

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**USO DEL ACEITE DE CLAVO COMO ANESTÉSICO NATURAL
PARA EL MANEJO RUTINARIO DE ORGANISMOS MARINOS
EN LABORATORIO**



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE OCEANOLOGO

PRESENTA:

KARLA ANGELINA AGÜERO GRANDE

Ensenada, Baja California, México. Junio de 2008.

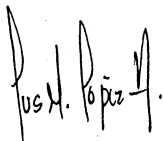
**USO DEL ACEITE DE CLAVO COMO ANESTÉSICO NATURAL
PARA EL MANEJO RUTINARIO DE ORGANISMOS MARINOS EN
LABORATORIO**

TESIS

QUE PRESENTA:


Karla Angelina Agüero Grande

PROBADA POR:



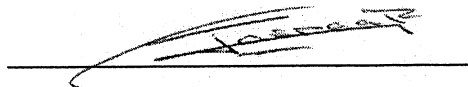
Presidente del Jurado

Dra. Lus Mercedes López Acuña



MC. Conal David True

Sinodal Propietario



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes

Sinodal Propietario

DEDICATORIA

Dedico este trabajo así como mis logros futuros a:

A mis padres:

José Agüero Chávez y Catalina Grande Castañeda

A mis hermanos:

Carlos Humberto, Minerva Karina, Salvador Romero
y José Alberto.

A mis amados sobrinos:

Salvador Romero:

Gracias por llenar la casa de alegría con tu sonrisa, hiperactividad y
travesuras.

Dana Fernanda:

Niña preciosa, gracias por estar en nuestras vidas, eres para mi
significado de fortaleza, pensar en ti me da fuerza para terminar mis
proyectos.

A mi novio:

Manuel Abisai Rodríguez Gómez

Los amo...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California, y a la Facultad de Ciencias Marinas por acogerme durante mi preparación académica y formarme como profesionista.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada del proyecto 206-SAGARPA-CONACYT. A la 12va. Convocatoria Interna, UABC.

A mis padres Caty y José por todo el apoyo y cariño que siempre he recibido de ustedes. Sin ustedes esto no hubiera sido posible. Muchas gracias, los amo.

A mis hermanos Carlos y José por su apoyo a pesar de la distancia, se que siempre contare con ustedes. Los quiero mucho.

A mi hermana y cuñado (Mini y Salvador) y a mis amados sobrinos (Chavarín y Dana), por su unión familiar en las buenas y malas, porque para mi son un ejemplo lucha y me han demostrado que ante la vida no hay imposibles. Los quiero mucho.

A mi novio, por su apoyo incondicional, paciencia, por estar conmigo en las buenas y en las malas y sobretodo por ser mi amigo. Te amo.

A mi directora de tesis, Dra. Lus Mercedes López Acuña, por su amistad incondicional, apoyo, paciencia, confianza y consejos a lo largo de la carrera. Por haberme alentado a realizar este trabajo y por enseñarme a confiar en mi. Muchísimas gracias, la quiero mucho.

Al M.C. Comal David True, por dejarme participar en el proyecto de Totoaba, así también por su confianza y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al Doc. Gabriel Correa Correa Reyes, por su apoyo y paciencia para la realización de este trabajo.

A todos los compañeros de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura; Lus, Conal, Gerardo, Ivan, Yesica, Emmanuel, Mario e Idaly por esos momentos de trabajo y de convivencia amena en el laboratorio.

A Manuel Abizai, Yesica, Nico (Nicolas), e Idaly; por haberme apoyado en algún momento en la realización de los experimentos para este trabajo.

A Berenice, Rosita, Candy, Pamela de Grau, por aquellos momentos buenos y malos que vivimos juntas a lo largo de la carrera, gracias por haberme tendido su mano amiga, las quiero mucho.

A mis amigas; Bere, Rosita, Candy, Pamela de Grau, Esme, Abigail, Pamela Castro, Laura y Dany. Porque se que siempre contare con ustedes, gracias por su apoyo. Ya saben que las quiero y mucho.

A mis amigas de toda la vida Karina Ibarra y Sayuri Kiyota por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas. Lo logre amiguitas.

A mis compañeros de generación (ESCARAMUJOS); Fernando, Dany, Alonso, Chuy, Cristian, Zarco, Yuri, Abigail, Lau, Pamfla, Candy, Pamela de Grau, Rosita, Bere, Esme y Vikie. Por todas esas anécdotas que pasamos juntos en el transcurso de la carrera. Siempre los llevare en mi corazón.

A todos aquellos que de alguna manera participaron en mi realización y me apoyaron para cumplir mis metas. Mil gracias a todos ellos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

RESUMEN

USO DEL ACEITE DE CLAVO COMO ANESTÉSICO NATURAL PARA EL
MANEJO RUTINARIO DE ORGANISMOS MARINOS EN LABORATORIO

Karla Angelina Agüero Grande

En el presente estudio se determinó la eficiencia del aceite de clavo como anestésico natural comparado con el químico MS-222 en corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) y pez payaso (*Amphiprion ocellaris*). Para ambos organismos se midieron los tiempos de inducción y recuperación aplicando distintas dosis por especie. En corvina blanca a temperatura de cultivo de $15.99 \pm 0.02^\circ\text{C}$ se encontró una concentración óptima de MS-222 con 135 mg l⁻¹, mostrando tiempos de inducción a la anestesia <3.1 min y recuperación <4.5 min, para esta misma especie con el aceite de clavo se requirió una dosis de 205 mg l⁻¹ con periodos para la anestesia < 3.1 min y de recuperación <7.6 min, siendo el químico MS-222 más eficiente por manifestar tiempos menores de anestesia y recuperación. En pez payaso a una temperatura de $23.74 \pm 0.60^\circ\text{C}$ la dosis óptima con ambos anestésicos fue de 300 mg l⁻¹, en MS-222 se obtuvieron periodos de inducción y recuperación <2.40 y <1.20 min, respectivamente, el aceite de clavo fue más eficiente por mostrar tiempos menores de respuesta y recuperación (<0.85 y <1.20 respectivamente).

CONTENIDO

	Pagina
I.- INTRODUCCION	1
I.1.- Anestesia en la acuicultura	1
II.2.- Corvina Blanca	5
III.3.- Pez payaso	6
II.- OBJETIVOS	8
II.1.- Objetivo general	8
II.2.- Objetivos particulares	8
III.- MATERIALES Y METODOS	9
III.1.- Anestésicos	9
III.2.- Organismos	10
III.2.1.- Corvina	10
III.2.2.- Pez Payaso	10
III.3.- Unidades experimentales	11
III.4.- Corvina blanca	12
III.4.1.- Previo al experimento	13
III.4.2.- Inducción a la anestesia y recuperación	13
III.5.- Pez payaso	14
III.5.1.- Previo al experimento:	14
III.5.2.- Inducción a la anestesia y recuperación	15
III.4.- Análisis Estadístico	16
IV.- RESULTADOS	17
IV.1.- Corvina Blanca	17
IV.1.1.- Respuesta y recuperación a la anestesia con MS-222	17
IV.1.2.- Respuesta y recuperación a la anestesia con aceite de clavo.	17
IV.1.2.- Comparativo de respuesta y recuperación a los dos anestésicos en corvina blanca.	18
IV.2.- Pez payaso	21
IV.2.1.- Respuesta a la anestesia con MS-222.	21
IV.2.2.-Respuesta a la anestesia con aceite de clavo	21
IV.2.3.-Comparativo de respuesta a los dos anestésicos	22
V.- DISCUSIONES	24
V.1.- Corvina Blanca	24
V.1.1.- Respuesta y recuperación a la anestesia con MS-222	24
V.1.2.- Respuesta y recuperación a la anestesia con aceite de clavo.	25
V.1.3.-Comparativo de respuesta y recuperación a los dos anestésicos en corvina blanca.	27
V.2.- Pez payaso	27
V.2.1.- Respuesta a la anestesia con MS-222.	27
V.2.2.- Respuesta a la anestesia con aceite de clavo	28
V.2.3.- Comparativo de respuesta a los dos anestésicos	29
VI.- CONCLUSIONES	30
VII.-RECOMENDACIONES	31
VIII.- LITERATURA CITADA	32

