



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Patología Animal
Ictiopatología

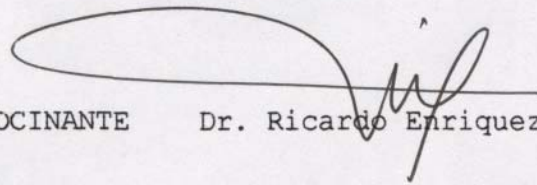
Estudio descriptivo de tres productos anestésicos en
Salmón del Atlántico (Salmo Salar)

Tesis de grado presentada como parte de
los requisitos para optar al Grado de
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA.

Anita María Moyano Armijo
Valdivia Chile 1997

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enriquez



PROFESOR COPATROCINANTE

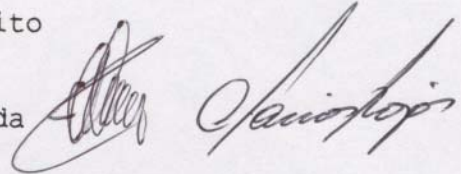
Dr. Elias Caballero

COLABORADOR

Sr. Samuel Valdebenito

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Frederick Ahumada
Dr. Carlos Farias



FECHA DE APROBACION

03 de Noviembre de 1997

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODO	9
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSIÓN.....	16
7. CONCLUSIONES.....	22
8. BIBLIOGRAFÍA.....	23
9. AGRADECIMIENTOS	25

1. RESUMEN

El uso de anestésicos en peces es una práctica común y esencial, pues en el manejo de éstos la resistencia que oponen, produce cambios en su fisiología y conducta. Dentro de la piscicultura esta práctica es usada principalmente en el desove, transporte, pesaje y mareaje, como también en la inyección de los peces.

En este estudio se probaron tres anestésicos, llamados MS-222®, Benzocaína y BZ-20® en alevines y smolt de *S. salar* (Salmón del Atlántico), en dos dosis: una alta y una baja determinadas por el fabricante y la literatura. Para esto se sumergieron para cada caso, en duplicado, 25 peces en una batea que contenía el respectivo anestésico, donde se midió el tiempo de inducción y de recuperación a un estado de anestesia de narcosis profunda (categoría 2"). Además se realizó una segunda experiencia para determinar la tasa de sobrevivencia de los peces a los anestésicos a un estado de anestesia quirúrgica (categoría 3"). Solo con MS-222® fue posible lograr el estado de narcosis profunda (categoría 2") en los estados de desarrollo de alevín y smolt de Salmón del Atlántico. Benzocaína actúa a una concentración más baja que el MS-222®, debido a que su disolución previa en acetona o etanol, potencia la acción del anestésico. En esta experiencia solo se obtuvo para benzocaína el estado de anestesia deseado (categoría 2") a la dosis alta (45 ppm) para alevín y smolt. A la dosis baja no se logró el estado de anestesia testeado. BZ-20® es un derivado de la Benzocaína que posee la ventaja de ser soluble en agua. Solo se obtuvo inducción al estado de anestesia de narcosis profunda (categoría 2") a la dosis alta (40 ppm) para smolt, siendo el tiempo de inducción más alto en relación a los obtenidos por los otros anestésicos. Al no lograr el estado de anestesia deseado (categoría 2") con alevín, se probó el anestésico al doble de la dosis máxima, o sea 80 ppm, con lo cual si se obtuvo el estado de anestesia requerido.

En la prueba de medición del tiempo de sobrevivencia, se indujo a los peces a un estado de anestesia quirúrgica (categoría 3"). El único anestésico que produjo mortalidad en los smolt fue el MS-222® en un 24%. Para el caso del BZ-20® se produjo mortalidad al ser probado al doble de la dosis máxima (80ppm), en un 40% en alevín y un 24% en smolt.

Key words : Anestesia, salmonídeos, productos.

2. SUMMARY

The use of anaesthetics in fish is a common and essential practice. The resistance that they oppose to handling produces physiological and behavioural changes. Within aquaculture, this practice is mainly used in spawning, transport, weighing and tagging, as well as in injection.

In this study, two different doses of three anaesthetics were tested: MS-222®, Benzocaine and BZ-20® in fingerlings and smolts. A high and a low dose of these anaesthetics were used, determined by the manufacturer and by literature. In order to achieve this, 25 fish, in duplicates, were dipped in a pool containing each of these products. The induction and recovery times to and from a deep narcosis anaesthesia (stage 2") were recorded. Besides, a second study was carried out in order to determine the survival rate of the fish when subjected to a surgical anaesthesia (stage 3") with these products.

In Atlantic salmon's fingerlings and smolts, a deep narcosis (stage 2) was only obtained when MS-222® was used. The effect of Benzocaine is obtained at much lower dilutions than with MS-222®, because it's predilution in acetone or ethanol enhances the anaesthetic action. In this experiment the desired state of anaesthesia (stage 2), for fingerlings and smolts, was only obtained with the high dose (45 ppm) was used. With the low dose, this state was not achieved. The BZ-20® is a Benzocaine derivate, having the advantage of being water soluble. The induction of a deep narcosis state of anaesthesia (stage 2) was only obtained with the high dose (40 ppm) in smolts. This induction time was longer than those obtained with the other products. Since the desired state of anaesthesia (stage 2) was not achieved in fingerlings, twice the dose of anaesthetic was tested (80 ppm). The state of anaesthesia was obtained at this concentration.

In the test of survival time, the fish were induced to a surgical anaesthesia state (stage 3). The product that produced mortality in smolts, was MS-222® with a 24% of mortality. With BZ-20®, mortality was obtained when the product was tested at twice it's maximum dose (80ppm), 40% in fingerlings and 24% in smolt.

Key words: Anaesthesia, salmon, products.

3. INTRODUCCION

El manejo de peces ya sea dentro o fuera de su medio natural conlleva grandes dificultades. Su característica de lucha durante la captura y manejo, generalmente produce grandes efectos sobre la fisiología y comportamiento del pez (Anonymus, 1993). El pez, así como los mamíferos, no pueden ser manejados en forma mecánica sin causarles daño o estrés (Farland y Klontz, 1969).

