fishstat/>
- Fitzsimmons, K. (2013). *The success story of the Tilapia industry; current and future trends of the US seafood market*. [En línea]: Disponible en: https://www.ctahr.hawaii.edu/sustainag/workshop/downloads/tilapia/3_Weidenbach.pdf
- Foster, A., & Kemp, J. (2006). Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1), 7–17. doi:10.1016/j.coph.2005.11.005
- García-Gómez, A., de la Gándara, F., & Raja, T. (2002). Utilización del aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* (Merr. & Perry), como anestésico eficaz y económico para labores rutinarias de manipulación de peces marinos cultivados. *Boletín del Instituto Español Oceanografía*, 18, 21-23.

- Ghazilou, A., Saeedi, H. H., Chenary, F., Nateghi, A., Haghi, T., & Mohammad, R. S. (2010). The anesthetic efficiency of clove oil in *Caspian salmon, Salmo truttacaspius* K., smolts in dosage-salinity-pH linked approach. *Journal World Aquaculture Society*, 41, 655-660.
- Gilderhus, P. A., & Marking, L. L. (1987). Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 7, 288-292.
- González, J. (2010). *Farmacología, terapéutica y anestesia de peces*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*. 119, 731–737.
- Goncalves, A. F. N., Santos, E. C. C., Fernandes, J. D. K., & Takahashi, L. S. (2008). Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na induçã oaneste´sica de juvenis de pacu. *Acta Scientiarum*, 30(3), 339-344.
- Harikrishnan, R., Balasundarm, C., & Heo M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317, 1-15.
- Hoseini, S.M., Mirghaed, A.T., Yousefi, M. (2018). Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 0, 1–15.
- Inoue, L. A. K. A., Santos, N. C., & Moraes, G. (2003). Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Cie ˆncia Rural*, 33, 943–947.
- Inoue, L.A., Afonso, L.O., Iwama, G.K., & Moraes, G. . (2005). Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica*, 35(2), 289-295. <https://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672005000200018>
- Jamshidi R, Afzali Z, Afzali, D. (2009) Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5, 78–81.
- Jayves-Reyes, P. G., de León, J. L., Navas, R. P., Pérez-Sabino, J. F., Merida-Reyes, M., & Farfán, C. (2006). *Aceites esenciales de nueve plantas nativas de Guatemala, familias Verbenaceae y Lauraceae: Proyecto DIGI01-2005*. Guatemala: Dirección General de Investigación [DIGI].
- Lee, M., Yeon, K., Park, C., Li, H., Fang, Z., Kim, M. S., Choi, S. Y. (2005). Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res*, 84, 848-851.

- Llanos, C., Monteza, C., & Scotto, C. (2012). Determinación de la concentración letal media (CL50) y eficacia del eugenol como anesésico sobre *Xiphophorus helleri* (HECKEL, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Revistade Investigación Veterinaria Perú*, 23(4), 429-440.
- Mahmud, S. (2008). Composition of essential oil of *Elettaria cardamomum* Maton leaves. *Pakistan Journal of Science*, 60, 3-4.
- Marin, G. (2012). Concentración letal 50 a 96 horas de eugenol en cachama blanca, *Piaractus brachypomus*. *Orinoquia*, 16 (2), 62-69.
- Moyle, P. B., Cech, J. J. (1998). *Fishes: An introduction to ichthyology* (2nd ed.). Prentice New Jersey: Hall, & Englewood Cliffs.
- Palić, D., Herolt, D. M., Andreasen, C. B., Menzel, B. W., & Roth, J. A. (2006). Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture*, 254, 675-685.
- Park, C., Ki, H., Yeon, K., Jung, S., Choi, S., Lee, S.J., Lee, S. (2006). Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res*, 85: 900-904.
- Parodi, T. V., Cunha, M. A., Heldwein, C. G., de Souza, D. M., Martins, A. C., Garcia, L. O. (2012) The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155, 462-468
- Pérez-Sabino, J. F., Farfán-Barrera, Ch., Oliva-Hernández, B. E., Mérida-Reyes, M., Muñoz-Wug, M. (2011). *Determinación de los flavonoides en seis plantas del genero Lippia (Verbenaceae) nativa de Guatemala como posibles fuentes de nutraceuticos*. Guatemala: DIGI.
- Prados, F. (2005). *Manual de técnicas básica de diagnóstico patológico en peces*. España: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Purbosari, N., Warsiki, E., Syamsu, K., & Santoso, J. (2019). Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. *Aquaculture and Fisheries*. doi:10.1016/j.aaf.2019.03.002