LISTA DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1.-	Imagen del sistema de experimentación utilizado en los ensayos con corvina blanca	11
Figura 2.	Imagen del sistema de experimentación utilizado en los ensayos con pez payaso.	12
Figura 3.-	Tiempo de respuesta a los anestésicos en corvina blanca a una temperatura de $15.99 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$.	20
Figura 4.-	Tiempo de respuesta a los anestésicos en corvina blanca a una temperatura de $15.99 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$.	20
Figura 5.-	Tiempo de respuesta a los anestésicos en pez payaso a una temperatura de $23.74 \pm 0.60^{\circ}\text{C}$.	23
Figura 6.-	Tiempo de recuperación a los anestésicos en pez payaso a una temperatura de $23.74 \pm 0.60^{\circ}\text{C}$.	23

LISTA DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1.- Estudios realizados para conocer la eficiencia del aceite de clavo como anestésico en organismos de acuicultura.	4
TABLA 2.- Fases de anestesia en corvina blanca	13
TABLA 3.- Fases de recuperación en corvina blanca	14
TABLA 4.- Fases de anestesia en pez payaso	15
TABLA 5.- Fases de recuperación en pez payaso	15
TABLA 6.- Tiempo de inducción a la anestesia y recuperación para corvina blanca con MS-222 a $15.99 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$.	17
TABLA 7.- Tiempo de inducción a la anestesia y recuperación para corvina blanca con aceite de clavo a $15.99 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$.	18
TABLA 8.- Tiempo de inducción a la anestesia y recuperación para pez payaso con MS-222 a $23.74 \pm 0.60^{\circ}\text{C}$.	21
TABLA 9.- Tiempo de inducción a la anestesia y recuperación para pez payaso con aceite de clavo a $23.74 \pm 0.60^{\circ}\text{C}$.	22

I.- INTRODUCCIÓN

Anestesia en acuicultura

El cultivo intensivo de peces conlleva su manipulación directa. Desde el punto de vista experimental y productivo, se deben realizar periódicamente tareas que producen estrés agudo en los individuos, fundamentalmente relacionadas con la observación directa de parámetros tales como peso, talla, estado sanitario, etc. Estas prácticas pueden afectar en mayor o menor medida a su fisiología, traduciéndose en una reducción del crecimiento o en una inmunodepresión. Para minimizar todos estos efectos indeseables se han desarrollado técnicas de anestesia en peces sin que su salud ni su valor comercial se vean afectados (De la Gandara *et al.*, 2003).

La anestesia se define como un estado causado por un agente externo, provocando pérdida de la sensibilidad a través de la depresión del sistema nervioso. Puede ser local o general, en función de su aplicación (Ackerman *et al.*, 2008). Por lo que la inducción a la anestesia se produce para lograr un bloqueo al nervio sensorial y la reducción de los reflejos activos (Martindale, 1997).

Los criterios para evaluar la eficiencia de un anestésico son: que los tiempos de inducción sean menores a 3 min (Marking y Meyer's 1985), que posea una rápida y segura recuperación (Martindale, 1997) con tiempos no mayores a 5 min. Que no sea toxico, seguro para el organismo, de fácil eliminación, que no

persistan los efectos de anestesia en el organismos tanto fisiológicos como en su comportamiento, de fácil disolución y económico (Marking y Meyer's, 1985).

En acuicultura es habitual el empleo de técnicas de anestesia para la manipulación de peces en operaciones rutinarias como: captura, transporte, clasificación, marcado, muestreos, obtención de muestras biológicas (sangre, gametos), cirugía e inducción hormonal (García *et al.*, 2002). En la acuicultura y en algunos trabajos de ecología frecuentemente se emplean anestésicos para evitar el estrés y las lesiones que estas prácticas ocasionan en las poblaciones de peces. Estos son obtenidos a partir de sustancias químicas, tales como el Sulfato Metano Tricaina (MS222), Benzocaina, Quinaldina, 2-Phenoxitanol y Metomidato (Etomidato) (Silveira y Martínez, 2004).

El empleo de la mayoría de anestésicos artificiales no es del todo benéfico ya que generalmente son sustancias agravantes, las cuales alteran de manera drástica el sistema neuromuscular y al ser empleados en el organismo éste tarda aproximadamente 21 días en eliminarlos (Bernstein *et al.*, 1997; Woody *et al.*, 2002). Además si los organismos son destinados para el consumo humano, el empleo de los anestésicos químicos no es permitido por las autoridades sanitarias. Debido a estas desventajas es necesario el empleo de anestésicos obtenidos a partir de sustancias naturales, como alternativa al uso de los compuestos químicos (Woody *et al.*, 2002).

El aceite de clavo es un producto natural obtenido por destilación de tallos, flores y hojas trituradas de la planta del clavo, *Syzygium aromaticum* L. (Merr y Perry), cuyo principal ingrediente activo es el eugenol (70-90 % del total) (García *et al.*, 2002). Se ha utilizado por siglos como anestésico tópico para los seres humanos, particularmente para los problemas dentales tales como dientes infectados (Woody *et al.*, 2002). Actualmente se ha estudiado su efectividad como anestésico en peces, tanto de agua dulce como marinos, encontrando respuestas diversas en ensayos para transportación y manipulación (Tabla 1). (Matttson y Ripley, 1989; Soto y Burhanoddin, 1995; Munday y Wilson, 1997; Cooke *et al.*, 2004; Ackeman y Bellwood, 2002; Peri y Pirhonen, 2004; Velisek *et al.*, 2005, Hoskonen, 2004; Hajek, *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado su eficiencia en corvina blanca del pacífico, y en pez payaso tropical de ornato.

Desde hace algunos años se han realizando estudios sobre los efectos de los anestésicos en peces tanto para transportación como para manipulación, utilizando sustancias naturales como una alternativa al uso de los compuestos químicos. Los cuales son descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Estudios realizados para conocer la eficiencia del aceite de clavo como anestésico en organismos destinados a la acuicultura.

Autor	Año	Estudio	Especies	T°C	Pesos	[A. Clavo]	Tiempo
Silveira y Martínez	2004	Transportación	Tilapia (<i>O. aureus</i>)	23.5-25.5°C	20.5 g	5 mg l ⁻¹	72 hrs
Kioshi <i>et al.</i>	2005	Transportación	Matrinxa (<i>Brycon cephalus</i>)	25.7 ± 0.9°C	80.1±18.4	5 mg l ⁻¹	4 hrs
Durville y Mollet	2001	Manipulación	<i>Valamugil cunnesius</i> y <i>Monodactylus argenteus</i>	No se reporta	< 10 gr	50 mg l ⁻¹	1 min
García <i>et al.</i>	2002	Manipulación	<i>Seriola (Seriola dumerili</i> Risso), Lobina (<i>Dicentrarchus labrax</i> Linnaeus), Dorada (<i>Sparus aurata</i> Linnaeus), Dentón (<i>Dentex dentex</i> Linnaeus) y Sargo picudo (<i>Diplodus puntazzo</i> Cetti)	15, 17, 15, 16, y 16 °C, respectivamente	200-1,000 g	40 mg l ⁻¹	3-6min y recuperación de 2 a 5 min.
Mylonas <i>et al.</i>	2005	Manipulación	Lobina Europea (<i>Dicentrarchus labrax</i>) y dorada (<i>Sparus aurata</i>)	15°C 25 °C	32.5±1.2 g. 41.9± 2.2g 44.9± 0.3g. 46.3±2.7 g	40 mg l ⁻¹ 30 mg l ⁻¹ 55 mg l ⁻¹	< 3 min y recuperación 10 min
King <i>et al.</i>	2005	Manipulación [MS-222]	Lobina (<i>Centropristis striata</i> L.)	18-21°C	760± 81.7g	70 mg l ⁻¹	3-6 min y recuperación < 6 min
<u>Dong-Won</u> <i>et al</i>	2007	Manipulación	Pulpo común (<i>Octopus minor</i> , Sasaki)	15, 20 y 25°C	< 1 g	200 mg l ⁻¹	< 4.7 min y recuperación < 22.8

En el presente trabajo se estudió la eficiencia del aceite de clavo como anestésico utilizando como organismos de prueba: corvina blanca, la cual habita aguas subtropicales (Ayres, 1860), con temperaturas menores a los 22 °C (Cruz, 1984) y con el pez payaso, el cual es una especie de aguas tropicales (Wilkerson, 2001), con un intervalo de temperatura de 24-27°C (Patxi, 2007). Ambas especies se caracterizan por ser de gran interés comercial (Vojkovich y Reed, 1983; Wilkerson, 2001).