Situaciones de estrés prolongado o severo pueden producir un incremento en la susceptibilidad a enfermedades, disminución del crecimiento y aumento en la mortalidad (Brown, 1993). Otro inconveniente es que los peces no pueden ser removidos del medio acuático por más de 1 a 2 min. Los fármacos anestésicos han permitido superar muchas de estas dificultades (Farland y Klontz, 1969) gracias a sus características depresoras escalables del Sistema Nervioso Central (Goodman y Gilman's, 1996).

En las pisciculturas, los anestésicos son comúnmente utilizados durante el desove, transporte, marcaje y pesaje de los peces (Anonymus, 1993). Actualmente han sido de gran ayuda los productos anestésicos para posibilitar la aplicación de antibióticos inyectables (Enriquez¹, 1997, comunicación personal).

El grado de anestesia requerido varía con el tipo de manejo que se requiera realizar; así para el transporte se requiere de una leve sedación, mientras que para el desove se prefiere de una anestesia profunda (Leitritz y Lewis, 1980). Anonymus (1993), menciona algunos principios para la aplicación de cualquier tipo de anestésico:

1. Restringir la alimentación 12 a 24 hrs antes de ser anestesiados los peces.
2. Utilizar la concentración más baja posible del anestésico para realizar el manejo deseado.
3. Mantener el pez anestesiado por el menor tiempo posible.
4. Mantener el agua del estanque de anestesia bien oxigenado y con una temperatura similar a la temperatura del agua de la que provienen los peces.

¹ Dr. Ricardo Enriquez.

Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile

5. El estanque de recuperación no debe presentar corrientes de agua, pero si debe ofrecer un abundante suministro de agua pura para facilitar la eliminación del anestésico por parte del pez.

Se han utilizado diversos anestésicos, entre los cuales se describen el 2-Phenoxyetanol, Propoxato, MS-222®, entre otros. Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado que la mayoría de estos anestésicos son tóxicos para el pez, por lo cual solo se permite su uso por un corto período de tiempo en anestesia general, lo cual a su vez dificulta el manejo de los peces. Debido a esto, se han creado nuevas preparaciones, menos tóxicas y más efectivas para el uso de anestesia general en peces (Siwicki, 1984).

En lo referente a las vías de administración Farland y Klontz (1969) mencionan:

1. Baños en solución anestésica: es lo más usado y consiste en disolver previamente el anestésico en el agua donde se colocará el pez. Tiene por ventaja poder ser aplicado a una gran masa de peces.
2. Vía intravascular: consiste en puncionar la confluencia de la arteria aferente de las branquias con la aorta dorsal. El acceso a la confluencia arterial se hace a través de la boca y requiere de la sujeción del pez y destreza del operador, por lo cual la inducción de la anestesia por esta vía ofrece escasas ventajas.
3. Vía intramuscular e intraperitoneal: se usa para depositar barbitúricos en el músculo y cavidad abdominal respectivamente. No se usa comúnmente, sólo en circunstancias especiales.
4. Aplicación local: se usa cuando se desea un efecto depresor sobre los receptores de superficie, de escaso uso en peces.

La elección de un anestésico para realizar un determinado manejo con los peces está determinado por diversos factores. El piscicultor requiere de un producto que se dé a un gran número de peces por un período seguro de tiempo. El investigador por otro lado requiere que este producto no altere drásticamente la fisiología del pez, que pueda ser usado repetidamente sobre los mismos peces, sin producir efectos nocivos y que permita controlar la anestesia fácilmente (Farland y Klontz, 1969).

La eficacia de los anestésicos puede variar de acuerdo a las características químicas y temperatura del agua, como también del tamaño y especie del pez (Gilderhus y Marking, 1987).

En general, la óptima concentración del anestésico a usar se ha determinado en base a pruebas de ensayo que relacionan las especies de peces a ser anestesiados y la composición del agua (Farland y Klontz, 1969). Las concentraciones determinadas como efectivas debieran ser usadas como una guía, la cual debe ser ajustada en base a las condiciones del medio con las cuales se está trabajando (Gilderhus y Marking, 1987).

Cuando los peces son colocados en una solución anestésica, ellos la absorben a través de las branquias y en parte a través de la piel, lo cual causa la anestesia general del pez (Siwicki, 1984). De esta manera los peces pasan a través de una secuencia de estados anestésicos descritos ampliamente como: Sedación, pérdida del equilibrio, pérdida de la actividad refleja, colapso medular y muerte. Aunque en la práctica existen desviaciones, este patrón puede servir como base para evaluar el nivel de anestesia en algunos peces. El más importante signo diagnóstico de que un pez está anestesiado es el movimiento opercular, el cual va disminuyendo en frecuencia al inducir la anestesia en el pez (Farland y Klontz, 1969).

Para determinar la profundidad de la anestesia se puede pinchar la aleta anal con la uña del dedo o con una pinza. Al estar el pez en anestesia profunda no hay respuesta, en anestesia poco profunda el pez mueve lentamente la aleta y en anestesia superficial el pez responde moviendo fuertemente la aleta (Smith y Bell, 1967).

En general los peces con mala condición de salud o enfermos, requieren de una baja dosis de anestésico para alcanzar un determinado plano de sedación (Brown, 1993).

El número de peces que pueden ser anestesiados usando la misma solución varía con la especie, tamaño, concentración y tipo de anestésico empleado. Es mejor reemplazar completamente la solución anestésica, que ir adicionando pequeñas cantidades del mismo producto (Farland y Klontz, 1969).

Al existir un excesivo número de peces en la solución anestésica se manifiesta por un incremento en el tiempo de inducción y por la incapacidad de poder obtener anestesia profunda (Smith y Bell, 1967).

De suma importancia es evitar la sobreexposición a la droga, lo cual se manifiesta por una sobreextensión espasmódica de los opérculos. Al existir un intervalo entre espasmos de más o menos 1 min, en pocos minutos más le sigue el paro cardíaco y la muerte. La mayoría de los peces puede ser revivido por dilución de la solución anestésica con agua o colocándolos en agua pura y oxigenada. El período de recuperación es directamente proporcional a la duración de la exposición (Farland y Klontz, 1969).

