

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50}) Y EFICACIA DEL EUGENOL COMO ANESTÉSICO SOBRE *Xiphophorus helleri* (HECKEL, 1848) (CYPRINODONTIFORMES: POECILIDAE)

DETERMINATION OF THE MEDIAN LETHAL CONCENTRATION (LC_{50}) AND EFFICACY AS AN ANESTHETIC OF EUGENOL ON *XIPHOPHORUS HELLERI* (HECKEL, 1848) (CYPRINODONTIFORMES: POECILIDAE)

Carlos Llanos^{1,2}, Carla Monteza¹, Carlos Scotto¹

RESUMEN

Se determinó la concentración letal media (CL_{50}) y la eficacia como anestésico de eugenol a diversas dosis sobre el pez espada *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848). Para la determinación de la CL_{50} se trabajó con 10 individuos en el control y en cada una de las concentraciones con réplicas por triplicado. El estimado del CL_{50} a las 96 h para eugenol fue de 22.12 mg.L⁻¹. La eficacia de anestesia se llevó a cabo con 20 individuos por cada dosis de eugenol. La utilización del anestésico resultó efectivo en las dosis de 100, 125 y 150 mg.L⁻¹, con un tiempo de inducción total de la anestesia (T.I.T.) de 265.4 seg a 100 mg.L⁻¹, 229.8 seg a 125 mg.L⁻¹ y 195.9 seg a 150 mg.L⁻¹ y un tiempo de recuperación total de la anestesia (T.R.T.) de 325.5 seg a 100 mg.L⁻¹, 259.0 seg a 125 mg.L⁻¹ y 246.7 seg a 150 mg.L⁻¹. Se determinó una mayor eficiencia a la inducción y recuperación a la dosis de 125 mg.L⁻¹ mediante el análisis de correlación. Se obtuvieron ecuaciones logarítmicas para las dosificaciones de mayor eficiencia: $y = 118.11\ln(x) + 141.77$; $R^2 = 0.5883$ (Tiempo de inducción vs Peso a una dosis de 125 mg.L⁻¹), $y = 401.33\ln(x) - 349.75$; $R^2 = 0.5786$ (Tiempo de inducción vs Longitud a una dosis de 125 mg.L⁻¹), $y = 172.22\ln(x) + 130.69$; $R^2 = 0.4285$ (Tiempo de recuperación vs Peso a una dosis de 125 mg.L⁻¹), $y = 531.62\ln(x) - 508.64$; $R^2 = 0.3477$ (Tiempo de recuperación vs Longitud a una dosis de 125 mg.L⁻¹). No se observó efectos letales durante la inducción de la anestesia y posterior recuperación.

Palabras clave: *Xiphophorus helleri*, eugenol, concentración letal media, anestesia, dosis

ABSTRACT

The median lethal concentration (CL_{50}) and the anesthetic efficacy of eugenol were determined to diverse doses on the swordfish *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848). For the determination of the CL_{50} was used 10 individuals in triplicate in the control and in

¹ Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima

² E-mail: cllv_bio87@hotmail.com

each concentration. The estimated CL_{50} to 96 h for eugenol was 22.12 mg.L⁻¹. The efficacy of the anesthesia was carried out in 20 individuals per dose of eugenol. The use of the anesthetic was effective in the doses of 100, 125 and 150 mg.L⁻¹, with a total induction time (T.I.T.) of 265.4 sec to 100 mg.L⁻¹, 229.8 sec to 125 mg.L⁻¹, and 195.9 sec to 150 mg.L⁻¹ and a total recovery time (T.R.T.) of 325.5 sec to 100 mg.L⁻¹, 259.0 sec to 125 mg.L⁻¹, and 246.7 sec to 150 mg.L⁻¹. A greater efficacy to the induction and to the recovery of the anesthesia was obtained at the 125 mg.L⁻¹ concentration by correlation analysis. Logarithmic equations for doses of greater efficiency were obtained: $y = 118.1\ln(x) + 141.77$; $R^2 = 0.5883$ (Time of induction vs. Weight to a dose of 125 mg.L⁻¹), $y = 401.33\ln(x) - 349.75$; $R^2 = 0.5786$ (Time of induction vs. Length to a dose of 125 mg.L⁻¹), $y = 172.22\ln(x) + 130.69$; $R^2 = 0.4285$ (Time of recovery vs. Weight to a dose of 125 mg.L⁻¹), $y = 531.62\ln(x) - 508.64$; $R^2 = 0.3477$ (Time of recovery vs. Length to a dose of 125 mg.L⁻¹). Lethal effects were not observed during the induction or recovery of the anesthesia.

Key words: *Xiphophorus helleri*, eugenol, median lethal concentration, anesthesia, dose

INTRODUCCIÓN

La mayoría de especies ícticas, ya sean peces ornamentales o para consumo humano, son sometidas a condiciones de estrés como la pesca, manipulación y transporte para su reproducción en cautiverio y cultivo comercial (Davis y Griffin, 2004). La investigación destinada a disminuir el sufrimiento de los peces cultivados es vital para responder a la preocupación por el bienestar de los peces de cultivo (Ashley, 2007). Varios tipos de anestésicos se están aplicando para disminuir inconvenientes en el manejo de peces. La dosis necesaria para inducir la anestesia varía según el tipo de anestésico y factores como temperatura, dureza, salinidad y concentración de oxígeno en el agua, así como la duración de la exposición, peso corporal, relación del área branquial / cuerpo y la especie (Ross L y Ross B, 2008).