Corvina blanca

Corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) es un pez marino con distribución desde Alaska, EUA; hasta Bahía Magdalena, en Baja California, México. Corvina blanca es una especie de gran importancia comercial y deportiva en el sur de California, EUA y de Baja California, México (Vojkovich y Reed, 1983). Esta especie pertenece al Orden Pisiforme, del Suborden Percodei, miembro de la Familia Scianidae del género *Atractoscion* y de la especie *nobilis* (Escobar y Sin, 1997).

Corvina blanca es una especie de gran interés comercial, por la alta calidad de su carne y por su tamaño en la pesca deportiva. Debido a esto ha sido fuertemente sobreexplotada (Vojkovich y Reed, 1983). Actualmente el centro de investigaciones Hubbs de Sea World en San Diego, California, cuenta con un programa de biotecnología de cultivo y repoblamiento.

Pez Payaso (*Amphiprion ocellaris*)

A. ocellaris conocido también como pez payaso es un organismo de ornato el cual se distribuye geográficamente en el Pacífico Occidental en las costas de Australia, Filipinas, en el este de la India, Melanesia y Ryukyus (Hoff, 1996). Esta especie pertenece a la Clase Osteichthyes, de Orden Perciformes, perteneciente a la Familia Pomacentridae, del Género *Amphiprion* y de la Especie *ocellaris* (Wilkerson, 2001).

A. ocellaris es una especie de gran importancia comercial la cual es fácil de mantener ya que puede ser cultivada en tanques pequeños de hasta 38 l. Además, esta especie es una de las más tolerantes ya que puede convivir con otros organismos en un mismo estanque (Wilkerson, 2001).

Actualmente en el laboratorio de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, se mantiene un programa de crianza de *A. ocellaris* para investigación y comercialización.

En los últimos años se han realizado estudios demostrando la efectividad del aceite de clavo como anestésico en peces, sin embargo no ha sido probado en *A. nobilis* y *A. ocellaris*. Por tal motivo el propósito del presente trabajo fue determinar la eficacia del

aceite de clavo comparado con el químico MS-222 mediante la determinación de dosis adecuadas de los anestésicos en corvina blanca y pez payaso.

II.- OBJETIVOS

II.1.- Objetivo general

Conocer la eficiencia del aceite de clavo como anestésico natural en la manipulación de *Atractoscion nobilis* y *Amphiprion ocellaris* comparado con el anestésico químico MS-222.

II.2.- Objetivos particulares

- Determinar la dosis de anestesia optima del químico MS-222 para el manipuleo de *Atractoscion nobilis* y *Amphiprion ocellaris*.
- Determinar la dosis de anestesia optima del aceite de clavo para el manipuleo de *Atractoscion nobilis* y *Amphiprion ocellaris*.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California.

Se realizaron un total de 9 tratamientos por especie: *A. nobilis* y *A. ocellaris*, para determinar la eficiencia del aceite de clavo como anestésico comparado con Sulfato Metano Tricaina (MS222).

III.1- Anestésicos:

El químico MS-222 (Western Chemical Inc. 1269 Lattimore Rd. Ferndale, WA 98248), fue disuelto en 3 ml de agua en navecillas de plástico con capacidad de 10 ml y posteriormente vertido a los recipientes destinados para anestesia en un volumen de agua de 2 lt en para corvina blanca y en pez payaso en 100 ml.

El aceite de clavo (80% de eugenol) (García *et al.*, 2002) fue previamente diluido en etanol (1:10) en frascos de vidrio color ámbar con una capacidad de 1 ml, por su escasa solubilidad en agua se mezcló vigorosamente en el recipiente destinado para el ensayo de anestesiado. Para corvina blanca se disolvió en 2 l de agua y para el pez payaso en 100 ml.

III.2.- Organismos

III.2.1- Corvina

Se utilizaron un total de 94 corvinas provenientes del Instituto Hubbs de Sea World, ubicado en San Diego, California EUA, con un peso promedio de 34.45 ± 3.13 gr y una longitud aproximada de < 12.5 cm. Las corvinas fueron adquiridas en el mes de agosto del 2007 y transportadas en bolsas de plástico con inyección de oxígeno al agua, las cuales fueron colocadas en una hielera con hielo en gel para tratar de mantener una temperatura del agua de aprox. 17°C y así disminuir el estrés y el metabolismo de los organismos durante su transporte. Los organismos fueron mantenidos en un tanque de fibra de vidrio con una capacidad de 800 l, a una temperatura inicial de $15.99^{\circ} \pm 0.02^{\circ}\text{C}$ y al final $20.34^{\circ} \pm 0.91^{\circ}\text{C}$.

III.2.2.- Pez Payaso

Se muestrearon un total de 54 peces payaso cultivados en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, durante el mes de septiembre del 2007. Con pesos promedio de 0.50 ± 0.05 gr y longitudes menores a 1.5 cm. Los organismos fueron colocados en peceras de vidrio con una capacidad de 10 galones, mantenidos a una temperatura de $23.74^{\circ} \pm 0.60^{\circ}\text{C}$.

III.3.- Unidades experimentales:

Para la inducción a la anestesia y recuperación en corvina blanca se utilizaron 18 cubetas de plástico con una capacidad de 4 l, y dimensiones de 22.5 cm de alto y 19.5 cm de diámetro, a las cuales se les agregaron 2 l de agua de mar filtrada y pasada por UV, así como el suministro de aire necesario para garantizar una concentración mínima de oxígeno de 7 mg l^{-1} (Figura 1).



Figura 1. Imagen del sistema de experimentación utilizado en los ensayos con corvina blanca

En la inducción a la anestesia-recuperación para pez payaso se utilizaron 18 vasos precipitados de vidrio Pyrex, con capacidad de 400 ml y dimensiones de 10.5 cm de alto y 7.5 de diámetro, a los cuales se les agrego 100 ml de agua de mar filtrada y pasada por UV, así como el suministro de aire necesario para mantener una concentración de oxígeno de 7 mg l^{-1} . Se colocaron 10 vasos simultáneamente en baño maría para mantener una temperatura

constante de $23.74^{\circ} \pm 0.60^{\circ}\text{C}$, utilizando un recipiente rectangular de vidrio de 126 cm de largo y de ancho 14 cm, protegido en sus paredes exteriores con hule espuma, dentro del recipiente se colocó un calentador de titanium de 150 w marca Via Aqua y dos bombas para la circulación del agua a través del recipiente con una capacidad de 90 y 150 l hr^{-1} (Figura 2).

