

Efecto sedante de un extracto alcohólico de *Valeriana* sp en alevinos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) para la reducción de estrés durante transporte simulado

Sedative effect of an alcoholic extract of *Valeriana* sp in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) to reduce stress during simulated transport

Tessy Montañez Calero¹, Diego Díaz Coahila¹, Pedro Angulo Herrera¹, Luis Cerro Temoche², César Cruz-Castellón³, Wilfredo Vásquez-Quispesivana³, César Aquiles Lázaro de la Torre^{1,4}

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto sedante de tres productos: extracto de valeriana (*Valeriana officinalis*), benzocaína y metanosulfonato de tricaína (MS-222) sobre los niveles de estrés producidos por un modelo de transporte simulado en alevinos de tilapias. En una primera parte se determinó la dosis sedante de los productos con base a las características clínicas que indiquen depresión del sistema nervioso central. En la segunda parte se realizó la sedación y posterior transporte simulado de 3 horas. Se realizó la eutanasia de los peces y se tomaron muestras de sangre de la vena caudal para determinar los niveles de cortisol (ELISA), glucosa (glucómetro portátil), parámetros hematológicos y mortalidad. Las dosis óptimas de sedación fueron para

¹ Laboratorio de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Departamento Académico de Acuicultura e Industrias Pesqueras, Facultad de Pesquería, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

⁴ E mail: clazarod@unmsm.edu.pe

Recibido: 23 de agosto de 2021

Aceptado para publicación: 23 de abril de 2022

Publicado: 29 de junio de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

extracto de valeriana, benzocaína y MS-222 de 200, 35 y 75 mg/l respectivamente. Luego de las 3 h de transporte simulado los valores de cortisol y glucosa fueron similares o superiores comparados con el grupo control no sedado. El hematocrito no presentó variación significativa ($p>0.05$) en el grupo tratado con valeriana, mientras que los otros grupos tratados presentaron valores inferiores al control ($p<0.05$). Todos los grupos tratados presentaron valores bajos de proteínas totales ($p<0.05$) y ninguno de los grupos presentó mortalidad. Se concluye que, aunque fue posible establecer un estado de sedación de los alevinos de tilapia con dosis específicas de benzocaína, MS-222 y el extracto de valeriana, las dosis no fueron suficientes para reducir el estrés durante el transporte simulado por 3 h.

Palabras clave: alevinos, estrés, sedación, transporte simulado

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the sedative effect of three products: valerian extract (*Valeriana officinalis*), benzocaine and tricaine methanesulfonate (MS-222) on stress levels produced by a simulated transport model in tilapia fingerlings. In a first part, the sedative dose of the products was determined based on the clinical characteristics that indicate depression of the central nervous system. In the second part, sedation and subsequent simulated transport for 3 hours were performed. The fish were euthanized, and blood samples were taken from the tail vein to determine cortisol (ELISA) and glucose (portable glucometer) levels, haematological parameters and mortality. The optimal doses of sedation were 200, 35 and 75 mg/l, respectively, for valerian extract, benzocaine and MS-222. After 3 h of simulated transport, cortisol and glucose values were similar or higher compared to the non-sedated control group. The haematocrit did not present significant variation ($p>0.05$) in the group treated with valerian, while the other treated groups presented lower values than the control ($p<0.05$). All the treated groups presented low total protein values ($p<0.05$) and none of the groups presented mortality. It was concluded that, although it was possible to establish a state of sedation in tilapia fingerlings with specific doses of benzocaine, MS-222 and valerian extract, the doses were not sufficient to reduce stress during simulated transport for 3 h.

Key words: fingerlings, stress, sedation, simulated transport

INTRODUCCIÓN

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es la segunda especie más importante en la acuicultura peruana, registrando una producción anual de 1930.8 t en 2019, la cual se concentra mayormente en los departamentos de Piura (67%), San Martín (27%) y Lima (6%) (SANIPES, 2020). El transporte de alevinos es una práctica común por parte de los piscicultores cuando los adquieren

para el engorde en las piscigranjas. Este procedimiento es considerado como un factor de estrés que puede ocasionar mortalidad y variaciones tanto bioquímicas como hematológicas (Nesse *et al.*, 2007; Kubitzka, 2009). El marcador clásico de la respuesta primaria frente al estrés es el cortisol, mientras que la glucosa y algunos parámetros hematológicos podrían ser considerados como marcadores complementarios (Sampaio y Freire, 2016).

Con el objetivo de reducir el estrés del transporte de los peces se usan anestésicos como el MS-222 y la benzocaína, ambos relacionados con el bloqueo de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje. Estos fármacos se mezclan en el agua y se absorben rápidamente a través de las branquias (Carter *et al.*, 2011; Weber, 2009). Asimismo, se han estudiado diversas plantas con propiedades sedantes que puedan cumplir la misma función, pero con la ventaja de no producir efectos secundarios, no requieren un periodo de retiro y son económicos (Jerez *et al.*, 2019). Entre los productos naturales más usados, se encuentran el aceite de clavo (*Eugenia caryophyllata*), el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*) y la canela (*Cinnamomum zeylanicum*).