Un anestésico emergente y eficaz para el uso en peces es el aceite de clavo. Es un producto vegetal con muchas aplicaciones en la medicina popular. Su ingrediente activo (IA) es el eugenol (4-alil-2-vaselina) (Munday y Wilson, 1997), que constituye el 70-95% del peso total de la base de aceite de clavo. Se obtiene de la destilación de las flores, ta-

llos de las flores y las hojas de los árboles *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill y Perry, *Eugenia aromatica* (L.) Baillon y *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Soto y Burhanuddin, 1995; Kun *et al.*, 1998; Jirovetz *et al.*, 2006); se le utiliza en odontología como anestésico tópico, y es una alternativa a anestésicos tradicionales como metomidato, quinaldina y metanosulfonato triclaína (Sladky *et al.*, 2001). El eugenol es considerado como mutagénico no cancerígeno. También se ha encontrado que posee propiedades antivirales, antibióticas y antimicóticas (Grush *et al.*, 2004).

El mecanismo exacto de acción del eugenol no está totalmente dilucidado; sin embargo, estudios *in vitro* indican que el eugenol interactúa con los neurotransmisores involucrados en la sensación de dolor, con efecto agonista del ácido gamma-aminobutírico (GABA) y antagonistas de glutamato, que actúa sobre los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ambos de gran importancia en la transmisión del dolor (Aoshima y Hamamoto, 1999; Yang *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2008).

Los ensayos biológicos de toxicidad son eficaces para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de

prueba bajo condiciones experimentales específicas (Fanta *et al.*, 2003). Las consecuencias se evalúan por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación y multiplicación, así como por cambios morfológicos, fisiológicos e histológicos (Castillo, 2004; Napán *et al.*, 2010). Las pruebas letales o de toxicidad aguda (CL₅₀) permiten evaluar los principales efectos de los contaminantes calculando la concentración que resulta letal para el 50% de individuos expuestos a corto plazo (Calabrese *et al.*, 1977). Por tanto, es necesaria la evaluación de compuestos que puedan representar alternativas para el estudio en peces, ya sea por su importancia como recurso biológico o por el valor económico que representan.

Xiphophorus helleri (Heckel, 1848) (Poeciliidae), comúnmente conocido en la acuariofilia como pez espada, es una especie dimórfica cuya distribución geográfica se extiende desde el norte de México hacia el centro y occidente de Guatemala y Honduras en América Central (Axelrod y Wischnath, 1991). Una de las características principales en esta especie es la variación en las aletas (por ejemplo, aleta dorsal alta, aleta caudal lira o combinaciones de ambos) (Tamaru *et al.*, 2001).

El objetivo de presente estudio fue obtener la concentración letal media del eugenol (CL₅₀) a las 96 h y determinar una concentración eficaz como anestésico sobre peces de la especie *X. helleri*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, ubicado en el distrito de El Agustino, Lima, Perú.

Organismos Experimentales

Los 330 especímenes juveniles (sexualmente activos) de *X. helleri* procedieron del stock del laboratorio. Los peces, capturados al azar e indistintamente del sexo, fueron distribuidos y aclimatados durante tres semanas en dos acuarios de 280 L (100 x 70 x 40 cm).

Se usó agua de grifo acondicionada con Aqutan Sera® 0.3 mL.L⁻¹ por 24 h. Se instaló un aireado continuo y se controló diariamente la temperatura (24.4 ± 0.17 °C), pH (7.6 ± 0.18), conductividad eléctrica (0.53 ± 0.05 mS/cm) y promedio de solutos disueltos en el medio (262 ± 17.89 mg.L⁻¹). Además, el fotoperiodo fue controlado (12L/12D).

La toma de peso y longitud de los peces se hizo según Llanos y Scotto (2010), con uso de anestesia para evitar el estrés, tomando las medidas en un corto periodo de tiempo (30 s como máximo). Los peces recibieron alimento en hojuelas Sera® en forma diaria; sin embargo, no recibieron alimento 24 horas antes ni durante el ensayo, para evitar contaminación del medio e interferencias con el tóxico presente.

Protocolo Bioético

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

El experimento se realizó de acuerdo a los lineamientos propuestos por la European Medicines Agency (2007): (a) se seleccionó a los animales de apariencia más saludable y de peso similar, (b) se utilizó el mismo número de machos y hembras, y (c) se aseguró el mínimo número de peces por tratamiento, teniendo conocimiento previo sobre los rangos de las variables a estudiar en la especie, y (d)

se obtuvo un alto nivel de la cría de animales. Las condiciones ambientales fueron controladas. La dieta y el agua fueron estandarizadas en su calidad y composición durante todo el periodo de estudio.