- Quezada, A. (2008). Evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (*Lippia graveolens*) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel planta piloto. Tesis de licenciatura en Acuicultura. Universidad de San Carlos de Guatemala [USAC].
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2009). Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infecting Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 579-582.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fisheries Science*, 76, 287-293.
- Ríos, J., Lopera, G., Caicedo, R., Granda, F., Montoya, A., Restrepo, G., Suárez, R. (2007). Extracción y caracterización de aceite de cardamomo (*Elettaria cardamomum*). *Dyna*, 74 (151), 47-52.
- Rivas, R., Cordeiro, R., Cedraz, A., Baldisserotto, B., Heinmann, B., Couto, R., & Copatti, C. (2017). Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: Anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquaculture Research*, 48, 3383-3392.
- Rosado, M., Dionicio, J., & Aguirre-Velard, A. (2016). Evaluation of different tricaine (MS-222) concentrations on the transport of juvenile peruvian grunt (*Anisotremus Scaularis*). *Revista de Investigación Veterinaria Perú*, 27(4), 687-697.
- Ross, L. G., & Ross, B. (1999). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. Oxford: Blackwell Science.
- Salbego, J., Becker, A., Goncalves, J., Menezes, C., Heldwein, C., Spanevello, R., Loro, V., Schetinger, M., Morsch, V., Heinzmann, B., & Baldisserotto, B. (2014). The essential oil from *Lippia alba* induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. *Neotropical Ichthyology*, 12 (4), 811-818. doi: 10.1590/1982-0224-20130178
- Sena, A. C., Teixeira, R. R., Ferreira, E. L., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Caron, B. O., ... Copatti, C. E. (2016). Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, 465, 374-379. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.09.033

- Simões, L. N., Gomes, L. C. (2009). Eficacia do mentol como anestésico para juvenis de tilapia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arquivos Bras Medicina Vet Zoot*, 61, 613-620.
- Simões, L. N., Lombardi, D. C., Gomide, A. T. M., & Gomes, L. C. (2011). Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Cichlidae) juveniles. *Zoologia (Curitiba)*, 28(3), 285-290. <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702011000300001>
- Summerfelt, R. C, Smith, L., Schreck, C., Moyle, P. (1990) Anesthesia, surgery, and related techniques, *Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland*, 8, 2.
- Toni C, Martos-Sitcha JA, Baldisserotto B, Heinzmann BM, de Lima Silva L, Martinez-Rodriguez G et al. (2015a) Sedative effect of 2-phenoxyethanol and essential oil of *Lippia alba* on stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Research in Veterinary Science*, 103: 20–27.
- Vogel, H., Razmilic, I., Muñoz, M., Doll, U., & San Martin, J. (1999). Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in boldo (*Peumus boldus*). *Planta medica*, 65, 90-91
- Zahl, I.H., Samuelson, O., & Kiessling, A. (2012). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology Biochemical*, 38, 201-218

20. Apéndices

Apéndice 1.

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (alpha = 0.05)