La valeriana (*Valeriana officinalis*) es una planta muy conocida en América y Europa por sus propiedades sedantes y ansiolíticas en humanos (Medina *et al.*, 2008; Villar del Fresno y Carretero, 2001). Los componentes más importantes que le confieren estas propiedades son atribuidos al ácido valerianico y al valepotriato, compuestos con acción depresora del sistema nervioso central debido a que interactúa con los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA), promoviendo el ingreso de cloro y ocasionando la inhibición neural (Fernández *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2010). Su efecto anestésico ha sido evaluado previo al transporte de los peces en el caso de la trucha arcoíris (Hajibeglou y Sudagar, 2018) y en el pez cola de espada (Abasali y Mohamad, 2010). Ante esto, el objetivo del estudio fue determinar las dosis sedantes de un extracto de *Valeriana* sp, así como de la benzocaína y del MS-222 en alevinos de tilapias del Nilo (*O. niloticus*) y evaluar su efecto sobre parámetros bioquímicos, hematológicos y mortalidad posterior al transporte simulado de tres horas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los alevinos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) fueron proporcionados por el Centro de Investigación Piscícola (CINPIS) de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú). Su alimentación fue a base de concentrado comercial peletizado (Purtilapia 45, Purina). Se seleccionaron 440 alevinos de 6-15 g de peso, 8-13 cm de longitud, de ambos sexos y clínicamente sanos. De estos, 240 se utilizaron para la determinación de las dosis sedantes y 200 para la evaluación de las dosis sedantes en un modelo de estrés por transporte simulado.

Soluciones de *Valeriana* sp, benzocaína y MS-222

Se utilizaron 500 g de raíces de valeriana (*Valeriana officinalis*) proporcionada por la empresa Exportadora, Importadora y Distribuidora Perú Nutrition S.R.L. Se seleccionaron raíces entre 2 y 6 cm de longitud y de coloración marrón oscuro, que fueron lavadas con agua destilada, secadas a 37 °C por 7 días y molidas. El producto pulverizado (250 g) se almacenó a temperatura ambiente en un frasco ámbar para evitar alteraciones por efecto de la luz. A partir de esto se prepararon soluciones al 15 y 20% con etanol al 96% y maceradas durante 7 días con una agitación cada 24 horas. Posteriormente se filtró con papel Whatman N.º 40 y el líquido obtenido fue almacenado a 4 °C (Camacho y Honorio, 2017). Por otro lado, también se preparó una solución alcohólica de benzocaína (Sigma-Aldrich) y una solución acuosa de MS-222 (Sigma-Aldrich) neutralizada con NaHCO₃ (CDH) en una proporción de 1:2. Debido a que MS-222 fue preparado en base acuosa, se adicionó etanol al 96% en los re-

recipientes/bolsas con los peces en el mismo volumen usado para la valeriana y la benzocaína. Estos procedimientos fueron realizados en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú).

Dosis Sedante

Debido a que no se encontraron reportes de dosis sedantes específicos para alevinos de tilapias, se utilizaron como base dosis de 50 mg/l para valeriana (Hajibeglou y Sudagar, 2018), 40 mg/l para benzocaína (Saldanha *et al.*, 2018) y 80 mg/l para MS-222 (Pirhonen y Schreck, 2003). Tomando como base estos valores, los alevinos fueron sometidos a diferentes concentraciones para determinar las dosis sedantes. En el caso del extracto alcohólico de valeriana se utilizaron las dosis de 75, 100, 150 y 200 mg/l, para la benzocaína (Castro, 2018) las dosis de 30, 35, 40, 45 y 50 mg/l y para MS-222 las dosis de 70, 75, 80, 85 y 100 mg/l. Para esto, se prepararon recipientes de 4 L de agua con 5 alevinos por recipiente y por dosis; además, se utilizó un grupo control al que solo se le adicionó etanol 96% en la proporción usada para preparar las soluciones sedantes y un grupo blanco que no contenía componente externo alguno. Los peces permanecieron en esas condiciones por 30 min y luego fueron transferidos a otro recipiente de 4 L de agua fresca para su recuperación. El procedimiento para la determinación de la dosis sedante fue repetido tres veces en el mismo día en las instalaciones del CINPIS, siendo utilizados grupos diferentes de alevinos para cada repetición para tener mayor seguridad con las observaciones.