Preparación del Eugenol

Las concentraciones del anestésico partieron de una solución de reserva del 10% (eugenol 5 mL + 45 mL de agua del grifo). De esta manera, al hacer una solución de trabajo de 100 mg.L⁻¹, se tomó 1 mL de la solución madre mezclándolo con 1 L de agua del grifo.

CL₅₀ de Eugenol a las 96 h

Se utilizaron 27 acuarios de vidrio de 20 L (50 x 26 x 30 cm), mantenidos a una temperatura de 24 ± 2 °C durante las 96 h del periodo experimental, y saturado con oxígeno durante 24 h antes de la introducción de los peces. Se realizó la mezcla de solución reserva de eugenol en agua, diluida con un factor 0.6 para obtener concentraciones de 0 (control), 3.9, 6.5, 10.8, 18.0, 30.0, 50.0, 83.4 y 139.0 mg.L⁻¹, respectivamente, en nueve acuarios, con tres réplicas por cada concentración. Se colocaron 10 peces por acuario.

Se registró el número de muertes a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h del estudio. Los peces fueron considerados muertos cuando no había movimiento opercular durante 15 min de observación (o sin que ocurra movimiento ante el estímulo de un estilete).

Inducción del Anestésico

Se empleó el método de «anestesia por inmersión» (Brousse, 1974), donde los peces fueron sumergidos en 2 L de solución anestésica (eugenol mezclado energicamente y agua acondicionada a la misma temperatura del agua de donde fueron extraídos los animales [Hicks, 1989], sin uso de algún disolvente orgánico [Durville y Collet, 2001]). Se emplearon dosis de 100, 125 y 150 mg.L⁻¹,

colocando 20 individuos por dosis. Se observó el comportamiento de los peces y se registró el tiempo en alcanzar las distintas fases de anestesia (I: pérdida de equilibrio; II: pérdida de movimiento corporal, pero con continuo movimiento opercular; III: igual que en la fase II pero con cese de movimiento opercular) (García-Gómez *et al.*, 2002; Llanos y Scotto, 2010), con un cronómetro digital Hanhart CR001.

La eficacia del anestésico fue dada por la pérdida total del equilibrio, sin una visible respuesta o reacción durante su extracción y manipulación (Munday y Wilson, 1997). Los animales anestesiados fueron extraídos de la pecera para ser pesados y medidos (Ross L y Ross B, 2008).

Recuperación de la Anestesia

La pecera de recuperación contenía una alta aireación, tal como lo menciona Hicks (1989). Se observaron las distintas fases de recuperación (I: cuerpo inmovilizado con inicio de movimiento opercular; II: movimientos operculares regulares e inicio de movimiento corporal; III: recuperación del equilibrio y comportamiento similar al de preanestesia) (García-Gómez *et al.*, 2002; Llanos y Scotto, 2010).

La eficacia del anestésico se evaluó en base a un tiempo de inducción igual o inferior a 3 minutos y de recuperación dentro de 5 minutos (Marking y Meyer, 1985).

Análisis de Datos

La eficacia de las dosificaciones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA). Se determinó el CL₅₀ a 96 h mediante el uso del método de ajuste Spearman-Kärber v. 1.5 (Sprague, 1990; Akbari *et al.*, 2010). No hubo mortalidad en los contenedores de control. El análisis de datos se hizo con el programa estadístico Minitab v. 16.1.0 (Llanos y Scotto, 2010).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se observa la mortalidad ocurrida por efecto de la anestesia a diferentes concentraciones de eugenol. Se obtuvo una alta mortalidad inicial en la concentración de 139 mg.L⁻¹, muriendo más de la mitad dentro de las tres primeras horas y una mortalidad total a las 24 horas. Asimismo, la mortalidad fue total a las 72 h en la concentración de 83.4 mg.L⁻¹.

El valor de la CL₅₀ a 96 horas (95% de límites de confianza) del eugenol fue 22.12 mg.L⁻¹ con un límite mínimo de 15.86 y máximo de 30.85 mg.L⁻¹ (Cuadro 2). Se determinó una ecuación logarítmica utilizando el diagrama de dispersión para dos variables dependientes de los tiempos controles y las concentraciones utilizadas para la prueba: $y = -25.94 \ln(x) + 135.61$; $R^2 = 0.8687$ (CL₅₀ vs tiempo del CL₅₀) (Fig. 1).

El eugenol resultó efectivo como anestésico en *X. helleri* a concentraciones de 100, 125 y 150 mg.L⁻¹ en todos los animales. Los

tiempos de inducción variaron según el peso y la longitud de los peces anestesiados (Cuadro 3, Fig. 2). La dosis de 125 mg.L⁻¹ resultó con mayor efectividad en la inducción de la anestesia según el análisis de correlación mostrado en la Cuadro 4.

La recuperación de los animales en concentraciones de 100, 125 y 150 mg.L⁻¹ fue total. Los tiempos de recuperación variaron según el peso y la longitud de los peces anestesiados (Cuadro 3, Fig. 2). La mayor efectividad en la recuperación fue a la dosis de 125 mg.L⁻¹ (Cuadro 4). No se observaron efectos adversos posteriores a la recuperación de los animales.