A continuación se describen los principales anestésicos utilizados en la piscicultura nacional, como son el MS-222® (Tricaina methanosulphonato), la Benzocaína (ethyl-4 -aminobenzoato) y un nuevo producto comercial derivado de la benzocaína llamado BZ-20®.

3.1 MS-222® (Tricaina methanosulphonato)²

El MS-222® es el anestésico más ampliamente utilizado en salmonicultura (Anonymus, 1993).

Son cristales blancos solubles en agua. Las dosis utilizadas para transporte varían entre 25-35 ppm y para anestesia profunda de 50-100 ppm (Farland y Klontz, 1969). El período de inducción para anestesia profunda, requiere de 1-3 min aprox., siendo buena la mantención y la recuperación requiere de 3-15 min (Farland y Klontz, 1969).

Smith y Bell (1967) definen una dosis estándar de 100 ppm. Esta es igualmente efectiva en peces con un rango de peso entre 200 y 4.000 g.

Al ser el pez expuesto repetidamente a la solución anestésica, se produce un ligero incremento en la tolerancia al producto. Esto se manifiesta con un aumento en el tiempo de inducción, lo cual se puede corregir incrementando la concentración del anestésico- (Farland y Klontz, 1969).

Su toxicidad varía considerablemente dependiendo de la especie del pez, tamaño, como también de la calidad y temperatura del agua (Stoskopf, 1993).

El anestésico parece ser más efectivo a bajas temperaturas, posiblemente porque el frío potencia su efecto anestésico (Smith y Bell, 1967).

El bajo pH de la solución provoca un efecto irritante en el pez y esto se puede reducir mediante la preparación de una solución buffer. Muchas veces se utiliza como producto buffer el bicarbonato de sodio, el cual estabiliza el pH entre 7-7,5. Se aplica a una concentración de 10 g por litro de solución.

Farland y Klontz (1969) describen una serie de consecuencias fisiológicas en el pez atribuidas al uso de MS-222®, tales como: hipoxia, hiperglicemia, y cambios en los electrolitos sanguíneos, cambios hormonales, de colesterol, urea, de lactato y ácido ascórbico intrarenal. Los niveles de lactato sanguíneo tienden a aumentar con el anestésico,

² Veterquímica, camino a Melipilla 5641, Stgo.

por lo que se cree que la droga posee características asfixiantes en el pez. Una posible respuesta a este problema sería la baja en la actividad opercular, la que se produciría en forma secundaria. Por esto es muy importante una buena aireación del agua al momento de la anestesia.

Los niveles de lactato sanguíneo aumentan considerablemente en peces que han sido alimentados dentro de las 24 horas previo a la anestesia, debido al metabolismo basal del pez (Brown, 1993).

Debido a su rápida tasa de degradación, se debiera preparar la solución al momento de su uso. Otra precaución a tomar dice relación con el manejo de los peces reproductores, ya que se debe evitar que el anestésico tome contacto con los espermios por causar problemas en la motilidad espermática (Anonymus, 1993).

El margen entre la dosis efectiva y la tóxica tiende a ser estrecha; así 60 ppm son efectivos para trucha arco iris (*O. mykiss*) juveniles, pero 80 ppm producen 80% de mortalidad en los peces después de 15 min de exposición al producto (Gilderhus, 1989).

Solo el MS-222® está registrado para ser usado como anestésico de peces en U.S.A.. Los peces expuestos deben tener un periodo de resguardo de 21 días antes de ir a consumo (Gilderhus y Marking, 1987).

3.2. BENZOCAINA. (ethyl-4-aminobenzoato)³

Es insoluble en agua por lo cual debe ser previamente disuelta en acetona o etanol, los cuales por sí solos son irritantes para el pez (Brown, 1993). Se puede preparar una solución stock (generalmente de 100 g/lt) la cual debe ser guardada en una botella oscura para evitar que se degrade el producto. De esta forma se puede mantener por lo menos un año (Gilderhus y Marking, 1987).

Posee un amplio margen de seguridad. Es muy segura a su exposición dentro de los primeros 5 minutos, pero pasados los 15 minutos puede llegar a ser letal para los peces. También es importante recordar que la Benzocaina es hidrolizada a ácido para-aminobenzoico, por lo que se debe tener especial cuidado con los peces tratados con sulfonamidas (Brown, 1993).

La dosis recomendada varía entre 25-45 ppm. Es relativamente inofensiva para el hombre y efectiva en especies dulceacuícolas, marinas y tropicales (Kidd y Banks, 1990).

³ Veterquímica, camino a Melipilla 5641, Stgo.

La Benzocaina en solución es neutra y causa una menor reacción estresante que el MS-222®.

No se ha demostrado que provoque alteraciones en la capacidad reproductiva de los peces (Anonymus, 1993).

El tamaño de los peces está posiblemente correlacionado con la concentración efectiva, ya que por ejemplo: trucha arcoiris más pequeñas usualmente requieren más baja concentración y peces más grandes una mayor. Además existe una relación entre eficacia y temperatura del agua, debido a que a menor temperatura se requiere de una mayor concentración (Brown, 1993).

3.3. BZ-20® (etil- p- aminobenzoato)³

Con respecto al BZ-20® (etil-p-aminobenzoato), es un nuevo producto anestésico y tranquilizante para la inmovilización temporal de peces, que se expende a una concentración de 20 g de etil-aminobenzoato por 100 ml de producto.

Se caracteriza por ser una solución de Benzocaina fácil y cómoda de aplicar, soluble en agua. Dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición, BZ-20® tiene una acción sedativa o anestésica en los peces.

Residuos de la droga pueden permanecer en los tejidos de los peces, sin embargo estos se disipan rápidamente cuando el pez se ubica en agua fresca. Pese a ello se recomienda no emplear el anestésico por lo menos 21 días antes de la cosecha de los peces que van a consumo (Valdebenito, 5. 1995, comunicación personal⁴).