La dosis sedante óptima se determinó de acuerdo con el comportamiento de los alevinos según: 1) Equilibrio, se mantiene la posición normal de nado; 3) Movimientos operculares, menores a 140 movimientos/min; 3) Respuesta a estímulos externos, inmóvil al ver a una persona y al intentar ser tocados; y

4) Posición, ubicados en el fondo del recipiente. Estos criterios fueron adaptados de las etapas de anestesia en peces (Woody *et al.*, 2002; Mohammadi y Khara, 2014), a excepción de la posición que fue una característica observada en este experimento.

Para establecer la dosis sedante se consideró el siguiente patrón de comportamiento para cada grupo de cinco peces: al menos tres peces con equilibrio normal, movimientos operculares disminuidos (<140 movimientos/min) y ausencia de respuesta a estímulos externos, mientras que al menos un pez posicionado en el fondo del recipiente (Figura 1). Asimismo, se registró el tiempo de latencia, medido desde la aplicación de la sustancia sedante hasta alcanzar la etapa de sedación.

Transporte , Muestras y Análisis

Se formaron cuatro grupos, cada uno con 50 alevinos: Control, Valeriana, Benzocaína y MS-222. Se prepararon bolsas dobles transparentes de polietileno de baja densidad (75x50 cm), cada una con 4 L de agua que llenaba la tercera parte de la bolsa. En cada bolsa se colocó el producto a evaluar y cinco alevinos; luego se inyectó oxígeno al 95% hasta completar las otras dos terceras partes y se cerraron haciéndolas girar sobre su eje y sujetándolas con tiras de hule para que el oxígeno no escape (FAO, 2014).

En el caso del grupo control solo se aplicó alcohol al 96% en la misma cantidad utilizada para la preparación de las soluciones de cada tratamiento. Las bolsas de los cuatro grupos fueron colocadas en cajas de plástico y transportadas desde el CINPIS (La Molina, Lima) hasta el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (San Borja, Lima), permaneciendo en estas condiciones por tres horas.

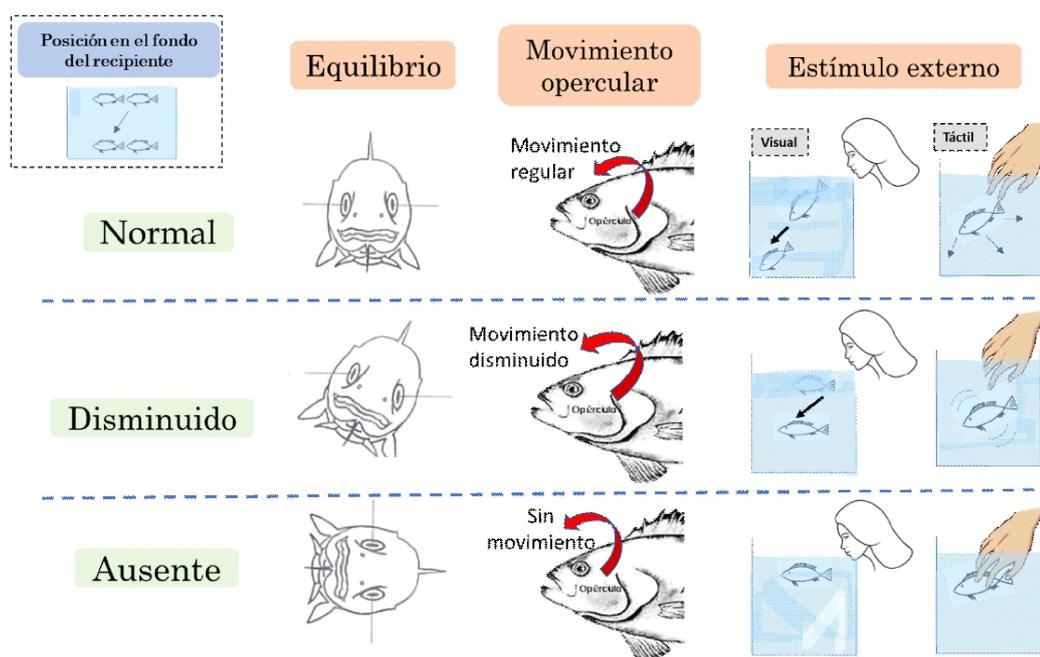


Figura 1. Determinación de la condición de sedación en base: Equilibrio (normal), Movimientos operculares (disminuido), Respuesta a estímulos externos (ausente), Posición (al menos un pez en el fondo del recipiente)

Muestras de sangre

Culminado el tiempo del transporte simulado se realizó la eutanasia de los alevinos utilizando una dosis de 250 mg/l de MS-222 (AVMA, 2020) y se procedió a la extracción de sangre mediante un corte de la base del pedúnculo caudal (Witeska *et al.*, 2022). Con ayuda de una micropipeta se retiró entre 55 a 65 μ l de sangre directamente de los vasos sanguíneos del pedúnculo caudal de cada alevino, y colocado en tubos cónicos de 500 μ l (Eppendorf®) previamente heparinizados. Debido al tamaño de los peces y a la cantidad mínima de plasma necesaria para la determinación del cortisol se optó por la formación de «pools» con la sangre recolectada de cinco alevinos del mismo tratamiento obteniendo entre 275 a 325 μ l de sangre por cada pool. De esta forma se obtuvieron 10 pools por tratamiento (SERNAPESCA, 2018).