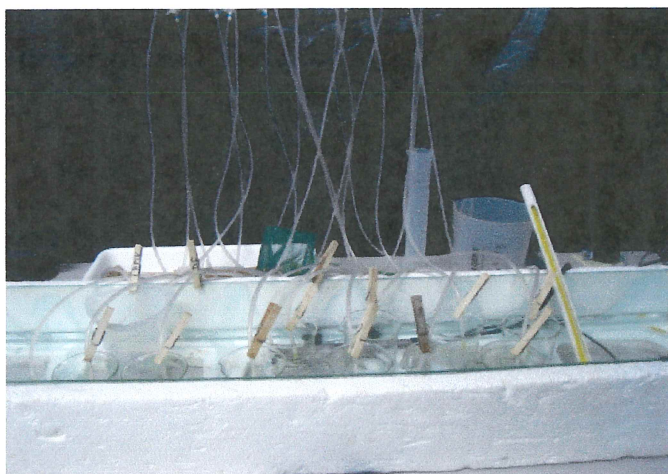


Figura 2. Imagen del sistema de experimentación utilizado en los ensayos con pez payaso.

III.4.- Corvina blanca

Se realizaron dos experimentos a una temperatura de $15.99^{\circ} \pm 0.02^{\circ}\text{C}$, empleando dosis de 95, 135 y 150 mg l^{-1} con MS222 y 95, 150, 205 y 260 mg l^{-1} con aceite de clavo, mediante el siguiente procedimiento.

III.4.1.- Previo al experimento

1. Se acondicionaron durante 1 hora a 9 organismos con pesos similares colocándolos en cubetas de 20 l provistas con 7 l de agua de mar.
2. Se prepararon 18 cubetas con agua de mar y suministro de oxígeno. A 9 de ellas se les adiciono el anestésico previamente pesado,(0.095, 0.0135 y 0.0150 gr para MS222 y 0.095, 0.0150, 0.0205 y 0.0260 para el aceite de clavo) y las 9 restantes fueron colocadas bajo las mismas condiciones, pero, sin anestésico para ser utilizadas en la recuperación de los organismos (Figura1).

III.4.2.- Inducción a la anestesia y recuperación

Una vez preparadas las anestias se procedió a sumergir a un organismo por cubeta y se registro el tiempo de respuesta al anestésico (ayudados con un cronometro) registrando las siguientes fases (Tabla 2).

Tabla 2. Fases de anestesia para corvina blanca

Fases	Descripción
I	Perdida de equilibrio
II	Perdida de movimiento corporal, pero con continuo movimiento opercular
III	Perdida de movimiento corporal, pero con cese de movimiento opercular
IV	Perdida de flotación

Una vez determinada la fase IV (Tabla 2) se saco al pez inmediatamente, se peso y se coloco en la cubeta de recuperaci3n para determinar las siguientes fases (Tabla 3).

Tabla 3. Fases de recuperaci3n en corvina blanca

Fases	Descripci3n
I	Inicio de movimiento opercular
II	Inicio de movimiento corporal
III	Recuperaci3n del equilibrio

Lo anterior se hizo para cada uno de los 2 experimentos.

III.5. Pez payaso

Se ejecutaron 2 experimentos a $23.74^{\circ} \pm 0.60^{\circ}\text{C}$, administrando concentraciones de 100, 200, 300 mg l⁻¹ de MS-222 y aceite de clavo.

III.5.1.- Previo al experimento:

1. Se preparo un ba1o mar1a para conservar la temperatura a la que se encontraban dichos organismos (23-24.5°C). Esto con un recipiente rectangular de vidrio, un calentador y dos bombas para la circulaci3n de agua en el ba1o y con ello mantener la temperatura constante a trav3s de el recipiente (Figura 2).
2. Se prepararon 9 vasos de vidrio de 400 ml por duplicado, con 100 ml de agua de mar y suministro de oxigeno. A 9 de los vasos se les agrego la concentraci3n de anestesia

previamente pesada (0.0100, 0.0200, 0.0500 gr, para cada experimento), los 9 restantes fueron utilizados para la recuperación.

III.5.2.- Inducción a la anestesia y recuperación

Una vez ya preparadas las anestésicas se procedió a sumergir a un organismo por vaso y se registro el tiempo de respuesta al anestésico (ayudados con un cronometro) con las siguientes fases (Tabla 4).

Tabla 4. Fases de anestesia en pez payaso

Fases	Descripción
I	Perdida de equilibrio
II	Perdida de movimiento

Nota: En pez payaso la respuesta a los anestésicos fue diferente a la de corvina blanca, por lo tanto solo se pudieron identificar dos fases de anestesia en los experimentos preliminares.

Una vez determinada la fase II (Tabla 4) se saco al pez inmediatamente, fue pesado, se coloco en el vaso de recuperación y se determinaron las siguientes fases (Tabla 5).

Tabla 5. Fases de recuperación en pez payaso

Fases	Descripción
I	Inicio de movimiento
II	Recuperación de equilibrio
III	Comportamiento al pre-anestesia

Lo anterior se realizo para cada uno de los 2 experimentos.

Análisis Estadístico

El muestreo experimental del estudio fue no aleatorio procurando seleccionar organismos con pesos similares. A los datos generados se les determinó su normalidad, esto para obtener un valor representativo para cada dosis. Así mismo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar si los valores obtenidos de peso, tiempo de anestesia y tiempo de recuperación en *A. nobilis* y *A. ocellaris* fueron significativamente distintos para cada una de las dosis, el nivel de significancia para todas las pruebas fue de 0.05. Estas pruebas se realizaron mediante el paquete estadístico SigmaStat versión 2.0 para Windows (Jandel Corporation 1992-1995).

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Corvina Blanca

IV .1.1. Respuesta y recuperación a la anestesia con MS-222

Los pesos de los organismos anestesiados no mostraron diferencias significativa ($P=0.655$) entre si, con pesos de 33.87 ± 2.05 a 35.24 ± 3.12 g.

La respuesta al anestésico con la dosis de 95 mg l^{-1} fue significativamente diferente ($P=0.001$) con un tiempo de 6.81 ± 1.52 min, mientras que para las concentraciones de 135 y 150 mg l^{-1} los tiempos fueron similares con 2.79 ± 0.30 y 2.40 ± 0.46 min, respectivamente. En la recuperación se encontró diferencias significativas ($P=<0.001$) entre las dosis, teniendo el menor tiempo en la concentración de 135 mg l^{-1} con 3.49 ± 0.68 min, mientras que para la concentración de 95 mg l^{-1} se presento el mayor periodo con 6.95 ± 1.47 min (Tabla 6).

Tabla 6. Tiempo de inducción a la anestesia y recuperación para corvina blanca con MS-222 a $15.99 \pm 0.02^\circ\text{C}$.

Concentración mg l^{-1}	95	135	150
Peso (g)	33.87 ± 2.05	35.24 ± 3.12	33.95 ± 3.91
Anestesia (min)	6.81 ± 1.52^a	2.79 ± 0.30^b	2.40 ± 0.46^b
Recuperación (min)	6.95 ± 1.47^a	3.49 ± 0.68^b	3.99 ± 0.94^b

IV.1.2. Respuesta y recuperación a la anestesia con aceite de clavo

Los pesos de los organismos seleccionados fueron similares ($P=0.095$) entre si, con 32.75 ± 3.38 a 37.12 ± 3.28 g. Para la fase de

anestesia se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) siendo la concentración de 95 mg l⁻¹ diferente al resto de las dosis analizadas con un tiempo de anestesiado de 4.60 ± 0.76 min, los tiempos de repuesta para las dosis de 150 y 205 mg l⁻¹ fueron similares entre si (3.76 ± 0.48 y 3.10 ± 0.56 min, respectivamente), así mismo los tiempos de anestesiado para las dosis de 205 y 260 mg l⁻¹ fueron similares entre si. En la etapa de recuperación los organismos que se anestesiaron con la dosis de 260 mg l⁻¹ fueron los que mostraron el tiempo mayor con 9.36 ± 1.65 min siendo esta significativamente diferente ($P < 0.001$) al resto de las concentraciones, para 95, 150 y 205 mg l⁻¹ estas fueron similares con 4.60 ± 0.76, 6.49 ± 0.82 y 6.42 ± 1.19 min, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Tiempo de inducción a la anestesia y recuperación para corvina blanca con aceite de clavo a 15.99 ± 0.02 °C.

