



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del efecto anestésico de las plantas;
Dioscorea composita "barbasco" *Gliricidia sepium*
"cacahuananche" y *Piscidia grandifolia* "mata piojos"
en *Oreochromis niloticus* "juveniles de tilapia".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

ALEJANDRA MATIAS LOZADA



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Ignacio Andrés Morales Salas

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Características de los anestésicos.....	7
1.2 Características de <i>Oreochromis niloticus</i>	13
1.3 Características de <i>Dioscorea composita</i>	18
1.4 Características de <i>Gliricidia sepium</i>	21
1.5 Características de <i>Piscidia grandifolia</i>	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVO	
GENERAL.....	26
4.1 Objetivos particulares.....	26
5. MATERIALES Y METODOS.....	27
5.1 Recolecta y determinación taxonómica.....	28
5.2 Preparación de los extractos acuosos.....	28
5.3 Obtención de juveniles de <i>O. niloticus</i>	29

5.4Diseño experimental.....	30
5.4.1. Determinación de la concentración letal (CL 100), concentración letal media (CL 50) y concentración media efectiva (CE 50) de los juveniles de tilapia <i>O.niloticus</i>	30
5.4.2. Exposición a la concentración encontrada media efectiva (CE 50) de cada uno de los extractos acuosos y el Clorhidrato de lidocaína.....	33
5.4.3 Técnicas de manipulación.....	34
5.4.4 Evaluación de la recuperación a corto plazo en los juveniles de Tilapia <i>O.niloticus</i>	35
6 RESULTADOS.....	36
6.1 Concentración letal del clorhidrato de lidocaína, “barbasco”, “cacahuananche” y “mata piojos”.....	38
6.2 Concentración media efectiva (CE50) y media letal (CL50) del clorhidrato de lidocaína, “barbasco”, “cacahuananche” y “mata piojos”.....	40
6.3 Concentración media efectiva (CE 50) y media letal (CL 50) del clorhidrato de lidocaína, “barbasco”, “cacahuananche” y “mata piojos”.....	41
6.4 Técnicas de manejo llevadas a cabo en cada uno de los tratamientos en estado de anestesia quirúrgica con la concentración media efectiva (CE 50).....	45

7. DISCUSIÓN.....	46
8. CONCLUSIONES.....	53
9. LITERATURA CITADA	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estados de anestesia propuestos por Brown (1993).....	9
Tabla 2. Tiempo y concentraciones letales para juveniles de <i>O. niloticus</i>	39
Tabla 3. Tiempos y concentraciones media letal (CL 50) encontradas para los juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i> con cada uno de los extractos acuosos y el clorhidrato de lidocaína.....	40
Tabla 4. Estados de anestesia, tiempos y concentración media efectiva (CE 50) alcanzados por los juveniles de <i>O. niloticus</i>	43
Tabla 5. Tiempo promedio de manejo de los juveniles de tilapia fuera del agua en cada uno de los tratamientos.....	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tilapia del Nilo <i>O. niloticus</i>	14
Figura 2. Rizoma de barbasco <i>Dioscorea composita</i>	20
Figura 3. Raíz de cacahuananche <i>Gliricidia sepium</i>	22
Figura 4. Corteza de tallo de mata piojos <i>Piscidia grandifolia</i>	23
Figura 5. Diagrama de flujo.....	27
Figura 6. Pruebas de concentración letal (CL 100) para los juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i>	31

Figura 7. Pruebas de concentración media efectiva (CE 50) y la concentración media letal (CL 50) para los juveniles de <i>O. niloticus</i>	32
Figura 8. Acuarios experimentales con las concentraciones medias efectivas (CE 50) en juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i>	33
Figura 9. Longitud patrón (cm).....	34
Figura 10. Longitud total (cm).....	34
Figura 11. Papila genital de macho de <i>O. niloticus</i>	35
Figura 12. Oviducto de hembra de <i>O. niloticus</i>	35
Figura 13. Peso promedio húmedo de los juveniles de tilapia <i>O. niloticus</i>	36
Figura 14. Promedio de tallas de longitud patrón y longitud total.....	37
Figura 15. Tiempo promedio de inducción, permanencia y recuperación en juveniles de <i>O. niloticus</i>	43
Figura 16. Concentraciones letal (CL 100), media letal (CL 50) y media efectiva (CE 50), obtenidos en cada uno de los tratamientos para juveniles <i>O. niloticus</i>	44

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto anestésico de los extractos acuosos de rizoma de *Dioscorea composita* “barbasco”, raíz de *Gliricidia sepium* “cacahuananche” y corteza de tallo de *Piscidia grandifolia* “mata piojos” en organismos de *O. niloticus* “Tilapia del Nilo”. Para ello se utilizaron 320 peces juveniles de la especie *Oreochromis niloticus*, con un peso promedio de 11 g. Los peces fueron colocados en acuarios de 10 L y llevados a 7 L de capacidad con el extracto acuoso respectivo de cada una de las plantas a evaluar y como anestésico control se usó el clorhidrato de lidocaína con la finalidad de observar los cambios fisiológicos de los peces en los tiempos de inducción, permanencia y recuperación propuestos por Brown en 1993. El método utilizado para encontrar la concentración media efectiva (CE50), concentración letal media (CL50), y concentración letal (CL100), fue usando cuatro lotes experimentales con 10 organismos de juveniles de tilapia cada uno, aireación y temperatura constante, vertiendo cada 5 minutos 1 ml de cada uno de los extractos acuosos hasta determinar cada una de estas concentraciones. Posteriormente se realizaron 3 ensayos más con su réplica de la concentración efectiva media (CE50) encontrada, para cada uno de los extractos acuosos. Los resultados en todos los casos para el período de “inducción” alcanzaron categoría 1' y 1" leve sedación y sedación profunda, el periodo de “permanencia” alcanzado fue de categoría 2',2'',3',3" leve narcosis, narcosis profunda, leve anestesia y anestesia quirúrgica y el tiempo de “recuperación” alcanzó un tiempo promedio de 3 minutos donde el pez nadó activamente y su comportamiento fue normal. La concentración efectiva desde el tiempo de inducción categoría 1` hasta el estado de anestesia quirúrgica 3`` para el “barbasco” fue 76 mg/L, para el “cacahuananche” 124 mg/L para el “mata piojos” 55 mg/L y para el clorhidrato de lidocaína 95mg/L. Todos los extractos mostraron efecto anestésico, resultando el extracto acuoso de mata piojos el más efectivo.