Niveles de cortisol

Los niveles de cortisol en el plasma fueron determinados con el kit comercial Cortisol ELISA Kit N.º 402710 (Neogen Corporation®). Para esto, la sangre de cada pool fue centrifugada (Gemmy-PCL-02, Taiwan) a 1800 g durante 5 min, luego se separó el plasma (150-200 μ l) y se inició el proceso de extracción del cortisol utilizando 100 μ l de plasma siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit. La cuantificación del cortisol se hizo en un lector de microplacas de ELISA (ELx808, Biotek Instruments) con una longitud de onda de 650 nm

Hematocrito, proteínas totales y glucosa

La determinación del hematocrito se realizó con microcapilares con anticoagulante de 75 mm de largo y 1.1 mm de diámetro

(Vitrex, Dinamarca), los cuales se llenaron en un 75% de su capacidad con sangre directamente del corte realizado en el pedúnculo caudal de los alevinos. Los capilares fueron sellados en uno de los extremos con calor y llevados a la centrifuga de microcapilares (DLAB-DM1224, China) a 13 680 g durante 5 min. La lectura se hizo con una regla de microhematocrito.

La concentración de las proteínas totales en el plasma se determinó con un refractómetro mecánico (RHC-200, China) previamente calibrado. Para esto, los microcapilares usados en la determinación del hematocrito fueron quebraron por encima de la capa flogística y se colocó una gota en el prisma principal del refractómetro evitando la formación de burbujas. Los resultados se expresan en g/dl

La medición de glucosa sanguínea se realizó con un glucómetro comercial de tiras reactivas (Accu-Chek®). Este procedimiento requirió 1 µl de sangre que fue colocado en la tira reactivas y medida en el glucómetro. El resultado se expresa en mg/dl.

Mortalidad

El recuento de la mortalidad se realizó al término de las 3 h de transporte simulado.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba Shapiro-Wilk para confirmar que los datos seguían una distribución normal. Las variables fueron cuantitativas, continuas y normales. Se utilizó el análisis de varianza para contrastar la hipótesis nula que las medias tenían una variación menor al 5%. En los casos en los que la hipótesis nula se rechazó se procedió a realizar la prueba de Tukey para determinar en qué grupos de tratamiento se hallaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Los análisis fueron ejecutados con ayuda del paquete estadístico GraphPad Prism® 5.00 para Mac.

Consideraciones Éticas

Los procedimientos utilizados en la presente investigación fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con registro CEBA-2019-012.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dosis Sedante

Las dosis sedantes óptimas para los alevinos de tilapia fueron 200, 75 y 35 mg/l para valeriana, benzocaína y MS-222, respectivamente. Asimismo, se determinó que los tiempos de latencia y recuperación fueron de 30 y 85, 105 y 90, y 75 y 65 s para los tres anestésicos, respectivamente. No fue posible encontrar reportes del uso de valeriana como sedante en alevinos de tilapia; sin embargo, Hajibeglou y Sudagar (2018) aplicaron extracto de valeriana en truchas arcoíris a una dosis de 50 mg/l en un modelo de transporte de 16 h, mientras que Abasali y Mohamad (2010) utilizaron 1 g/l en peces ornamentales cola de espada (*Xiphophorus helleri*) de 2.5 g de peso en un modelo de transporte de 24h. En ambos trabajos, las dosis usadas fueron suficientes para reducir el estrés del transporte. En el presente estudio, 200 mg/l de extracto de valeriana fueron suficientes para inducir sedación en los alevinos de tilapia.

Por otro lado, los resultados para el caso de benzocaína se aproximan a los de Saldanha *et al.* (2018) que obtuvieron tiempos de inducción y recuperación de 86 y 15 s y de 30 y 10 s, respectivamente, para alevinos de tilapia que recibieron 20 y 40 mg/l de benzocaína durante un transporte simulado de 5 h. Asimismo, Rucinke *et al.* (2016) utilizaron una dosis de 100 mg/l de benzocaína en tilapias juveniles encontrando una pérdida del eje de nado a los 3 min y la recuperación

a los 5 min. En el caso de MS-222, Pirhonen y Schreck (2003) y Hoskonen y Pirhonen (2006) determinaron 80 y 70 mg/l, respectivamente, en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de entre 25 y 79 g para disminuir el estrés durante la manipulación. Mohammadi y Khara (2014), asimismo, determinaron una dosis de 150 mg/l para anestésiar truchas arcoíris con MS-222. No obstante, se considera que todo anestésico debe ser evaluado para las condiciones de cada medioambiente, ya que sus efectos responden a la especie, y pueden modificarse por variaciones en condiciones de crianza, manejo y estrés, entre otros.