Concentración mg l⁻¹	95	150	205	260
Peso (g)	33.71 ± 2.82	32.75 ± 3.38	34.64 ± 3.51	37.12 ± 3.28
Anestesia (min)	4.60 ± 0.76 ^a	3.76 ± 0.48 ^b	3.10 ± 0.56 ^{bc}	2.87 ± 0.70 ^c
Recuperación (min)	5.98 ± 1.47 ^d	6.49 ± 0.82 ^{bcd}	6.42 ± 1.19 ^c	9.36 ± 1.65 ^a

IV.1.3. Comparativo de respuesta y recuperación a los dos anestésicos en corvina blanca

En la Figura 3 se muestra el tiempo de inducción a la anestesia, en donde se puede observar que para la dosis de 95 mg l⁻¹ en aceite de clavo fue en la que se obtuvo el menor periodo de respuesta, sin

embargo para las dosis de 135 y 150 mg l⁻¹ con el anestésico MS-222 los tiempos fueron menores, siendo este el mas eficiente comparado con el resto de las concentraciones de aceite de clavo (150 205 y 260 mg l⁻¹). Para la fase de recuperación con el anestésico químico, en la concentración de 95 mg l⁻¹ se obtuvo un mayor tiempo de recuperación, comparativamente con la concentración de 135 mg l⁻¹ que fue el más corto y para 150 mg l⁻¹ fue ligeramente mas tardado. Sin embargo, para el caso de aceite de clavo se observo que conforme se aumento la dosis del anestésico el tiempo de respuesta se incrementaba (Figura 4).

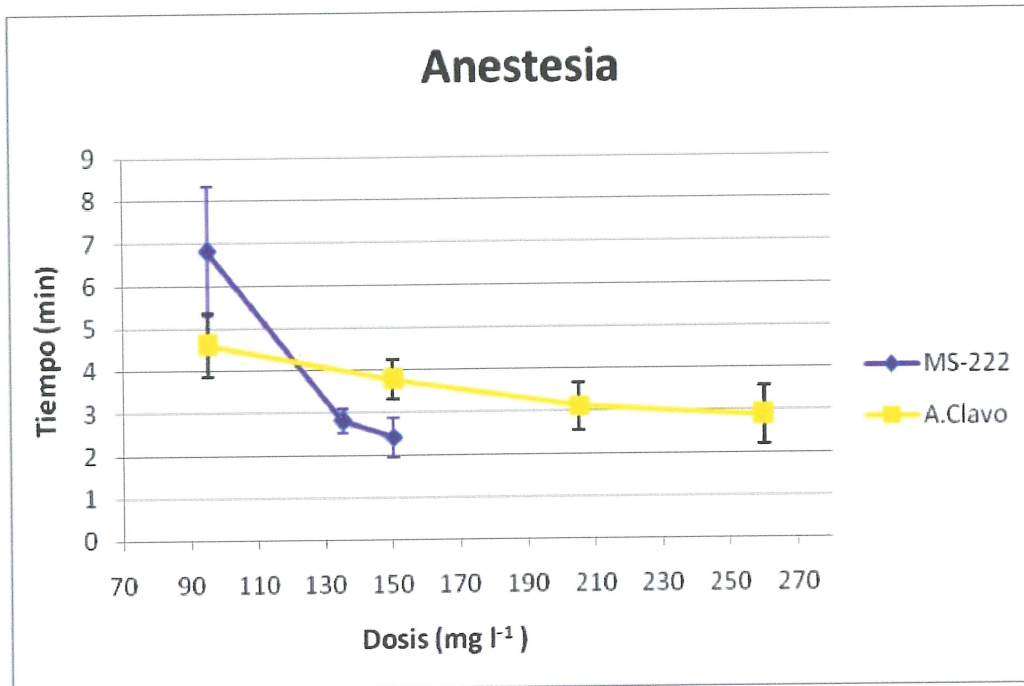


Figura 3. Tiempo de respuesta a los anestésicos en corvina blanca a una temperatura de $15.99^{\circ} \pm 0.02^{\circ}\text{C}$.

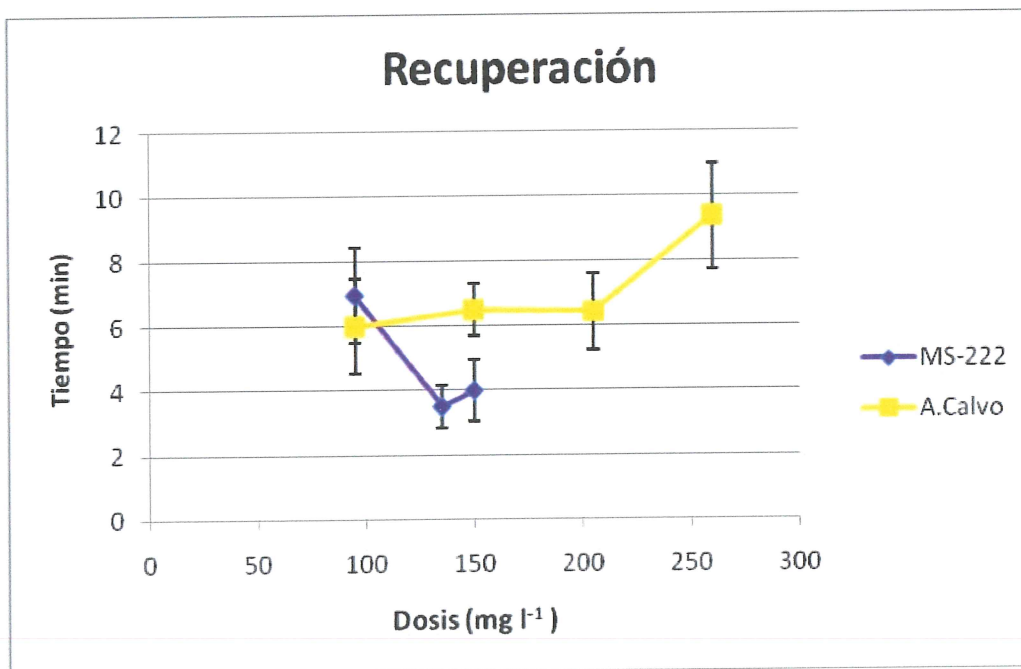


Figura 4. Tiempo de recuperación a los anestésicos en corvina blanca a una temperatura de $15.99^{\circ} \pm 0.02^{\circ}\text{C}$.

IV. 2. Pez payaso

IV.2.1. Respuesta a la anestesia con MS-222

El peso de los organismos muestreados fue similar para todas las concentraciones ($P=0.171$) con pesos de 0.39 ± 0.068 a 0.51 ± 0.12 g. El tiempo de respuesta al anestésico fue significativamente diferente ($P=<0.001$) en la concentración de 100 mg l^{-1} con 10.73 ± 3.26 min respecto a las dosis de 300 y 500 mg l^{-1} con 1.64 ± 0.74 y 0.43 ± 0.11 min (respectivamente) siendo estas ultimas similares entre si. Para la recuperación se mostró similar a la anestesia, ya que la dosis de 100 mg l^{-1} fue diferente ($P=1.783$) a 300 y 500 mg l^{-1} la primera con 1.49 ± 0.51 min y para las dos restantes 0.89 ± 0.25 y 1.03 ± 0.11 min, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Tiempo de inducción a la anestesia y recuperación para pez payaso con MS-222 a $23.74^\circ \pm 0.60^\circ\text{C}$.