En este trabajo se compara el efecto anestésico de estos tres productos en su presentación comercial: MS-222®, Benzocaina y BZ-20® en las etapas de desarrollo de alevin y smolt de **S. salar**. Además se determina el tiempo de sobrevivencia a estos anestésicos.

En este trabajo se postula que estos anestésicos producen una anestesia segura en smolt y alevin a las dosis recomendadas por los fabricantes y la literatura.

3

⁴ Samuel Valdebenito. Ingeniero Químico. Veterquímica Ltda.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 MATERIAL

Se utilizaron peces de la especie **Salmo salar** (Salmón del Atlántico), constituidos por trescientos alevines con un peso promedio de 5 -6 g, y trescientos smolt con un peso de 30 - 32 g.

Se usaron los productos anestésicos MS-222®, BENZOCAINA y BZ-20® en su presentación comercial.

Adicionalmente se utilizó:

- Bateas plásticas de 50 It.
- Cronómetro.
- Agua dulce para los alevines y smolt.
- Kit de determinación de oxígeno, pH, nitritos, nitratos, amoníaco y amonio en el agua.

4.2 MÉTODO

4.2.1 Condiciones de las experiencias

Los experimentos se realizaron en condiciones de cultivo de una piscicultura. Los alevines fueron directamente extraídos de los estanques de cultivo.

Las condiciones del agua medidas de los alevines fueron:

T° : 13°C

pH : 6.7

Oxígeno : en la entrada 100%
 en la salida 76%

Nitritos : 0 mg/lt.

Nitratos : 4.4 mg/lt.

Nitrogeno-Amonio : amoníaco : 0.0366 mg/lt.
 amonio : 0.0387 mg/lt.

Los smolt utilizados en la experiencia fueron obtenidos desde balsas-jaula ubicadas en un lago.

Las condiciones del agua de los smolt se describen a continuación:

T° : 19.5° C

pH : 7.2

Oxígeno : 84%

Nitrito : 0 mg/lt.

Nitrato : 2.2 mg/lt.

Nitrógeno-Amonio : amoniaco : 0.183 mg/lt.
 amonio : 0.1935 mg/lt.

4.2.2 Proceso da anestesia

En el proceso de anestesia se evaluaron los productos antes mencionados considerando el estado de anestesia de narcosis profunda (categoria 2") según los estados de anestesia propuestos por Brown (1993).

CATEGORÍA	ESTADO	RESPUESTA
0	Normal	Nada activamente. Reacciona estímulos externos. Equilibrio normal. Tono muscular normal.
1'	Leve sedación	Continúa nadando voluntariamente. Ligera pérdida de respuesta a estímulos externos.
1''	Sedación profunda	Se detiene la natación voluntaria. Total pérdida de respuesta a estímulos.
2'	Leve narcosis	Pérdida del equilibrio. Esfuerzo para enderezarse. Tono muscular disminuido. Respuesta débil a cambios de posición.
2''	Narcosis profunda	Cesa la respuesta a cambios de posición. Decrece tasa respiratoria. Pérdida total del equilibrio, dificultad para enderezarse. Apto para toma de muestras.
3'	Leve anestesia	Pérdida total del tono muscular. Maniobrable. Baja tasa respiratoria.
3''	Anestesia quirúrgica	Ausencia de respuesta a estímulos. Tasa respiratoria muy baja. Baja tasa circulatoria.

En igual forma se tomó el tiempo que demoraron los peces en recuperarse de la anestesia (categoría 0). Este se midió como **Tiempo de Recuperación**.

Se repitió la experiencia con otros 25 alevines en cada caso con la dosis B para MS-222® y Benzocaina, y a la dosis C para BZ-20®.

En otro experimento se indujo anestesia a otros 25 smolt, tanto a la dosis A de los distintos productos, como a la dosis B para MS-222® y Benzocaina, y C para BZ-20®. Obteniendo de igual forma el tiempo de inducción y de recuperación a la anestesia.

La determinación del **Tiempo de Sobrevivencia** a los tres anestésicos se realizó según el siguiente procedimiento: se sumergieron 25 alevines a la dosis alta de cada anestésico. Esta dosis fue para el MS-222® de 100 ppm, para la Benzocaina de 45 ppm y para el BZ-20® de 40 ppm; siendo este último probado adicionalmente con una dosis de 80 ppm. Se midió el tiempo de inducción a un estado de anestesia quirúrgica (categoría 3"), donde la tasa respiratoria es ya muy baja, con pérdida total de respuesta a estímulos externos.

Alcanzado este estado de anestesia fueron transpasados a agua fresca sin anestésico. De igual forma se midió el tiempo de recuperación, o en caso contrario se determinó la mortalidad que se produjo para cada producto utilizado.

Luego se repitió la experiencia de igual forma con otros 25 smolt para cada producto.

No se utilizó método estadístico debido al carácter descriptivo de este estudio. Es de considerar la escasa variación que se obtuvo de los tiempos de inducción y de recuperación entre los distintos individuos de cada grupo y la imposibilidad que existe para medir a los distintos individuos del grupo en forma separada.

Tabla 2: Tiempo de inducción y de recuperación a la anestesia usando Benzocaina, en dosis de 45 ppm en alevín y smolt de Salmón del Atlántico (*S. salar*).

Dosis	Alevín			Smolt		
	r1	r2	P	r1	r2	P
Dosis alta 45 ppm.	T.I:2.5 T.R:1.5	1.1:2.2 T.R:1.5	T.I:2.4 T.R:1.5	T.I:1.5 T.R:1.2	T.It1.1 T.R:1.0	T.I:1.3 T.Rr1.1

T.I: Tiempo de inducción. r1 : resultado 1.
T.R: Tiempo de recuperación. r2 : réplica.
Unidad de medida: minutos. P : promedio.

5.3 BZ-20® :

Para el BZ-20® no se obtuvo el estado de narcosis profunda (categoría 2") al utilizar las dosis de 25 y 40 ppm para alevín, como tampoco al usar la dosis de 25 ppm para smolt.