Transporte Simulado

Los niveles de cortisol plasmático encontrados en los alevinos tratados con los tres anestésicos fueron similares a los del grupo Control; sin embargo, los valores de cortisol al utilizar MS-222 fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que al utilizar valeriana o benzocaína (Cuadro 1). El cortisol es considerado como el biomarcador más importante para la evaluación del estrés, pudiendo por lo tanto incrementarse durante el transporte de los peces (Sampaio y Freire, 2016). Hajibeglou y Sudagar (2018) utilizaron 50 mg/l de un extracto de valeriana en truchas arcoíris en un modelo de transporte de 16 h encontrando valores de cortisol inferiores a los controles. Asimismo, Abasali y Mohamad (2010) evaluaron el efecto de la valeriana en peces cola de espada (*X. helleri*) en un modelo de transporte de 24 h encontrando valores en músculo por debajo de 60 ng/g, siendo inferior al valor de 80 ng/g del grupo control. Los efectos de *V. officinalis* como calmante, sedante y ansiolítico podrían ser atribuidos al ácido valerénico, flavonoides como la 6-metilapigenina y glucósidos como linarina y hesperidina, siendo que la combinación de estos componentes potencia los efectos de la planta (Fernández *et al.*, 2004).

Navarro *et al.* (2016) utilizaron 40 mg/l de benzocaína en tilapias para reducir el estrés durante el transporte simulado de 3.5 h, obteniendo valores de 11.7 ± 3.87 ng/ml de cortisol frente a 6.74 ± 5.89 ng/ml del grupo control. En el presente estudio se usó 35 mg/l de benzocaína sin que haya afectado los valores de cortisol. Por otro lado, el grupo tratado con MS-222 presentó un valor alto de cortisol (151.30 ng/ml), resultado similar al reportado por Mohammadi y Khara (2014) en truchas arcoíris (*O. mykiss*). Es importante señalar que el efecto de la forma de eutanasia en el experimento no fue considerado un factor de importancia para los valores de estrés, toda vez que Küçük (2010) concluye que MS-222 utilizado en dosis letales no ocasiona incremento de los niveles de cortisol o glucosa.

Los niveles de glucosa fueron significativamente más altos en el grupo tratado con valeriana, seguido del grupo tratado con benzocaína en comparación con el grupo control ($p < 0.05$; Cuadro 1). No obstante, Hajibeglou y Sudagar (2018) evaluaron un extracto de valeriana (50 mg/l) en truchas arcoíris en un modelo de transporte de 16 h encontrando menores niveles de glucosa que en el grupo control. Se entiende que se liberan catecolaminas y cortisol plasmático como parte de la respuesta primaria al estrés, determinando que se movilicen las reservas energéticas mediante la inducción de la gluconeogénesis y la glucogenólisis, a fin de que el individuo pueda hacer frente al evento estresante debido a la mayor demanda de energía; esto implica que se pueda observar un aumento de glucosa a nivel sanguíneo (Sampaio y Freire, 2016).

El incremento de los valores de glucosa en el grupo tratado con benzocaína también fue reportado por Oliveira *et al.* (2009) y Navarro *et al.* (2016) al utilizar 40 mg/l de benzocaína en tilapias de Nilo. Sin embargo, Huanca (2017) observaron una reducción de los niveles de glucosa en truchas arcoíris usan-

Cuadro 1. Resultados de cortisol, glucosa y parámetros hematológicos en alevinos de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratados con dosis sedantes de benzocaína, MS-222 y valeriana sometidos a un modelo de transporte simulado por 3 h

Parámetros	Control	Valeriana	Benzocaína	MS-222
Cortisol (ng/ml)	116.90 ± 34.22 ^{a,b}	95.30 ± 32.00 ^a	93.22 ± 14.27 ^a	151.30 ± 31.79 ^b
Glucosa (mg/dl)	84.45 ± 12.42 ^a	316.10 ± 117.40 ^c	155.30 ± 24.92 ^b	85.50 ± 15.55 ^a
Hematocrito (%)	34.75 ± 5.99 ^a	33.61 ± 5.57 ^a	24.38 ± 5.13 ^b	22.54 ± 5.38 ^b
Proteínas totales (g/dl)	4.60 ± 0.39 ^a	3.41 ± 0.34 ^b	3.68 ± 0.41 ^b	2.63 ± 0.29 ^c