Concentración mg/l^{-1}	100	300	500
Peso (g)	0.39 ± 0.068	0.51 ± 0.12	0.46 ± 0.16
Anestesia (min)	10.73 ± 3.26^a	1.64 ± 0.74^b	0.43 ± 0.11^b
Recuperación (min)	1.49 ± 0.51^a	0.89 ± 0.25^b	1.03 ± 0.11^b

IV.2.2. Respuesta a la anestesia con aceite de clavo

En la Tabla 9 se puede observar que el peso de los organismos fue similar entre las tres dosis ($P=0.263$) con pesos de 0.53 ± 0.05 a 0.58 ± 0.07 g. Para el tiempo de anestesia la dosis de 100 mg l^{-1} fue diferente ($P=<0.001$) con 5.87 ± 2.31 min a la de 300 y 500 mg l^{-1} 0.56 ± 0.29 y 0.48 ± 0.25 min, respectivamente. En la recuperación

las tres concentraciones fueron similares ($P=0.137$), en donde el tiempo menor se obtuvo en la dosis de 300 mg l^{-1} con 0.92 ± 0.24 min y el mayor a 100 mg l^{-1} con 1.09 ± 0.20 min.

Tabla 9. Tiempo de inducción a la anestesia y recuperación para pez payaso con aceite de clavo a $23.74^\circ \pm 0.60^\circ\text{C}$.

Concentración mg/l^{-1}	100	300	500
Peso (g)	0.53 ± 0.05	0.58 ± 0.07	0.55 ± 0.07
Anestesia (min)	5.87 ± 2.31^a	0.56 ± 0.29^b	0.48 ± 0.25^b
Recuperación (min)	1.09 ± 0.20^a	0.92 ± 0.24^a	1.03 ± 0.22^a

IV.2.3. Comparativo de respuesta a los dos anestésicos en pez payaso

En la Figura 5 se muestra que el aceite de clavo fue el más efectivo para las concentraciones de 100 y 300 mg l^{-1} comparado con el MS-222, ya que en estas se presenta los tiempos menores de respuesta con (5.87 ± 2.31 y 0.56 ± 0.29 min, respectivamente), sin embargo, para ambos anestésicos en la dosis de 500 mg l^{-1} se observan tiempos similares con 0.43 ± 0.11 y 0.48 ± 0.25 min.

El tiempo de recuperación en aceite de clavo para la dosis de 100 mg l^{-1} el periodo fue menor (5.87 ± 2.31 min) al del MS-222 (10.73 ± 3.26 min). Sin embargo para las concentraciones de 300 y 500 mg l^{-1} en ambos anestésicos las fases fueron similares, siendo la dosis de 300 mg l^{-1} la de menor tiempo (Figura 6).

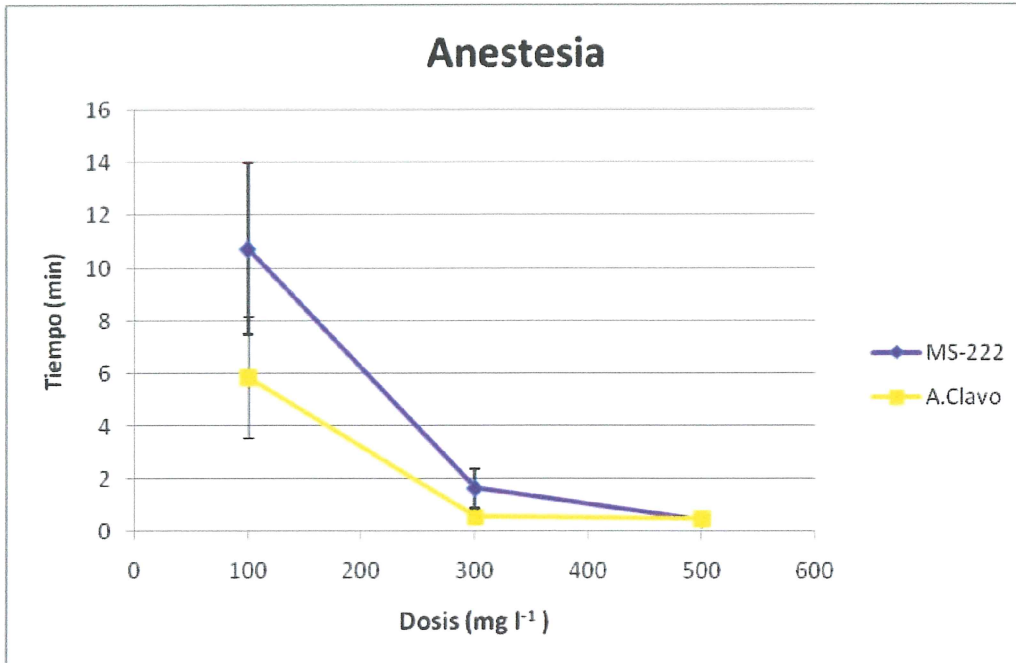


Figura 5. Tiempo de respuesta a los anestésicos en pez payaso a una temperatura de $23.74^{\circ} \pm 0.60^{\circ}\text{C}$.

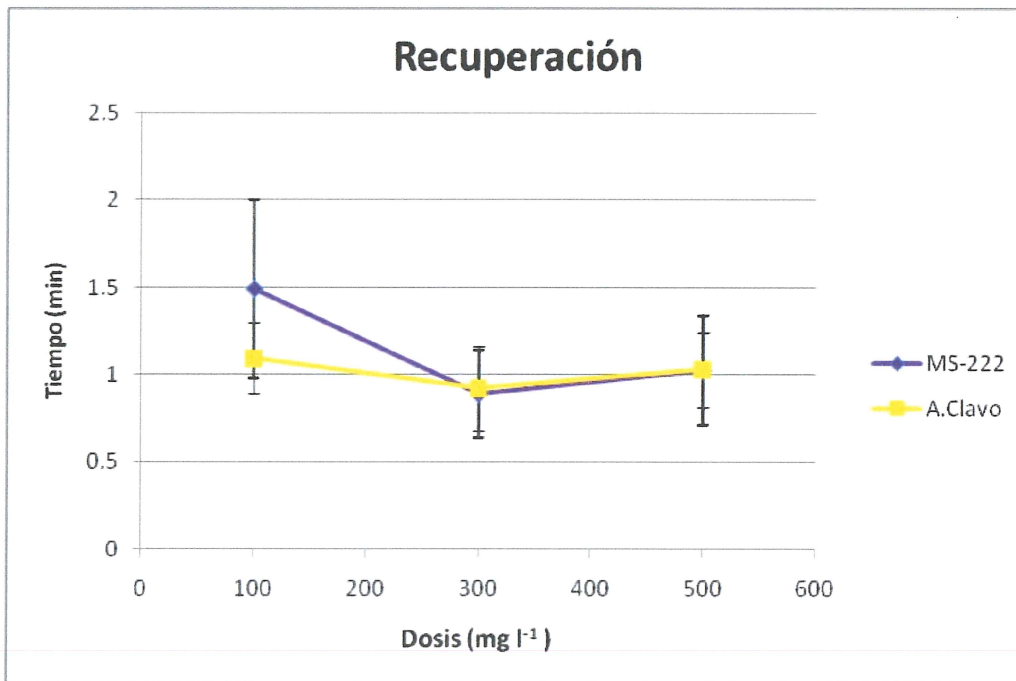


Figura 6. Tiempo de recuperación a los anestésicos en pez payaso a una temperatura de $23.74^{\circ} \pm 0.60^{\circ}\text{C}$.

V.- Discusiones

El uso de anestesia para la manipulación de organismos de cultivo es una práctica necesaria para minimizar el estrés (King *et al.*, 1998). Hasta el momento el anestésico más utilizado para esta actividad por su alta solubilidad y rápido efecto ha sido el MS-222 (Soivio *et al.*, 1977), sin embargo, además de que tiene un alto costo (Bernstein *et al.*, 1997), no es del todo benéfico para los organismos y puede causar efectos secundarios tales como incremento en la concentración de glucosa, lactato, magnesio, hemoglobina y hematocrito de 3 a 7 días después de la anestesia, así como hipoxia, anoxia, bradicardia y en algunos casos mortalidades (Stoskopf, 1993). Por estas razones, es de vital importancia buscar alternativas de anestesia de origen natural. Recientemente se ha demostrado que el aceite de clavo es una alternativa natural, amigable con el medio ambiente, segura, fácil de preparar, así como económica para ser utilizado como anestésico (Waterstrat, 1999).