Las ecuaciones logarítmicas, utilizando diagramas de dispersión para dos variables dependientes de la dosificación con mayor correlación para el tiempo de inducción, fueron: $y = 118.1 \ln(x) + 141.77$; $R^2 = 0.5883$ (peso corporal vs tiempo de inducción a una dosis de 125 mg.L⁻¹) (Fig. 3), $y = 401.33 \ln(x) - 349.75$; $R^2 = 0.5786$ (longitud corporal vs tiempo de inducción a una dosis de 125 mg.L⁻¹) (Fig. 4).

Cuadro 1. Mortalidad de *Xiphophorus helleri* (n=30) expuestos a varias concentraciones de eugenol durante la prueba de CL₅₀ a 96 horas

Concentración de eugenol (mg.L ⁻¹)	Número de muertes durante las horas de control (h)						
	3	6	12	24	48	72	96
139.0	20	3	5	2	-	-	-
83.4	11	1	3	5	5	5	-
50.0	5	1	4	1	5	4	2
30.0	0	3	2	1	4	1	2
18.0	0	3	1	1	3	2	2
10.8	0	1	1	2	2	1	2
6.5	0	0	1	2	0	2	2
3.9	0	0	0	0	0	0	0
Control (0)	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 2. CL_{50} del eugenol y límites de confianza mínimo y máximo para *Xiphophorus helleri* entre las 3 y 96 horas¹

Tiempo (h)	CL_{50} (mg.L ⁻¹)	Límite mínimo de confianza	Límite máximo de confianza
3	109.21	63.62	140.96
6	94.67	68.12	131.89
12	64.73	46.39	90.56
24	46.80	34.17	64.09
48	33.89	24.36	47.16
72	26.21	19.02	36.11
96	22.12	15.86	30.85

¹ Los datos son la media de las repeticiones por triplicado

Cuadro 3. Tiempo de inducción y recuperación (promedio \pm d.e.) empleando eugenol como anestésico, a una temperatura de 24 °C, en peces *Xiphophorus helleri* (n=60)

Dosis		100 mg.L-1	125 mg.L-1	150 mg.L-1
Peso medio (g)		2.24 \pm 0.67	2.18 \pm 0.58	2.24 \pm 0.67
Longitud (cm)		4.3 \pm 0.35	4.25 \pm 0.33	4.31 \pm .31
Tiempo de inducción (seg)	Fase I	41.5 \pm 13.4	26.2 \pm 9.0	19.7 \pm 7.9
	Fase II	33.7 \pm 19.4	27.3 \pm 17.2	19.0 \pm 10.6
	Fase III	190.3 \pm 65.6	176.3 \pm 36.0	157.2 \pm 34.9
	Total	265.4 \pm 66.8	229.8 \pm 41.7	195.9 \pm 32.3
Tiempo de recuperación (seg)	Fase I	22.1 \pm 15.0	12.5 \pm 3.7	9.9 \pm 3.5
	Fase II	188.1 \pm 78.4	167.0 \pm 63.8	172.9 \pm 42.9
	Fase III	115.3 \pm 84.7	79.6 \pm 33.8	66.0 \pm 25.6
	Total	325.5 \pm 102.3	259.0 \pm 71.3	246.7 \pm 50.7

Las ecuaciones logarítmicas, utilizando diagramas de dispersión para dos variables dependientes de la dosificación con mayor correlación para el tiempo de recuperación fueron: $y = 172.22 \ln(x) + 130.69$; $R^2 = 0.4285$

(peso vs tiempo de recuperación a una dosis de 125 mg.L⁻¹) (Fig. 5), $y = 531.62 \ln(x) - 508.64$; $R^2 = 0.3477$ (Longitud vs Tiempo de recuperación a una dosis de 125 mg.L⁻¹) (Fig. 6).

Cuadro 4. Coeficiente de Correlación de Pearson entre longitud (cm) y peso corporal (g) de peces *Xiphophorus helleri* sometidos a pruebas anestésicas con eugenol (p<0.05)

	Coeficiente de correlación		
	Peso vs Tiempo de inducción total		
Dosis (mg.L ⁻¹)	100	125	150
Correlación de Pearson	0.46	0.76	0.40
Significancia	0.04	0.00	0.00
	Peso vs Tiempo de recuperación total		
	Dosis (mg.L ⁻¹)	100	125
Correlación de Pearson	0.46	0.65	-0.12
Significancia	0.041	0.002	0.62
	Longitud vs Tiempo de inducción total		
	Dosis (mg.L ⁻¹)	100	125
Correlación de Pearson	0.49	0.76	0.38
Significancia	0.027	0.00	0.10
	Longitud vs Tiempo de recuperación total		
	Dosis (mg.L ⁻¹)	100	125
Correlación de Pearson	0.4	0.59	-0.077
Significancia	0.08	0.006	0.75

DISCUSIÓN

El CL₅₀ a las 96 horas del eugenol en *X. helleri* de 22.12 mg.L⁻¹ fue similar al observado en peces *Danio rerio* (Grush *et al.*, 2004) de 21 mg.L⁻¹, pero muy diferente al observado en truchas *Ocorhynchus mykiss* (Keene *et al.*, 1998) de 9 mg.L⁻¹. *X. helleri* mostró mayor resistencia al eugenol, donde se observó el 100% de mortalidad a las 96 horas a una concentración de 50 mg.L⁻¹ en comparación a *D. rerio* a 30 mg.L⁻¹ y *O. mykiss* a 15 y 30 mg.L⁻¹. Para el caso de *X. helleri* a las 96 horas en la concentración de 30 mg.L⁻¹ se obtuvo aproximadamente la mitad de individuos muertos, indicando que los

peces de esta especie son más resistentes a concentraciones superiores de eugenol.