Control: Sin tratamiento; Valeriana: 200 mg/l; Benzocaína: 35 mg/l; MS222: 75 mg/l

^{a,b,c} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

do benzocaína previa manipulación. En base a esta información se podría indicar que existe una respuesta fisiológica diferente de la glucosa entre especies. Por otro lado, el uso de MS-222 no alteró los valores de glucosa, aunque Mohammadi y Khara (2014), al utilizar 150 mg/l de este anestésico en truchas arcoíris juveniles observaron un incremento de los valores de glucosa. Esto mismo fue observado en peces de agua dulce (Sladky *et al.*, 2001; Holloway *et al.*, 2004). Además, al igual que en el cortisol, el tiempo de confinamiento puede afectar los valores de glucosa, Pramod *et al.* (2010) encontraron que tanto la benzocaína como el MS-222 incrementaban significativamente los valores de glucosa durante las primeras 18 h, para luego reducirlos gradualmente hasta niveles basales en 48 h, posiblemente debido al estrés inicial durante la captura en tanto que la reducción estaría relacionada con un efecto de adaptación de los peces a las condiciones de transporte.

Los alevinos tratados con benzocaína y MS-222 presentaron valores de hematocrito significativamente más bajos en comparación al grupo tratado con valeriana y el control (Cuadro 1). No obstante, los valores de

hematocrito se mantuvieron dentro de los rangos normales para la especie (Bittencourt *et al.*, 2003; Lemos *et al.*, 2018). Se espera que los niveles de hematocrito se incrementen como respuesta al estrés agudo (Gomes *et al.*, 2006). Por otro lado, Navarro *et al.* (2016) reportaron valores de hematocrito de $18 \pm 1.3\%$ en tilapias tratadas con 40 mg/l de benzocaína en transporte simulado por 3.5 h, en tanto que Mohammadi y Khara (2014) encontraron valores de hematocrito de 35% al aplicar 150 mg/l de MS-222 en truchas arcoíris. Los niveles de proteínas totales en todos los grupos se presentaron en un rango entre 2.63 a 4.60 g/dl, rangos similares a los reportados por Bittencourt *et al.* (2003) y Cnaani *et al.* (2004) en tilapias.

De una forma global se puede indicar que los valores de cortisol y glucosa indican que ningún grupo logró reducir el estrés. Esto podría deberse a que el tiempo total del experimento no fue suficiente para inducir el estrés en los alevinos. Si bien este modelo de estrés fue tomado de Saldanha *et al.* (2018), en ese estudio se utilizaron 5 h como tiempo de transporte. En el caso de la aplicación del extracto de valeriana, los valores altos de glu-

cosa indican un incremento de la necesidad de energía superior a los otros grupos, posiblemente a que el extracto no consiguió mantener los efectos sedantes durante las 3 h, aunque también podría atribuirse a otros factores estresantes como el color amarillo y olor penetrante de la valeriana.

Si bien el valor del cortisol en el grupo tratado con MS-222 fue alto, no fue significativamente diferente del grupo control (Cuadro 1). Según Coyle *et al.* (2004) peces anestesiados con MS-222 experimentan un incremento de los niveles de cortisol, situación similar a lo observado en el presente estudio, con la diferencia que se utilizó este producto para la sedación. Asimismo, en este mismo grupo los niveles de hematocrito bajos se podrían explicar por la reducción de la capacidad de unión del oxígeno asociada a una baja del pH en el medio (Félix *et al.*, 2021); sin embargo; este valor no fue analizado en este experimento.

En los peces no existe necesariamente una relación entre los valores de glucosa y de cortisol. Barton (2000) evaluó la glucosa y el cortisol en varias especies de salmónidos juveniles sometidos a estrés por transporte de 2 h, encontrando que la trucha de lago tuvo el pico más alto de cortisol (124 ng/ml) en comparación con la trucha arcoíris (57 ng/ml), mientras que los niveles de glucosa fueron más altos en la trucha arcoíris (223 mg/dl) y aún más baja en la trucha del lago (143 mg/dl). Sampaio y Freire (2016) indicaron que el metabolismo de la glucosa en peces no está totalmente clarificado y que las variaciones reportadas podrían estar relacionadas a las especies y a las dietas usadas.

Los valores de proteínas totales fueron altos en el grupo control comparado con los tratamientos. Este resultado podría relacionarse con la movilización de proteínas como sustrato para la glucogenólisis hepática, ya que la albúmina puede ser usada como fuente adicional de energía en episodios de estrés (de Oliveira *et al.*, 2019). Finalmente, no hubo

casos de mortalidad en los grupos experimentales, resultado similar al estudio de Navarro *et al.* (2016) con tilapias del Nilo (*O. niloticus*) utilizando benzocaína (20 y 40 mg/l). No obstante, en el estudio de Pramod *et al.* (2010) con peces *Puntius filamentosus* de 12 g sometidos a un transporte simulado de 48 h utilizando benzocaína a dosis de 30 y 40 mg/l se obtuvo 22 y 52% de mortalidad, respectivamente, a las 6 h de transporte.