V.1.- Corvina blanca

V.1.1.- Respuesta a la anestesia con MS-222

Las dosis de 135 y 150 mg l⁻¹ fueron similares, por lo que la concentración de 135 mg l⁻¹ es la más eficiente debido a que los organismos se anestesiaron y se recuperaron en menor tiempo (<3.1 y < 4.5 min, respectivamente) sin necesidad de utilizar más

anestésico (150 mg l^{-1}). En este trabajo la dosis fue elevada comparada con lo reportado por Keene *et al.* (1998), en donde los autores mencionan concentraciones eficientes de MS-222 para trucha arcoíris de 80 y 100 mg l^{-1} con un tiempo de respuesta <1.5 min. La temperatura es un factor extrínseco que modifica la tasa metabólica directamente con su variación. Esto significa que al disminuir la temperatura también disminuye la tasa metabólica, así como, al elevarse se aceleran los procesos fisiológicos (Hoar, 1978). Corvina blanca al ser un organismo donde su temperatura óptima de cultivo se encuentra entre los $18-23 \text{ }^\circ\text{C}$ (Chavarría, 2008; Torres, 2005) y al haber sido anestesiado a $15.99 \pm 0.02 \text{ }^\circ\text{C}$ posiblemente la temperatura tuvo un efecto sobre la velocidad de consumo de oxígeno disminuyendo la tasa de respiración, retardando con ello la respuesta y recuperación al químico MS-222.

V.1.2.- Respuesta a la anestesia con aceite de clavo

Las concentraciones de 205 y 260 mg l^{-1} fueron similares entre sí, la dosis más eficiente fue de 205 mg l^{-1} esto quizás debido a que con una concentración mínima el organismo logró anestesiarse y recuperarse en un tiempo menor (<3.1 y <7.6 min, respectivamente), en comparación a una dosis mayor (260 mg l^{-1}). La dosis muestra ser elevada a lo publicado por Mylonas *et al.* (2005) quienes reportan concentraciones eficientes en lobina europea y dorada a 15°C con aceite de clavo con una concentración de 40 mg l^{-1}

y un tiempo de respuesta < 3 min., los resultados del presente trabajo muestran respuestas diferentes ya que probablemente la dosis óptima en este estudio fue elevada debido a la respuesta metabólica del organismo al anestésico utilizando bajas temperaturas. Además la eficacia de los anestésicos también puede ser afectada por el tipo de especie, tamaño corporal, número de organismos muestreados y la calidad del agua (Ackerman *et al.*, 2008). Estos factores posiblemente influyeron a que la respuesta de corvina blanca a la inducción y recuperación de anestesia fuera retardada.

En la Figura 4 se observó que el tiempo de recuperación aumentó mientras se elevaba la dosis de 150-260 mg l⁻¹. Diversos autores mencionan que el tiempo de recuperación se incrementa conforme se aumenta la dosis o si el organismo se mantiene durante un periodo prolongado en el anestésico con aceite de clavo (Keene *et al.*, 1998; Waterstrat, 1999; Hoskonen y Pirhonen, 2004; Hajeck *et al.*, 2006). En particular Keene *et al.* (1998) sugiere que el eugenol tiene un efecto mayor sobre el sistema cardiaco y respiratorio comparado con el MS-222, provocando así una reducción en estos ritmos. Estos efectos podrían prolongar la retención de eugenol en el torrente sanguíneo. Por lo tanto el aceite de clavo es más efectivo en dosis pequeñas comparado con los otros anestésicos (King, 1998; Grush, 2004).

V.1.3.- Comparativo de respuesta y recuperación a los dos anestésicos

En este trabajo se esperaba que el aceite de clavo fuera más eficiente que el químico MS-222. Sin embargo, las dosis y tiempos de anestesia así como la de recuperación en el presente experimento fueron mayores en aceite de clavo comparadas con las del químico MS-222, esto posiblemente debido a la escasa solubilidad del aceite con el agua, así como a la baja temperatura $15.99^{\circ} \pm 0.02^{\circ}\text{C}$ ya que a temperaturas bajas los solutos son difícilmente disueltos. Además la solubilidad y la estabilidad de los agentes (eugenol y Tricaina) afectan la eficiencia de un anestésico retardando el efecto de respuesta y recuperación (Ackerman *et al.*, 2008).

V.2.-Pez payaso

V.2.1.- Respuesta a la anestesia con MS-222

La dosis de 300 mg l^{-1} fue la más eficiente con un tiempo de respuesta $<2.40 \text{ min}$ y de recuperación $<1.20 \text{ min}$. Esta concentración es superior a lo publicado por Grush (2004) quien reporta que en dosis de $100\text{-}200 \text{ mg l}^{-1}$ a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ es posible anestésiar al pez cebra en menos de 3 min.

Aunque los tiempos de respuesta y recuperación en pez payaso son eficientes, es importante considerar que no es recomendable utilizar dosis muy altas, porque es probable obtener una respuesta toxica en el organismo (Martindale, 1997). Además Matttson y Ripple

(1989) determinaron que concentraciones mayores a 100 mg l^{-1} en el bacalao (*Gadus morhua*) pueden desarrollar una anoxia y por consiguiente altas tasas de mortalidad.

V.2.2.- Respuesta a la anestesia con aceite de clavo

La dosis mas eficiente fue de 300 mg l^{-1} con un tiempo de anestesia $<0.85 \text{ min}$ y de recuperación <1.20 , siendo los periodos de respuesta más cortos en aceite de clavo comparados con MS-222. La concentración mas eficiente reportada en este trabajo para pez payaso es considerablemente mas elevada comparada con la publicada por Durville y Collet (2001) para *Valamugil cunnesius* y *Monodactylus argenteus* con una dosis de 25 mg l^{-1} con un tiempo de respuesta $<1 \text{ min}$, no obstante, los autores no reportan la temperatura del ensayo y quizás este parámetro produjo dicha respuesta. Sin embargo Grush (2004) reportó dosis de $60-120 \text{ mg l}^{-1}$ las cuales inducen al pez cebra a la anestesia en menos de 1 min .

V.2.3.- Comparativo de respuesta a los dos anestésicos

El anestésico más eficiente fue el aceite de clavo con tiempos de respuesta y recuperación más cortos comparados con el químico MS-222. Keene *et al.* (1998) reportó que con aceite de clavo es posible obtener tiempos de respuesta más cortos comparados con las mismas dosis en MS-222. Encontrando en el presente estudio tendencias similares para pez payaso.

En general lo descrito nos indica que el aceite de clavo puede ser empleado como anestésico en corvina blanca y pez payaso sin provocar alteraciones en los organismos, mostrando mayor eficiencia en *A. ocellaris*. Sin embargo, es recomendable en dosis bajas ($<205 \text{ mg l}^{-1}$ y $<300 \text{ mg l}^{-1}$, respectivamente) ya que al administrar concentraciones altas con aceite de clavo los tiempos de recuperación son mayores.

VI. CONCLUSIONES

- El aceite de clavo puede ser utilizado eficientemente como anestésico en corvina blanca y pez payaso.
- El químico MS-222 fue más eficiente como anestésico comparado con el aceite de clavo en corvina blanca.
- El aceite de clavo mostró ser más eficiente como anestésico comparado con el químico MS-222 en pez payaso.
- El aceite de clavo utilizado en dosis elevadas en corvina blanca y pez payaso mostró tiempos más prolongados de recuperación en comparación con el químico MS-222.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda para futuros experimentos anestésiar a corvina blanca bajo temperaturas de 19 - 21°C y así facilitar la disolución del aceite de clavo, permitiendo utilizar dosis de anestesia bajas.
- En futuros ensayos en corvina blanca se recomienda utilizar material de cristalería para las anestésias y así las dosis aplicadas serán mas precisas, ya que al utilizar recipientes de plástico se puede absorber en las paredes porción de la dosis de anestesia.