La tabla 3 indica el tiempo de inducción y de recuperación al usar BZ-20® a la dosis de 40 ppm en smolt de Salmón del Atlántico.

Tabla 3: Tiempo de inducción y de recuperación a la anestesia usando BZ-20® en dosis de 40 ppm en smolt de Salmón del Atlántico (*S. salar*).

Dosis	Smolt		
	r1	r2	P
Dosis alta 40 ppm.	T. 1:3.0 T.R:0.7	T.I:3.2 T.R:0.8	T. 1:3.1 T.R: 0.8

T.I: Tiempo de inducción. r1 : resultado 1.
T.R: Tiempo de recuperación. r2 : réplica.
Unidad de medida: minutos. P : promedio.

La tabla siguiente indica el tiempo de inducción y de recuperación para BZ-20® a la dosis de 80 ppm para alevín de **S. salar**.

Tabla 4: Tiempo de inducción y de recuperación a la anestesia usando BZ-20® en dosis de 80 ppm en alevín de Salmón del Atlántico (S. salar).

Alevín			
Dosis	r1	r2	P
Dosis doble 80 ppm.	T.I:1.2 T.R:0.9	T.I:1.3 T.R:0.9	T.I:1.3 T.R:0.9

T.I: Tiempo de inducción. r1 : resultado 1.

T.R: Tiempo de recuperación. r2 : réplica.

Unidad de medida: minutos. P : promedio.

El tiempo de sobrevivencia a los anestésicos se determinó a través del tiempo de inducción y de recuperación a un estado de anestesia quirúrgica (categoría 3"), utilizando para esto la dosis alta de MS-222® (100 ppm), Benzocaína (45 ppm) y BZ-20® (80 ppm), además de la mortalidad de peces que produjo cada anestésico testeado, lo cual se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 5: Tiempo de inducción, de recuperación a un estado de anestesia quirúrgica (categoría 3") y mortalidad, usando MS-222®, Benzocaína y BZ-20® en alevín y smolt de Salmón del Atlántico (S. salar).

Dosis	alevín	smolt
MS-222 100 ppm.	T.I:4.8 T.R:3.5 Mort:0/25*	T.I:4.0 T.R:4.5 Mort:6/25*
Benzocaína 45 ppm	T.I: 7.5 T.R:4.0 Mort: 0/25*	T.I: 5.0 T.R:3.2 Mort:0/25*
BZ-20 80 ppm	T.I:3.3 T.R:6.0 Mort:10/25*	T.I:2.5 T.R:5.0 Mort:6/25*

T.I:Tiempo de inducción

T.R:Tiempo de recuperación

Mort;Mortalidad.

*:peces muertos / total de peces anestesiados

Unidad de medida:minutos

De la tabla N° 5 se destaca que MS-222 produjo un 24% de mortalidad en los smolt de Salmón del Atlántico. BZ-20® indujo mortalidad tanto en alevines (40%) como en smolt (24%) al ser probado al doble de la dosis máxima (80 ppm) recomendada por el laboratorio.

6. DISCUSION

Este trabajo fue diseñado pensando en obtener mayor información del uso de anestésicos en peces para aminorar los efectos adversos de un nuevo manejo que ha debido incorporar la salmonicultura nacional. Ha sido necesario utilizar adecuadamente la vía inyectable para el control de ciertas enfermedades de gran impacto en el sistema productivo, ya que posibilita el uso de antibióticos y vacunas inyectables. Esta práctica que involucra el uso correcto de anestésicos, se ha difundido en Europa con la vacunación para la furunculosis, ya que la vía parenteral resulta en mayores tasas de protección de los peces respecto de los baños (Ellis, 1988). Además, este tipo de aplicación permite usar la dosis justa para cada pez y evitar pérdidas innecesarias del producto, a su vez se debe considerar que la vía de aplicación a través del alimento y de los baños producen una contaminación del medio acuático, resultando cepas cada vez más resistentes a los antibióticos, debiendo utilizarse dosis cada vez más altas (Caro y col., 1994).

En este trabajo se probaron dos anestésicos ya conocidos en el mercado, como son el MS-222® y la Benzocaína, y uno nuevo llamado BZ-20®, utilizando en cada caso dos dosis, una alta y una baja, definida por la literatura y el fabricante.

La literatura describe escasamente el estado de anestesia logrado por los diversos investigadores al utilizar distintos anestésicos. La mayoría de los autores se remiten solamente a informar que a una determinada dosis se obtuvo o no anestesia, existiendo por lo tanto un vacío en lo referente al grado de anestesia logrado. Considerando esto último, no siempre fue posible comparar los resultados obtenidos por este trabajo.

Cabe destacar que el estado de narcosis profunda (categoría 2"), es un estado bastante avanzado de anestesia por lo cual no se deben obviar los estados de anestesia que preceden a esta, comúnmente utilizadas en la práctica diaria.

De los resultados obtenidos con los anestésicos en la obtención de un estado de narcosis profunda (categoría 2"), se puede observar en la tabla 1 que sólo con el MS-222® fue posible lograr este nivel de anestesia, para los estados de desarrollo de alevín y smolt de **S. salar**.

Podemos resaltar que las dosis utilizadas por el MS-222® de 50 y 100 ppm (tabla 1) son casi el doble de las utilizadas para la Benzocaína (tabla 2) de 25 y 45ppm y para BZ-20® (tabla 3) de 25 y 40 ppm, respectivamente.

Se debe considerar, que las condiciones del agua tales como T°, pH y dureza y tamaño del pez influyen en el grado de anestesia obtenido, y también en el tiempo de inducción y de recuperación a ésta (Stoskopf, 1993).

A pesar que todos estos factores influyen en forma conjunta en el grado de anestesia obtenido, para efectos de este estudio serán analizados en forma separada. Los resultados obtenidos por Smith y Bell (1967) y Sylvester y Holland (1982) han sido bastante encontrados en cuanto a como influye la temperatura del agua con el tiempo de inducción de MS-222®. La temperatura del agua en esta experiencia fue de 13°C para alevin y de 19.5°C para smolt, obteniéndose como lo indica la tabla 1, un tiempo de inducción menor para smolt, los cuales se encontraban a mayor temperatura.