CONCLUSIONES

Aunque fue posible establecer un estado de sedación de los alevinos de tilapia con dosis específicas de benzocaína, MS-222 y el extracto de valeriana, las dosis no fueron suficientes para reducir el estrés durante el transporte simulado por 3 h.

Agradecimiento

Se agradece al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por financiar este proyecto a través del Programa de Proyectos de Investigación para Grupos de Investigación (PCONFIGI) con código A1908062.

LITERATURA CITADA

1. **Abasali H, Mohamad S. 2010.** Effects of using the *Valeriana officinalis* extract during transportation of swordtail, *Xiphophorus helleri*. *J Anim Vet Adv* 9: 2377-2381. doi: 10.3923/rjnasci.-2010.45.49
2. **[AVMA] American Veterinary Medical Association. 2020.** Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 Edition. 121 p [Internet]. Available in: <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>

3. **Barton BA. 2000.** Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *N Am J Aquacult* 62: 12-18. doi: 10.1577/1548-8454(2000)062<0012:SFDITC>2.0.CO;2
4. **Bittencourt NL, Molinari LM, Scoaris DO, Pedroso RB, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Filho BA, et al. 2003.** Hematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system *Acta Sci Biol Sci* 25: 385-389.
5. **Camacho M, Honorio C. 2017.** Evaluación del efecto antiinflamatorio en ratas albinas según el modelo edema plantar y efecto analgésico en ratones albinos según el modelo tail flick del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby «Yerbechil». Tesis de Químico Farmacéutico. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 160 p.
6. **Carter KM, Woodley CM, Brown RS. 2011.** A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Rev Fish Biol Fish* 21: 51-59. doi:10.1007/s11160-010-9188-0
7. **Ciftci S, Cidik B, Erdem C, Ozcan A. 2008.** Effects of lead concentrations on sera parameters and hematocrit levels in *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). *J Fish Sci Com* 2: 616-622. doi: 10.3153/jfsc.com.2008025
8. **Cnaani A, Tinman S, Avidar Y, Ron M, Hulata G. 2004.** Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquac Res* 35: 1434-1440. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01167.x
9. **Coyle SD, Durborow RM, Tidwell JH. 2004.** Anesthetics in aquaculture. SRAC Publication 3900, USA: Southern Regional Aquaculture Center.
10. **de Oliveira CPB, Lemos CH da P, Vidal LVO, Couto RD, Pereira DSP, Copatti CE. 2019.** Anaesthesia with eugenol in hybrid Amazon catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus*) handling: biochemical and haematological responses. *Aquaculture* 501: 255-259. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.046
11. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2014.** Manual práctico para el cultivo de la trucha arcoíris. FAO. [Internet]. Disponible en: <https://www.fao.org/publications/card/en/c/3fdffc29-9d08-45b8-947d-8cf36c4-f22a0/>
12. **Félix L, Correia R, Sequeira R, Ribeiro C, Monteiro S, Antunes L, Silva J, et al. 2021.** MS-222 and propofol sedation during and after the simulated transport of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biology (Basel)* 10: 1039. doi:10.3390/biology10121309
13. **Fernández S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. 2004.** Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Be* 77: 399-404. doi: 10.1016/j.pbb.2003.12.003
14. **Gomes LC, Chagas EC, Brinn RP, Roubach R, Copatti CE, Baldisserotto B. 2006.** Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture* 256: 521-528. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.004
15. **Hajibeglou A, Sudagar M. 2018.** The effects of *Valeriana officinalis* root extract on survival rates and biochemical factors of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during transportation. *J Appl Ichthyol* 6: 91-102.
16. **Holloway A, Keene JL, Noakes DG, Moccia RD. 2004.** Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquac Res* 35: 1025-1030. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01108.x
17. **Hoskonen P, Pirhonen J. 2006.** Effects of repeated handling, with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 37: 409-415. doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.-01448.x