• **VIII.- LITERATURA CITADA**

- Ackeman, J.L., y Bellwood, D.R. 2002. Comparative efficiency of clove oil and rotenone for sampling tropical reef fish assemblages *Journal of Fish Biology* (60) 893-901 pp.
- Ackerman, P.A., Morgan, J.D. y Iwama, G.K. 2008. Manual anesthetic. 22 pp.
- Ayres, W. O., 1860., Description of fishes., Proceedings of the California Academy of Sciences (Series 1), 2:77-81
- Bernstein, P.S., Digre, K.B. y Creel, D.J. 1997. Retinal toxicity associated with occupational exposure to the fish anesthetic MS-222. *American Journal of Ophthalmology* 124 (6) 843-844. (http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Fish/Fish%20Anesthetics%20-%20ENG.pdf).
- Chavarría, V.S. 2008 Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca, *tractoscion nobilis* (ayres, 1860) (sciaenidae), y selección de fuentes proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 105 pp.
- De la Gándara, F.; Raja, T. y García-Gómez, A. 2003. El aceite de clavo como anestésico de *Seriola dumerili*: uso y recomendaciones. Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Murcia. Planta de Cultivos Marinos. Congreso nacional de acuicultura Cádiz 2003. 2 pp.
- Donohoe, M., A. Kent y D.B. Foster. 1991. Age, growth distribution, and food habits of recently settled white sea bass, *Atractoscion nobilis*, off San Diego, California. *Fishery Bulletin*. (95) 709-721.
- Durazo, E., Cruz, A., López, M.L., Lazo, P.L., Drawbridge, M. y Viana, M.T. Effect of different levels of digestible protein on growth

performance of juvenile *Atractoscion nobilis* using diets balanced with non digestible protein to contain equal amount of total protein. En prensa.

- Durville P. y Collet A. 2001. Clove oil used as an anesthetic with juvenile tropical marine fish. University of Reunion Marine Ecology Laboratory. *SPC Live Reef Fish Information Bulletin #9*.
- Erdmann, M.V (2008). Clove oil: an 'eco-friendly' alternative to cyanide use in the live reef fish industry?. University of California, Berkeley and Indonesian Institute of Sciences.
- García, G.A., De la Gándara F. y Raja T. 2002. Utilización del aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* L. (Merr y Perry), como anestésico eficaz y económico para labores rutinarias de manipulación de peces marinos cultivados. Boletín-Instituto Español de Oceanografía. 18 (1-4): 21-23.
- Grush, J., Noakes, D.L.G., And Moccia, R.D. 2004. The Efficacy of Clove Oil As An Anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). © Mary Ann Liebert, Inc. ZEBRAFISH. 1 (1) 46-53.
- Hajek, G.J., KŁyszejko, B. y Dziaman, R. 2006. The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. Acta Ichthyologica et Piscatoria. 36 (2): 93-97
- Hoar, W.S. 1978. Fisiología general y comparada. Ediciones Omega. Barcelona, 855 pp.
- Hoff, F.H. 1996. Condition, spawning and Reading of fish with emphasis on marine clown fish. *Aquaculture consultants* Inc. 212 pp.
- Hoskonen, P. y Pirhonen, J.2004. Temperature effects on anesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. *Journal of Fish Biology*, (64) 1136-1142.
- Hoskonen, P y Pirhonen, J.2004. The effect of clove oil sedation on oxygen consumption of six temperate-zone fish species. *Aquaculture Research*. (35) 1002-1005.

- Kaiser, B.H., Brill, G., Cahill, J., Collett, P., Czypionka, K., Green, A., Orr, K., Pattrick, P., Scheepers, R., Stonier, T., Whitehead, M. A. y Yearsley, R. 2006. Testing clove oil as an anaesthetic for long-distance transport of live fish: the case of the Lake Victoria cichlid *Haplochromis obliquidens*. *Journal of Applied Ichthyology*. (22) 510–514.
- King, V.W., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C., y Berlinsky, D.L. 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine ethanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L). *Aquaculture Research*. (34) 1442-1449.
- Kioshi A.I., Afonso L.B., Iwama G.K. y Moraes G. 2005. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica*. 35 (2) 289–295.
- Keene J.L., Noakes D.L., Moccia R.D. y Soto C.G. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, (29) 89-101.
- Lagler, K.F., Bardach J.E., Miller, R.R. y Passino, D.R. 1984. *Ictiología*. AGT EDITOR, S.A., México, 489 pp.
- Love, M. 1996. Probably more than you wanted to know about the fishes of the Pacific Coast. Really Big Press. Santa Barbara, California. 246-248 pp.
- Mattson, N.S., y Riple T.H., 1989 Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, colobutanol and phenoxyethanol. *Aquaculture*. (83) 89-94.
- Marking, L.I. y Meyer F.P. 1985. Are better anesthetics needed in fishers? *Fisheries*. (10) 2-5.
- Martindale. 1997. *The extra pharmacopoeia* 27th ed (Wade, A., ed.). The Pharmaceutical Press, London.

- Munday P. L. y Wilson, S. K. 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish, *Journal of Fish Biology*. (51) 931-938 pp.
- Mylonas C.C., Cardinaletti G., Sigelaki I. y Polzonetti-Magni A. 1998. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*. (246) 467-481.
- Schnitt, R. J. 1979. Interactions between predators and secondarily preferred prey: consequences of dissimilar.
- Soivio, A., Nyholm, K. y Huhti, M. 1977 Effect of anesthesia with MS-222, neutralized MS-222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gaidneri*. *Journal of Fish Biology*. (10) 91-101.
- Soto, C.G. 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish. *Aquaculture*, 136, 149-152.
- Stoskopf, M.K., 1993. *Fish Medicine*. W.B. Saunders Company. EUA, 882 pp.
- Steven, J.C., Cory D.S., Kenneth G.O., Bruce L.T. y David H. (2004). Wahl Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Center for Aquatic Ecology. *Aquaculture*. (239) 509-529.
- Torres, C.A. 2005. Respuesta de juveniles de corvina blanca *Atractoscion nobilis* a diferentes concentraciones de lípidos en la dieta. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, 84 pp.
- Palić, D. Herolt, M.D., Andreasen C.B., Menzel B.W. y Roth. 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.
- Patxi. 2007. *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830). Atlas Todo Fauna - Fichas de peces, reptiles, perros, gatos, aves, saurios, quelonios, mamíferos. Potenciado por Joomla. 2 pp.
- Petri Hoskonen, P. y Pirhonen, J. 2004. The effect of clove oil sedation on oxygen consumption of six temperate-zone fish species. Aquaculture Research. (35) 1002-1005.
- Peter, E.T. y Steven, D.R. (1999). , Clove Oil: An Alternative Anesthetic for Aquaculture. Diario norteamericano de la acuicultura. (61) 150-155.
- Silveira C.R. y P.M. Martínez. 2004. Aceite de Clavo (*Syzygium aromaticum*) como anestésico para la manipulación y transporte de *Oreochromis aureus* (Tilapia). Panorama Acuícola. (9)10-13.
- Velisek, J., Svobodova, z., Piackova, v., Groch, L., Nepejchalova, L. 2005. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Veterinary Medicine – Czech*. 50 (6) 269-275 pp.
- Vojkovich M. y Reed J.R. 1983. White Seabass (*Atractoscion nobilis*), in California-Mexican waters: Status of the Fishery. California dept. of Fish and game. *Marine Resources Branch*. CalCOFI Rep (24) 79-83.
- Woody, C. A., J. Nelson, y K. Ramstad. 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *Journal of Fish Biology*. (60)340-347.
- Wilkerson, J.D. 2001. Clown fishes: a guide to their captive care, breeding & natural history. TFH Publications, UC, 240 pp.
- Waterstrat, P.R. 1999. Induction and recuperation from anesthesia in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. *Journal of the world aquaculture society*. 30 (2), 250-255.