Smith y Bell (1967) señalan que el anestésico MS-222®, parece ser más efectivo a bajas temperaturas, posiblemente porque el frío potencia su efecto. Por el contrario, estudios realizados por Sylvester y Holland (1982) señalan que incrementos en la temperatura del agua aumentan la eficacia del anestésico, acortando los tiempos de inducción a ésta. En el ensayo realizado por Sylvester y Holland (1982), al incrementar la temperatura de 12°C a 17°C, se redujo el tiempo de inducción de 4.5 a 2.3 min. Stoskopf (1993) señala que el anestésico es más tóxico en aguas de mayor temperatura.

Sylvester y Holland (1982) hacen referencia al pH del agua como otro factor que influye en el tiempo de inducción a la anestesia. En nuestro caso como se indica en material y método, el pH para alevin fue de 6,7 y de 7,2 para smolt, presentándose como lo señala la tabla 1, un tiempo de inducción menor para smolt, no considerando la influencia que puede tener el estado de desarrollo de los peces.

Wedemeyer (1970) señala que el MS-222® a pH 7 actúa en su forma base de ethyl m-aminobenzoato presentando esta forma su óptima eficiencia. En la experiencia realizada por Sylvester y Holland (1982) el tiempo de inducción se redujo, bajo pH 5 y sobre pH 7.

En cuanto a la dureza del agua, el mismo autor describe una mejor tolerancia al anestésico en aguas duras que en aguas blandas. Además pudo concluir que el MS-222® causa un incremento en la actividad cardio-ventilatoria en forma independiente de la temperatura del agua, y este incremento en la actividad es acompañada por un aumento significativo en la permeabilidad de iones a nivel de branquias. Stoskopf (1993) señala que el anestésico es más tóxico en aguas blandas que en aguas duras.

Dentro de las especies, hay una directa relación entre la dosis de la droga y tamaño del pez (Houston y Woods, 1972; Huish, 1972). Esta observación sugiere que las tasas metabólicas son de alguna forma

iguales, sin embargo existe una relación inversa entre tasa metabólica y peso corporal.

El MS-222® es liposoluble, por lo cual la duración de la anestesia se puede alargar al inducir anestesia en peces adultos o en hembras maduras (Ross y Geddes, 1979).

Los resultados obtenidos en este trabajo para el tiempo de inducción en los alevines (tabla 1), son muy similares a los obtenidos por Farland y Klontz (1969); no así con los resultados obtenidos de los tiempos de recuperación. Estos autores obtuvieron un tiempo de inducción de 1 min para 100 ppm y de 3 min para 50 ppm y un tiempo de recuperación de 3 min para 50 ppm y de 15 min para 100 ppm, además señalan haber obtenido una buena mantención de la anestesia. Cabe destacar que no se especifica el grado de anestesia obtenido en cada caso.

Brown (1988) describe una concentración de 20 a 50 ppm para anestesia superficial y de 50 a 100 ppm para anestesia profunda, obteniéndose en este último caso un período de inducción dentro de los 3 min y un período de recuperación de 10-15 min, concordando nuevamente con los tiempos de inducción obtenidos en nuestra experiencia para alevines.

Anonymus (1993) describe una dosis óptima para MS-222® entre 10-40 ppm, lo cual coincide con este estudio, porque al probar el anestésico a una concentración similar, de 50 ppm, también se obtuvo una anestesia efectiva.

Gilderhus y Marking (1987) describen una experiencia realizada en aguas blandas a 12 °C, para un estado de anestesia con pérdida del equilibrio (categoría 2"), en alevines y adultos a una concentración de 60 ppm. Estos autores obtuvieron un tiempo de inducción de 3 min y 2.4 min en los distintos tipos de peces, respectivamente. Para un estado de anestesia más profundo, donde el pez es maniobrable (categoría 3'), obtuvieron un tiempo de inducción a la anestesia de 1.7 min en alevines y 1.3 min en adultos.

Es de considerar que la dosis efectiva para Benzocaína es a una concentración más baja que para MS-222® y los costos son solo alrededor del 30% del MS-222® por cada 100 litros de solución (Gilderhus y Marking, 1987).

La Benzocaina actúa a menor dosis, debido a que necesita ser disuelta previamente en acetona o etanol. Estos actúan como depresores del sistema nervioso central, lo cual potencia la acción del anestésico (Gilderhus, 1989).

En este trabajo solo se obtuvo el estado de anestesia deseado para Benzocaina utilizando la dosis alta del anestésico (45 ppm) para alevín

y smolt. A la dosis baja (25 ppm), no se logró el estado de anestesia deseado.

En cuanto a la Benzocaína, Stoskopf (1993), señala que se requiere mayor dosis de la droga a mayor temperatura del agua. Esto se explica porque a mayor temperatura, el pez es capaz de metabolizar más rápidamente la droga. Sin embargo, el mismo autor describe que la droga se hace más tóxica a mayor temperatura del agua, donde a su vez se reduce la solubilidad, produciéndose un precipitado blanco en la superficie del agua. En cuanto a la solubilidad del producto de igual forma opina Brown (1988), señalando que a temperatura más alta del agua se reduce la solubilidad de la Benzocaína, formándose un precipitado blanco en la superficie.

Variaciones en la dureza y pH del agua no producen un efecto considerable en la solubilidad de la Benzocaína (Alien, 1994).

Brown (1993) concluye en su trabajo que la concentración efectiva de Benzocaína está posiblemente correlacionado con el tamaño de los peces ya que por ejemplo: truchas arcoiris (*O. mykiss*) más pequeñas normalmente requieren de una concentración más baja y peces más grandes una mayor concentración, haciéndose esto evidente en los distintos tiempos de inducción. Contrariamente a lo mencionado anteriormente, este autor señala que a menor temperatura se requiere de una mayor concentración del producto. Esto último coincide con nuestro trabajo como se puede evidenciar en la tabla 2, la cual señala un tiempo de inducción mayor para alevines que para smolt, los cuales se encontraban a 13°C y a 19.5°C los smolt.