18. **Huanca E. 2017.** Niveles de cortisol y glucosa como indicadores de estrés en truchas «arco iris» (*Oncorhynchus mykiss*), utilizando anestésicos en la laguna de Arapa. Rev Inv Escuela Posgrado UNA 6: 234-243. doi: 10.26788/riepg.v6i3.108
19. **Jerez I, Ruiz I, Mancera JM. 2019.** Bienestar animal en la acuicultura de peces: atenuación del estrés a través de la dieta y mediante el empleo de anestésicos durante el transporte. Derecho Animal 10: 85-92. doi: 10.5565/rev/da.463
20. **Kubitza F. 2009.** Manual de manejo en la producción de peces: Buenas prácticas en el transporte de peces vivos. Panorama da Aquicultura. [Internet]. Disponible en: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/bpa/_archivos/091230_Buenas%20Pr%C3%A1cticas%20de%20transporte%20de%20peces.pdf
21. **Küçük S. 2010.** Efficacy of tricaine on *Poecilia latipinna* at different temperatures and concentrations. Afr J Biotechnol 9: 755-759. doi: 10.5897/AJB09.1353
22. **Lemos CH, Ribeiro CV, De Oliveira CP, Couto RD, Copatti CE. 2018.** Effects of interaction between pH and stocking density on the growth, hematological and biochemical responses of Nile tilapia juveniles. Aquaculture 495: 62-67. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2018.05.037
23. **Medina O, Sánchez N, Fraguas D, Arango C. 2008.** Valeriana en el tratamiento a largo plazo del insomnio. Rev Colomb Psiquiatr 37: 614-626.
24. **Mohammadi M, Khara H. 2014.** Effect of different anesthetic agents (clove oil, tricaine methanesulfonate, ketamine, tobacco) on hematological parameters and stress indicators of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792. Comp Clin Path 24: 1039-1044. doi: 10.1007/s00580-014-2027-2
25. **Murphy K, Kubin ZJ, Shepherd JN, Ettinger RH. 2010.** Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. Phytomedicine 17: 674-678. doi: 10.1016/j.phymed.-2009.10.020
26. **Navarro RD, Paiva R, Paludo GR, Saldanha YW, Fortes R, Pereira FK. 2016.** Physiological and hematological responses of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) to different anesthetics during simulated transport conditions. Acta Scientiarum Technology 38: 301-306.
27. **Nesse RM, Bhatnagar S, Young EA. 2007.** Evolutionary origins and functions of the stress response. In: Encyclopedia of Stress. Elsevier. p 965-970.
28. **Oliveira JR, Carmo JL, Oliveira KK. 2009.** Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-Nilo. Rev Bras Zootecn 38: 1163-1169. doi: 10.1590/S1516-35982009000700001
29. **Pirhonen J, Schreck CB. 2003.** Effects of anesthesia with MS222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 220: 507-514. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00624-5
30. **Popovic NT, Perovic IS, Rakovac RC, Barisic J, Jadan M, Berakovic AP. 2012.** Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anesthesia. J Appl Ichthyol 28: 553-564. doi: 10.1111/j.1439-0426.2012.01950.x
31. **Pramod PK, Ramachandran A, Sajeevan TP, Thamby S, Pai SS. 2010.** Comparative efficacy of MS-222 and benzocaine as anesthetics under simulated transport conditions of a tropical ornamental fish *Puntius filamentosus* (Valenciennes). Aquac Res 41: 309-314. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02333.x
32. **Rucinque DS, Polo G, Borbón J, González JF. 2016.** Anesthetic use of eugenol and benzocaine in juveniles of red tilapia (*Oreochromis sp.*). Rev Colomb Cienc Pecu 30: 60-66. doi: 10.17533/udea.rccp.v30n1a07

33. **Saldanha YW, Silva FK, Navarro RD. 2018.** Clove oil, benzocaine and sodium chloride concentrations during the transport simulation of Nile tilapia. *Revista Verde* 13: 106-111. doi: 10.18378/rvads.v13i1.5350
34. **Sampaio FD, Freire CA. 2016.** An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish Fish* 17: 18. doi: 10.1111/faf.12158
35. **[SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2020.** Informe de sanidad acuícola 2017-2019. Perú: Sanipes. 162 p.
36. **[SERNAPESCA] Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2018.** Norma técnica N.º 1. Procedimientos para el muestreo de animales acuáticos. [Internet]. Disponible en: <http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/labdnt1.pdf>
37. **Sladky KK, Swanson CR, Stoskopf MK, Loomis MR, Lewbart GA. 2001.** Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am J Vet Res* 62: 337-342. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.337
38. **Villar del Fresno AM, Carretero ME. 2001.** *Valeriana officinalis*. Fitoquímica, farmacología y terapéutica. *Farmacología Profesional* 15: 98-107.
39. **Weber RA. 2009.** Efecto del estrés y de la anestesia sobre indicadores primarios y secundarios de estrés y sobre los neurotransmisores monoaminérgicos cerebrales en el lenguado *Solea senegalensis* (kaup 1858). Tesis Doctoral. Santiago de Compostela, España: Univ. de Santiago de Compostela. 257 p.
40. **Witeska M, Kondera E, Ługowska K, Bojarski B. 2022.** Hematological methods in fish – Not only for beginners. *Aquaculture*. 547: 737498. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737498
41. **Woody C, Nelson J, Ramstad K. 2002.** Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J Fish Biol* 60: 340-347. doi: 10.1006/jfbi.2001.1842