El eugenol resultó efectivo como anestésico a concentraciones de 100, 125 y 150 mg.L⁻¹ en todos los individuos, siendo proporcional el peso y tamaño con el tiempo de inducción y tiempo de recuperación (Figs. 3 a 6). Según los criterios que deben reunir los anestésicos (Marking y Meyer, 1985), la duración razonable de la exposición debe ser alrededor de tres minutos o menos y permitir la recuperación dentro de los cinco minutos. Las concentraciones tomadas en este ensayo cumplen con este criterio, siendo la concentración de 125 mg.L⁻¹, la que presentó la mayor correlación en tiempo de inducción y recuperación.

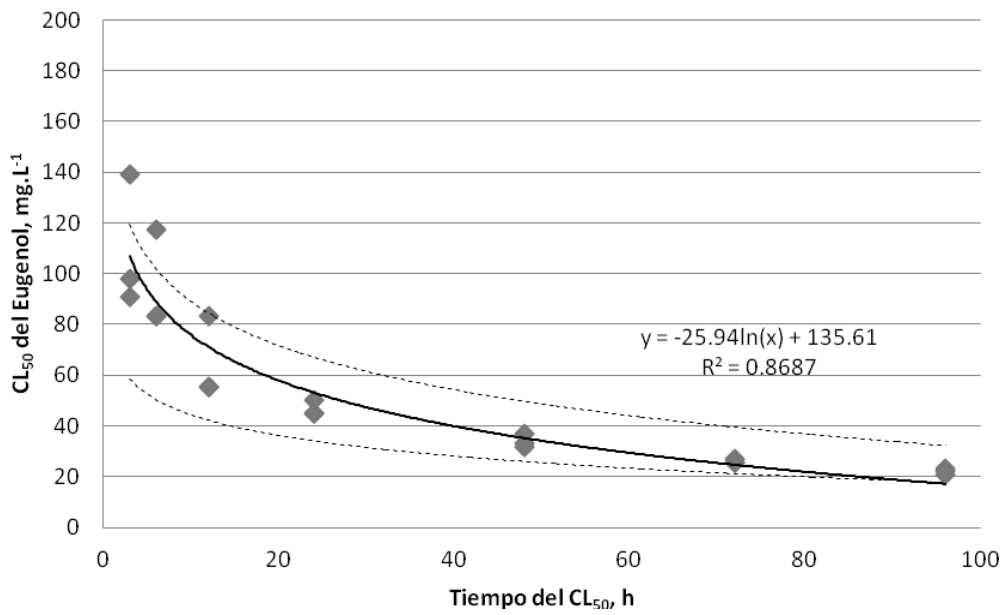


Figura 1. CL₅₀ durante el tiempo de exposición de 3 a 96 horas de eugenol sobre *Xiphophorus helleri*. Los puntos representan la CL₅₀ de 10 peces y las líneas punteadas el 95% de intervalo de confianza

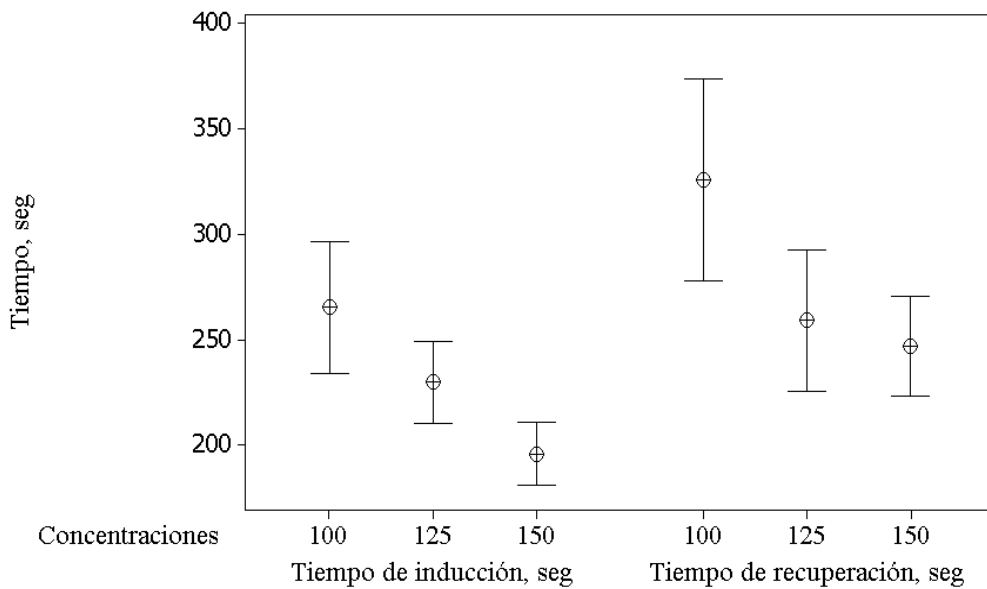


Figura 2. Tiempo total requerido para lograr la inducción y recuperación a la anestesia en peces *Xiphophorus helleri*. Los círculos pequeños representan la media y las barras horizontales representan la variación con el 95% de intervalo de confianza