Aceite	Con uL	Var	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Boldo	200	Log(Tiempo)	19	6.51	0.17	0.92	0.30
Boldo	300	Log(Tiempo)	19	5.80	0.34	0.91	0.17
Boldo	400	Log(Tiempo)	20	5.73	0.27	0.89	0.05
Boldo	500	Log(Tiempo)	20	5.41	0.29	0.90	0.11
Boldo	600	Log(Tiempo)	20	5.26	0.25	0.96	0.76
Boldo	700	Log(Tiempo)	20	5.19	0.26	0.95	0.59
Boldo	800	Log(Tiempo)	19	5.13	0.15	0.93	0.36
Cardam	200	Log(Tiempo)	20	6.23	0.28	0.93	0.29
Cardam	300	Log(Tiempo)	19	6.17	0.30	0.92	0.26
Cardam	400	Log(Tiempo)	20	5.96	0.33	0.96	0.73
Cardam	500	Log(Tiempo)	14	5.80	0.36	0.87	0.07
Cardam	600	Log(Tiempo)	11	5.72	0.21	0.88	0.20
Cardam	700	Log(Tiempo)	19	5.56	0.29	0.93	0.42
Cardam	800	Log(Tiempo)	18	5.12	0.21	0.95	0.64
Lavanda	200	Log(Tiempo)	20	6.81	0.21	0.88	0.03
Lavanda	300	Log(Tiempo)	19	6.42	0.17	0.95	0.64
Lavanda	400	Log(Tiempo)	20	6.09	0.10	0.98	0.97
Lavanda	500	Log(Tiempo)	19	5.80	0.30	0.94	0.45
Lavanda	600	Log(Tiempo)	17	5.72	0.21	0.91	0.18
Lavanda	700	Log(Tiempo)	19	5.65	0.22	0.93	0.39
Lavanda	800	Log(Tiempo)	20	5.62	0.11	0.98	0.97
Salvia sija	100	Log(Tiempo)	20	5.93	0.12	0.96	0.82
Salvia sija	200	Log(Tiempo)	17	5.36	0.19	0.92	0.27
Salvia sija	300	Log(Tiempo)	18	5.21	0.19	0.91	0.24
Salvia sija	400	Log(Tiempo)	20	4.97	0.30	0.98	0.97
Salvia sija	500	Log(Tiempo)	19	4.81	0.42	0.70	0.00
Salvia sija	600	Log(Tiempo)	19	4.85	0.18	0.96	0.81

Salvia sija 700 Log(Tiempo) 15 4.72 0.10 0.93 0.46

El supuesto de normalidad se cumple en la mayoría de casos, a excepción del grupo de salvia sija en la concentración de 500 microlitros.

Apéndice 2.

Supuesto de la homogeneidad de varianzas de Fischer (alpha = 0.05)

Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	Var(1)	Var(2)	F	p	prueba	Res
{Boldo:200.00}	{Cardamomo:200.00}	19	20	0.03	0.08	0.37	0.04	Bilateral	NC
{Boldo:200.00}	{Lavanda:200.00}	19	20	0.03	0.05	0.66	0.38	Bilateral	SC
{Boldo:200.00}	{Salvia sija:200.00}	19	17	0.03	0.04	0.84	0.71	Bilateral	SC
{Boldo:300.00}	{Cardamomo:300.00}	19	19	0.12	0.09	1.32	0.56	Bilateral	SC
{Boldo:300.00}	{Lavanda:300.00}	19	19	0.12	0.03	4.25	0	Bilateral	NC
{Boldo:300.00}	{Salvia sija:300.00}	19	18	0.12	0.04	3.21	0.02	Bilateral	NC
{Boldo:400.00}	{Cardamomo:400.00}	20	20	0.08	0.11	0.68	0.41	Bilateral	SC
{Boldo:400.00}	{Lavanda:400.00}	20	20	0.08	0.01	7.46	0	Bilateral	NC
{Boldo:400.00}	{Salvia sija:400.00}	20	20	0.08	0.09	0.85	0.72	Bilateral	SC
{Boldo:500.00}	{Cardamomo:500.00}	20	14	0.08	0.13	0.63	0.35	Bilateral	SC
{Boldo:500.00}	{Lavanda:500.00}	20	19	0.08	0.09	0.9	0.82	Bilateral	SC
{Boldo:500.00}	{Salvia sija:500.00}	20	19	0.08	0.18	0.46	0.1	Bilateral	SC
{Boldo:600.00}	{Cardamomo:600.00}	20	11	0.06	0.05	1.3	0.68	Bilateral	SC
{Boldo:600.00}	{Lavanda:600.00}	20	17	0.06	0.04	1.41	0.49	Bilateral	SC
{Boldo:600.00}	{Salvia sija:600.00}	20	19	0.06	0.03	1.8	0.22	Bilateral	SC
{Boldo:700.00}	{Cardamomo:700.00}	20	19	0.07	0.08	0.81	0.65	Bilateral	SC
{Boldo:700.00}	{Lavanda:700.00}	20	19	0.07	0.05	1.36	0.52	Bilateral	SC
{Boldo:700.00}	{Salvia sija:700.00}	20	15	0.07	0.01	6.26	0	Bilateral	NC
{Boldo:800.00}	{Cardamomo:800.00}	19	18	0.02	0.04	0.5	0.16	Bilateral	SC
{Boldo:800.00}	{Lavanda:800.00}	19	20	0.02	0.01	1.85	0.19	Bilateral	SC
{Cardamomo:200.00}	{Lavanda:200.00}	20	20	0.08	0.05	1.79	0.21	Bilateral	SC
{Cardamomo:200.00}	{Salvia sija:200.00}	20	17	0.08	0.04	2.29	0.1	Bilateral	SC
{Cardamomo:300.00}	{Lavanda:300.00}	19	19	0.09	0.03	3.21	0.02	Bilateral	NC
{Cardamomo:300.00}	{Salvia sija:300.00}	19	18	0.09	0.04	2.42	0.07	Bilateral	SC
{Cardamomo:400.00}	{Lavanda:400.00}	20	20	0.11	0.01	10.98	0	Bilateral	NC
{Cardamomo:400.00}	{Salvia sija:400.00}	20	20	0.11	0.09	1.25	0.63	Bilateral	SC
{Cardamomo:500.00}	{Lavanda:500.00}	14	19	0.13	0.09	1.43	0.48	Bilateral	SC
{Cardamomo:500.00}	{Salvia sija:500.00}	14	19	0.13	0.18	0.73	0.56	Bilateral	SC
{Cardamomo:600.00}	{Lavanda:600.00}	11	17	0.05	0.04	1.08	0.86	Bilateral	SC

{Cardamomo:600.00}	{Salvia sija:600.00}	11	19	0.05	0.03	1.38	0.53	Bilateral	SC
{Cardamomo:700.00}	{Lavanda:700.00}	19	19	0.08	0.05	1.68	0.28	Bilateral	SC
{Cardamomo:700.00}	{Salvia sija:700.00}	19	15	0.08	0.01	7.76	0	Bilateral	NC
{Cardamomo:800.00}	{Lavanda:800.00}	18	20	0.04	0.01	3.68	0.01	Bilateral	NC
{Lavanda:200.00}	{Salvia sija:200.00}	20	17	0.05	0.04	1.28	0.63	Bilateral	SC
{Lavanda:300.00}	{Salvia sija:300.00}	19	18	0.03	0.04	0.75	0.56	Bilateral	SC
{Lavanda:400.00}	{Salvia sija:400.00}	20	20	0.01	0.09	0.11	0	Bilateral	NC
{Lavanda:500.00}	{Salvia sija:500.00}	19	19	0.09	0.18	0.51	0.16	Bilateral	SC
{Lavanda:600.00}	{Salvia sija:600.00}	17	19	0.04	0.03	1.27	0.62	Bilateral	SC
{Lavanda:600.00}	{Salvia sija:700.00}	17	15	0.04	0.01	3.9	0.01	Bilateral	NC

*Comparación entre grupos, valores en amarillo indican que el supuesto de homogeneidad de varianzas no se cumple.

Listado de los integrantes del equipo de investigación

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
M.Sc. Carlos Humberto Ruiz (<i>Ad honorem</i>)	
Br. Lucia López Ruano (<i>Ad honorem</i>)	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Contratados por la Dirección General de Investigación					
Nombre	Categoría	Registro de Personal	PAGO DIGI		FIRMA
			SI	NO	
Josué Rodolfo García Pérez	Profesor I	20070463	x		

Guatemala 14 de febrero de 2020.

Josué Rodolfo García Pérez
Proyecto de investigación

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Elena Valencia de Abril
Coordinador del Programa Universitario de
Investigación Interdisciplinaria en Salud