Alien (1994) obtuvo para el caso de trucha arcoiris un tiempo de inducción de 3.3 min y un tiempo de recuperación de 6.24 min a una concentración de 25 ppm a 12°C. A 17°C obtuvo un tiempo de inducción de 2.33 min y un tiempo de recuperación de 4.56 min. Estos resultados son difícilmente comparables, ya que no se indica el grado de anestesia logrado.

Cilderhus y Marking (1987) obtuvieron a una concentración de 35 ppm un grado de anestesia con pérdida del equilibrio (categoría 2") en un tiempo de inducción de 2.8 min en alevines y de 1.6 min en adultos. Esto es similar a lo obtenido por este estudio a la dosis de 45 ppm.

Para un estado de anestesia donde el pez es maniobrable (categoría 3'), obtuvieron un tiempo de inducción de 3 min para alevines y de 2.2 min para adultos.

Brown (1988) indica en su estudio que es posible obtener en la mayoría de los casos anestesia profunda, a una dosis de 30 a 50 ppm, lo cual coincide con nuestro trabajo, porque como lo indica la tabla 2, fue posible obtener anestesia profunda a la dosis de 45 ppm.

La dosis de Benzocaína recomendada como efectiva en especies marinas es de 25-45 ppm (Anonymus, 1993).

El BZ-20® es un derivado de la Benzocaína que posee la ventaja de ser soluble en agua. Pese a utilizar en este trabajo para BZ-20® dosis similares a la Benzocaína y al MS-222®, fue difícil obtener con el BZ-20® el estado de anestesia deseado. Con este anestésico solo se obtuvo resultado a la dosis alta para smolt (tabla 3), siendo el tiempo de inducción mayor en relación a los obtenidos a la dosis alta de otros anestésicos.

Las dosis utilizadas con BZ-20® para alevín (tabl 3), no logran el estado de anestesia deseado, por lo cual se probó el producto a 80 ppm que es el doble de la dosis máxima tabla 4). Con esta dosis sí se obtuvo el estado de anestesia esperado.

Como estos son los primeros resultados del uso de BZ-20®, se dificulta su comparación con la de otros estudios.

Como se mencionó anteriormente, el BZ-20® no produce el mismo efecto sobre el sistema nervioso central, al no necesitar ser disuelto en acetona o etanol como es el caso de la Benzocaína, que se potencia en su acción anestésica, esto explicaría la necesidad de emplear mayores dosis del producto.

Experiencias realizadas por el laboratorio Veterquímica con BZ-20® a una concentración de 25 ppm, se presenta un tiempo de inducción de 2.50 - 3.07 min y un tiempo de recuperación de 3-6 min. Para 40 ppm obtuvieron un tiempo de inducción de 2.40 - 3.40 min y un tiempo de recuperación de 6 - 7.50 min.

En la medición del Tiempo de Sobrevivencia a los anestésicos, se indujo a los peces a un estado de anestesia quirúrgica (categoría 3"). Es de considerar que fácilmente se puede pasar del estado de anestesia quirúrgica (categoría 3"), a un estado de colapso medular (categoría 4) donde se produce paro cardíaco y muerte.

En la prueba de medición del tiempo de sobrevivencia a los anestésicos realizada en esta experiencia, el único anestésico que produjo mortalidad en los smolt fue el MS-222®. Para el caso del BZ-20® se produjo mortalidad al ser utilizada al doble de la dosis máxima (80 ppm) recomendada por el laboratorio.

Gilderhus (1990) señala que un pequeño incremento en la concentración o en el tiempo de exposición a la Benzocaína, causa un incremento considerable en el tiempo de recuperación o incluso puede llegar a ser letal en los peces, probablemente por el efecto del etanol o de la acetona.

Este autor comprobó en su experiencia que concentraciones de 25-30 ppm de Benzocaina, anestesian en menos de 3.5 min a S. del Atlántico y se recuperan de la anestesia en 10 min. En su experiencia, los S. del Atlántico toleraron 30 ppm por aproximadamente 20 min, pero 25 min de exposición fueron letales. En otro estudio sobre 15 min de exposición al anestésico a una concentración de 40 ppm fueron letales para el S. del Atlántico (Gilderhus, 1990). El mismo autor obtuvo el año 1989 para Benzocaina una concentración letal con 50 ppm, a una temperatura del agua de 12°C con un tiempo de inducción de 20 min y para temperatura del agua de 17°C, una concentración letal de 35 ppm con un tiempo de inducción de 20 min. Referente a lo expuesto anteriormente, se puede observar en los resultados obtenidos en esta experiencia que Benzocaina no produjo mortalidad en los peces a la dosis de 45 ppm, a diferencia de los 50 ppm utilizados por Gilderhus (1989) a un tiempo de exposición más bajo. Al continuar manteniendo los peces en el medio con el anestésico por más tiempo, el efecto del anestésico empezó a revertir, presentándose signos de recuperación al anestésico.

No se produjo mayor mortalidad al inducir al estado de anestesia quirúrgica (categoría 3"), a pesar de haber llegado a un estado bastante avanzado de anestesia. Como señalan Farland y Klontz (1969), la mayoría de los peces puede ser revivido por dilución de la solución anestésica con agua o colocándolos en agua pura y con altos niveles de oxígeno disuelto.

Para obtener un estado de anestesia quirúrgica (categoría 3"), se sometió a los peces a un mayor tiempo de exposición a los anestésicos, con lo cual se pudo observar un incremento considerable del tiempo de recuperación a la anestesia al calcular la diferencia en porcentaje que se produce entre el tiempo de recuperación a la dosis de narcosis profunda respecto de la dosis de anestesia quirúrgica, siendo para MS-222® en alevines un 192% superior y para smolt un 1.025%. Para Benzocaina fue un 150% y 191% para alevín y smolt, respectivamente y para BZ-20® un 566% de incremento en alevín.