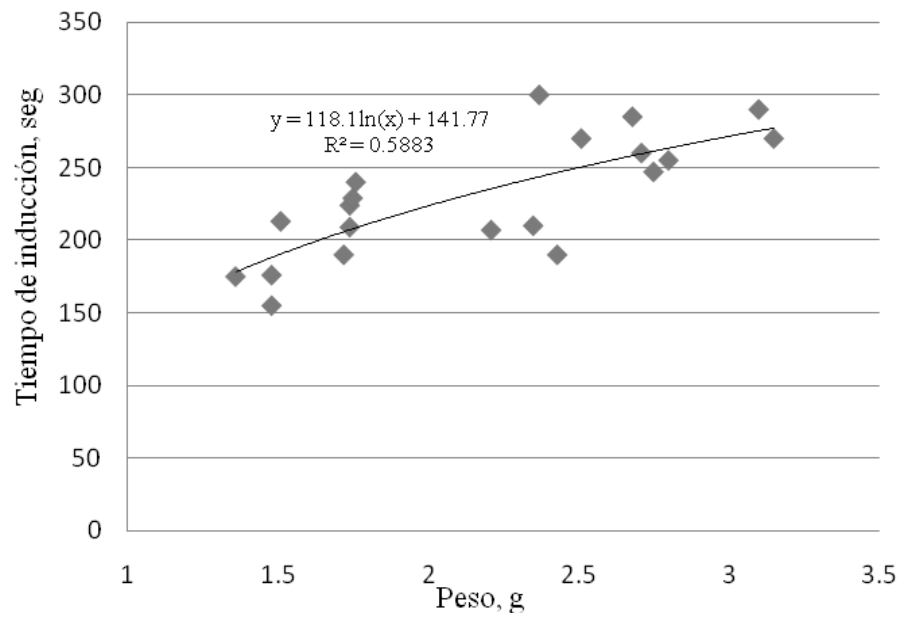


Figura 3. Determinación de la ecuación logarítmica entre peso vs tiempo de inducción a una dosis de 125 mg.L⁻¹ en individuos de *X. helleri*. Se empleó el mayor coeficiente de correlación entre estas dos variables, n=20

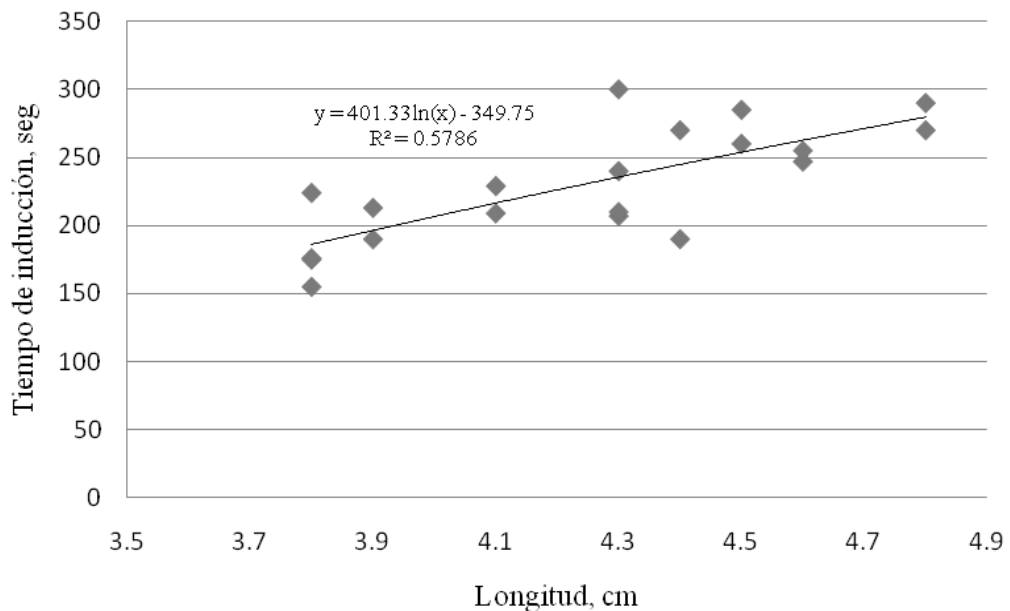


Figura 4. Determinación de la ecuación logarítmica entre longitud vs tiempo de inducción a una dosis de 125 mg.L⁻¹ en individuos de *X. helleri*. Se empleó el mayor coeficiente de correlación entre estas dos variables, n=20

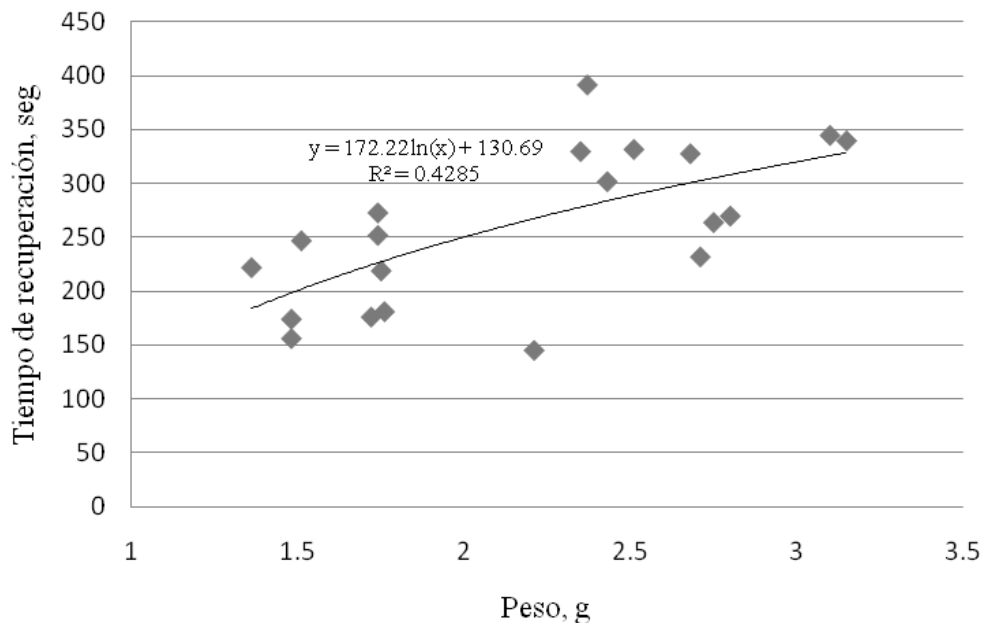


Figura 5. Determinación de la ecuación logarítmica entre peso vs tiempo de recuperación a una dosis de 125 mg.L^{-1} en individuos de *X. helleri*. Se empleó el mayor coeficiente de correlación entre estas dos variables, $n=20$

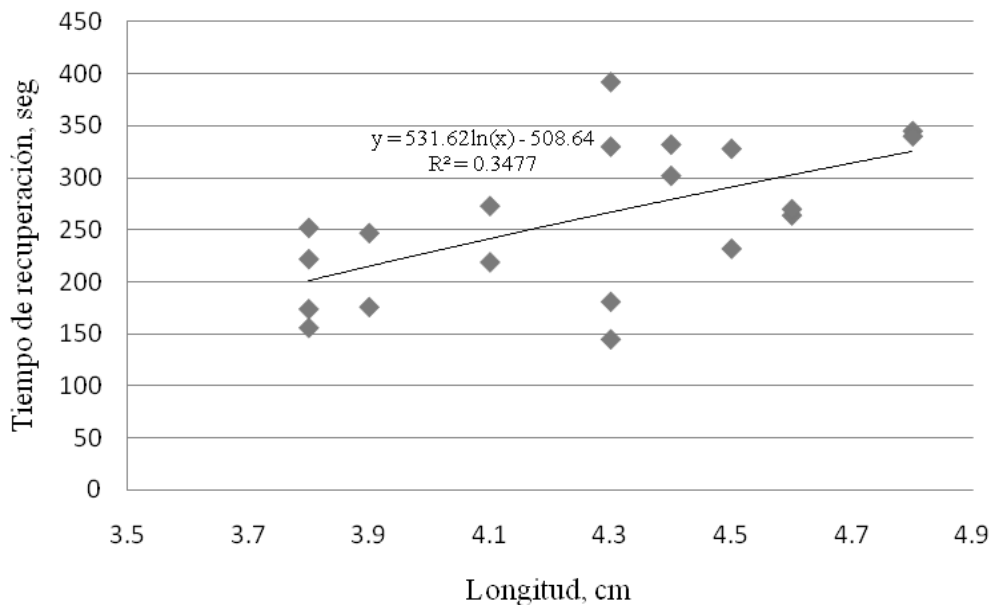


Figura 6. Determinación de la ecuación logarítmica entre longitud vs tiempo de recuperación a una dosis de 125 mg.L^{-1} en individuos de *X. helleri*. Se empleó el mayor coeficiente de correlación entre estas dos variables, $n=20$

El tiempo de inducción obtenido en este estudio es menor que en los ensayos de Costas *et al.* (2010) con *O. mykiss* y *Carassius auratus* tomando de referencia la concentración de 100 mg.L⁻¹. *O. mykiss* es un pez con mayor actividad respiratoria en comparación a *C. auratus*, sugiriendo que *X. helleri* tiene una actividad respiratoria más lenta frente a estos dos individuos, siendo de ese modo más tolerante al eugenol.

No se observaron efectos letales durante la inducción de la anestesia y la posterior recuperación, cumpliendo de esta manera el criterio principal del anestésico ideal (Marking y Meyer, 1985). Asimismo, es importante analizar los efectos acumulativos o fisiológico específicos posteriores a la inducción a la anestesia en *X. helleri* (Grush *et al.*, 2004; Ross L y Ross B, 2008), por lo que este factor debe considerarse en futuros estudios con esta especie.