Farland y Klontz (1969) señalan que el período de recuperación es directamente proporcional a la duración de la exposición. Lo anterior coincide con nuestra experiencia al comparar los resultados obtenidos en la obtención de narcosis profunda (categoría 2") y de anestesia quirúrgica (categoría 3"). Los porcentajes de aumento del tiempo de recuperación en relación a los porcentajes de aumento de los tiempos de inducción, fueron muy similares para MS-222® en alevines y para Benzocaina en alevín y smolt. Para MS-222® se obtuvo un aumento del tiempo de inducción de 220% y del tiempo de recuperación de 192%. Para Benzocaina se obtuvo en alevines un aumento del tiempo de inducción de 212% y del tiempo de recuperación de 150%, mientras que para smolt se obtuvo un aumento en el tiempo de inducción de 284% y del tiempo de recuperación de 191%.

7. CONCLUSIONES

- Solo con MS-222® se pudo obtener con las dos dosis probadas el estado de anestesia de narcosis profunda (categoría 2") tanto para alevín como para smolt de Salmón del Atlántico.
- MS-222® indujo más rápidamente al estado de anestesia deseado (categoría 2") para alevín y smolt, con la dosis alta del producto en relación a Benzocaína y BZ-20®.
- El tiempo de inducción de MS-222® fue menor para smolt que para alevín, tanto a la dosis baja como alta del producto.
- Los tiempos de inducción a la anestesia obtenidos a las dosis bajas de los productos son difícilmente comparables ya que varios productos no indujeron el estado de anestesia requerido.
- Solo se obtuvo el estado de anestesia deseado para Benzocaína utilizando la dosis alta del anestésico (45 ppm) para alevín y smolt.
- El tiempo de inducción de Benzocaína fue mayor para alevines que para smolt.
- El producto BZ-20® es más seguro que la Benzocaina, ya que elimina el efecto potenciador de la acetona o el etanol.
- Con BZ-20® solo indujo el estado de anestesia de narcosis profunda (categoría 2") a la dosis alta (40 ppm) para smolt.
- MS-222® fue el único producto que produjo mortalidad en los smolt en la prueba de sobrevivencia a los anestésicos a la dosis de 100 ppm.
- Los productos son bastante seguros, considerando que al inducir el estado de anestesia quirúrgica (categoría 3") se utilizó la dosis máxima recomendada por la literatura y el fabricante. Con MS-222® se obtuvo un 24% de mortalidad en smolt. BZ-20® al ser probado al doble de la dosis máxima recomendada por el fabricante se obtuvo un 40% de mortalidad en alevín y un 24% en smolt.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALLEN, J.1994. Residues of Benzocaine in Rainbow Trout. The Prog. Fish Cult. 50:59-60.
- 2.- ANONIMUS.1993. Anaesthetic Techniques for fish. Aquaculture Fish Health. VPM 232. Atlantic Veterinary College. Canadá 5:29.
- 3.- BROWN, L. 1988. Physiologic effects of anesthesia on fish. The Veterinary Clinics small animal practice.7:322-329.
- 4.- BROWN, L. 1993. Anesthesia and Restaint. Charper 6 Fish Medicine, Stoskopf, M.p. 79-90. W.B. Saunders Company.
- 5.- CARO, H; R. ZIMMERMANN and R. ENRIQUEZ. 1996. Problemas ambientales de los cultivos piscícolas, implicaciones prácticas. Compendio Acuícola de Chile. N°2, Nov. 1994.
- 6.- ELLIS, A. 1988. Fish Vaccination. Acadcmic Press London.
- 7.- FARLAND, Me. and G. KLONTZ. 1969. Anesthesia in fishes. Federation Proceedings 28:1535-1540.
- 8.- GILDERHUS, P. and L. MARKING. 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management 7:288-292.
- 9.- CILDERHUS, P. 1989. Efficacy of benzocaine as and anesthetic for salmonid fishes. North American Journal of Fisheries Management 9:150-153
- 10.- GILDERHUS, P. 1990. Efficacy and safety for spawning-phase Salmón. North American Journal of Fisheries Management 52:189-191.
- 11.- GOODMAN, L. and A. GILMAN'S. 1996. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed., Mc Graw Hill, New York.
- 12.- HOUSTON and WOODS. 1972. Influence of upon tricaine methanesulphonate uptake and induction of anesthesia in rainbow trout. Comp Biochem Physiol 54:149-156.
- 13.- HÜISH, P.1972. Benzocaina and MS-222 as a fish anesthetic. Prog. Fish Cult. 52: 189-191.
- 14.- KIDD, R. and BANKS G. 1990. Anesthetizing lake trout with tricaina (MS-222) administered from a spray bottle. Prog. Fish Cult. 52:272-273.

- 15.- LEITRITZ, E. and R. C. LEWIS. 1980. Trout and salmón culture. Cal. Fish Bull., 164, Univ. of Calif., 197 pp.
- 16.- SYLVESTER, J.R. and L.E. HOLLAND. 1982. Influence of Temperatura, Water, Hardness, and Stocking Density on MS-222 Response in Three Species of Fish. Prog. Fish-Cult.3:138-141.
- 17.- STOSKOPF, M. 1993. Clinical Pathology, Charper 9, Fish Medicine, (p. 113-131). W.B. Saunders Company. 9: 161-167.
- 18.- SMITH, L.S.and G.R. Bell. 1967. Anesthetic and Surgical Techniques for Pacific Salmón. Fish Bd. Canada. 24: 1579-1588.
- 19.- SIWICKI, A. 1984. New anaesthetic for fish. Aquaculture, 38:171-176.
- 20.- WEDEMEYER, G. 1970. The role of Stress in the disease resistance of fishes. Am. Fish. Soc. Symp. on Disease of Fish and Shellfish, Spec. Publ. 5.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a las siguientes personas por su valiosa ayuda en la realización de la presente tesis.

- A mi patrocinante Dr. Ricardo Enriquez.
- Al Dr. Elias Caballero.
- Dr. Samuel Valdebenito.
- A mis padres.