Cabe mencionar que el uso de eugenol representa una gran ventaja financiera debido a su bajo precio comparado con otros anestésicos convencionales como el MS-222 (Keene *et al.*, 1998; Llanos y Scotto, 2010).

CONCLUSIONES

- La concentración letal media del eugenol (CL₅₀) a las 96 h ocurrió a una concentración de 20.02 mg.L⁻¹
- La mejor eficacia del eugenol como anestésico sobre *Xiphophorus helleri* se obtuvo a la concentración de 125 mg.L⁻¹

LITERATURA CITADA

1. Akbari S, Khoshnod M, Rajaian H, Afsharnasab M. 2010. The use of eugenol as an anesthetic in transportation of with Indian shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) post larvae. Turkish J Fish Aquat Sci 10: 423-429.
2. Aoshima H, Hamamoto K. 1999. Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. Biosci Biotech Bioch 63: 743-748.
3. Ashley P. 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. Appl Anim Behav Sci 104: 199-235.
4. Axelrod A, Wischnath L. 1991. Swordtails and platies. New Jersey, USA: TFH Publications. 192 p.
5. Brousse J. 1974. L'anesthésie des poissons. Toulouse: Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse. 55 p.
6. Calabrese A, Thurberg F, Gould E. 1977. Effects of cadmium, mercury and silver on marine animals. Mar Fish Rev 39(4): 5-11.
7. Castillo G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. 202 p.
8. Costas P, Cosmas N, Evangelia G, Ugwemorubong U, Konstantina B, Fotini A, Ageliki P, Ioannis P. 2010. Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). Acta Vet Brno 79: 481-490.
9. Davis K, Griffin B. 2004. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. Aquaculture 233: 531-548.
10. Durville P, Collet A. 2001. Clove oil used as an anaesthetic with juvenile tropical marine fish. SPC Live Reef Fish Info Bull 9: 17-19.
11. European Medicines Agency. 2007. Guideline on repeated dose toxicity. [Internet], [30 febrero 2012]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003103.pdf
12. Fanta E, Sant'Anna F, Romao S, Casagrande A, Freiberger S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras*

- paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotox Environ Safe* 54: 119-130.
13. **García-Gómez A, De la Gándara F, Raja T. 2002.** Utilización del aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* L. (Merr. & Perry), como anestésico eficaz y económico para labores rutinarias de manipulación de peces marinos cultivados. *Bol Inst Español Oceanografía* 18: 21-23.
 14. **Grush J, Noakes D, Moccia R. 2004.** The efficacy of clove oil as an anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish* 1: 46-53.
 15. **Hicks B. 1989.** Anaesthetics: sweet dreams for fragile fish. *Can Aquacult* 89: 29-31.
 16. **Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanov A, Schmidt E. 2006.** Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J Agr Food Chem* 54: 6303-6307.
 17. **Keene J, Noakes D, Moccia R, Soto C. 1998.** The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 29: 89-101.
 18. **Kun S, Kwon S, Kim H, Chan H, Kang S. 1998.** Constituents from *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry. *Nat Prod Sci* 4: 263-267.
 19. **Llanos C, Scotto C. 2010.** Eugenol como anestésico para labores de manipulación de *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *The Biologist (Lima)* 8: 179-188.
 20. **Marking L, Meyer F. 1985.** Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* 10: 2-5.
 21. **Munday P, Wilson S. 1997.** Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *J Fish Biol* 51: 931-938.
 22. **Napán K, Llanos C, Paredes C. 2010.** Toxicidad aguda de metomilo en *Poecilia latipinna* (Lesueur, 1821) (Poeciliidae). *The Biologist (Lima)* 8: 21-28.
 23. **OIE [Organización Mundial de Sanidad Animal]. 2011.** Utilización de animales en la investigación y educación. [Internet], [30 febrero 2012]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.7.8.htm#article_1.7.8.3
 24. **Oliveira L, Branco R, Luscher A, Danile A, Rocha T, Baiana G. 2008.** Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesqui Agropecu Bras* 43: 1069-1074.
 25. **Ross L, Ross B. 2008.** Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3° ed. Oxford, UK: Blackwell. 222 p.
 26. **Sladky K, Swanson C, Stoskopf M, Loomis M, Lewbart G. 2001.** Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachipomus*). *Am J Vet Res* 62: 337-342.
 27. **Soto C, Burhanuddin. 1995.** Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 136: 149-152.
 28. **Sprague J. 1990.** Aquatic toxicology. Schreck C, Moyle P (eds). *Methods for fish biology*. Maryland, USA: American Fisheries Society. p 491-528.
 29. **Tamaru C, Cole B, Bailey R, Brown C, Ako H. 2001.** A manual for commercial production of the swordtail, *Xiphophorus helleri*. USA: Center for Tropical and Subtropical Aquaculture. 128 p.
 30. **Taylor P, Roberts S. 1999.** Clove oil: an alternative anesthetic for aquaculture. *N Am J Aquacult* 61: 150-155.
 31. **Yang B, Piao Z, Kim Y, Lee C, Lee J, Park K, et al. 2003.** Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J Dent Res* 82: 781-785.