1. INTRODUCCION

1.1 Características de los anestésicos

En la acuicultura como en la investigación pesquera, los anestésicos son ampliamente utilizados para minimizar el estrés producido durante las manipulaciones que tienen lugar en la realización de diferentes tareas como: El registro de biometrías (peso, talla, estado de salud, etc.) (Bell, 1998; Iwama *et al.*, 1994); Pickering, 1993; Cho y Heath, 2000).

El estrés prolongado o severo puede ocasionar un incremento en la susceptibilidad a enfermedades, disminución del crecimiento y aumento en la mortalidad de los peces (Brown, 1993). Se ha demostrado que la anestesia reduce significativamente el estrés en la manipulación de los peces (Erikson *et al.*, 1997) por lo que el uso de los anestésicos ha permitido superar muchas de las dificultades asociadas al manejo de los organismos gracias a sus características depresoras del Sistema Nervioso Central (Farland y Klontz, 1999).

La anestesia es un estado biológico inducido por un agente externo que produce la pérdida de sensación parcial, total o pérdida del control neuromotor voluntario por medios químicos o no químicos (Summerfelt y Smith, 1990).

Múltiples factores influyen en la respuesta y aunque el grado de la misma puede ser interpretado como indicador de la magnitud del estrés, las respuestas en sus diferentes niveles dependen mucho de la capacidad de cada individuo o de una especie en particular (Pankhurst y Van Der Kraak, 2000).

Desde hace más de un siglo se han venido utilizando un gran número de productos químicos para anestésiar a los peces (Iwama y Ackerman, 1994).

Dentro de los compuestos más usados se encuentran el 2-fenoxietanol, sulfato de quinaldina, benzocaina, metasulfonato de tricaina (MS- 222) y la lidocaína, así como el bióxido de carbono, el alka seltzer, el bicarbonato y como una alternativa de origen botánico, el aceite de clavo de olor *Syzygium aromaticum*. Entre los métodos no químicos destaca el uso de descargas eléctricas (García-Gómez et al., 2002).

De manera global, el estado fisiológico inducido por los anestésicos suele incluir analgesia, pérdida del conocimiento, relajación muscular e inhibición sensorial y de reflejos autonómicos (Bertram, 2010).

En el caso de intervenciones quirúrgicas a los animales es esencial contar con una anestesia adecuada (Deppe, 1983). El anestésico usado debe producir una inmovilización conveniente para aplicar las técnicas quirúrgicas sin dolor, incomodidad y efectos colaterales no tóxicos para el animal y para el anestesista (Muir et al., 2008).

En los peces los compuestos anestésicos en su medio se absorben fundamentalmente a través de las branquias y parcialmente a nivel cutáneo (Siwicki, 1984). El signo diagnóstico visual más importante que muestra un pez anestesiado es la disminución de la frecuencia opercular, la cual va disminuyendo al incrementarse el tiempo y la magnitud de la anestesia (Farland y Klontz, 1999).

En anestesia superficial el pez presenta movimiento de sus aletas; en anestesia poco profunda el pez se mueve lentamente mientras que en anestesia profunda no hay respuesta fisiológica, ni movimiento corporal del pez (Smith y Bell, 1967).

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 (Tabla 1; Brown 1993).

Tabla1. Estados de anestesia propuestos por (Brown 1993).

Categoría	Estado	Respuesta
0	Normal	Nada activamente Reacciona a 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
4'	Colapso medular	Pérdida total de movimiento de las branquias, seguido en pocos minutos de paro cardíaco

La efectividad del anestésico, en este caso por vía absorción, depende del estado de salud de los peces ya que al tener mala condición o estar enfermos, requieren de una baja concentración de anestésico para alcanzar un determinado plano de sedación (Brown, 1993).

La eficacia anestésica de una sustancia se evalúa mediante ciertas etapas; inducción debe ser en un periodo inferior a tres minutos; tiempo de recuperación no mayor a cinco minutos; no tiene que ser tóxico para los peces ni para las personas que lo manipulan; no debe generar efectos fisiológicos prolongados ni residuales en los tejidos de los organismos; no debe ocasionar mortalidad en el período post-anestésico; debe poseer alta solubilidad y finalmente ser económicamente accesible (Gilderhus, 1990).

Sin embargo, algunos anestésicos son clasificados como tóxicos para varias especies acuáticas, lo que implica evaluar sus efectos antes de recomendar su uso como alternativa para reducir el estrés durante la manipulación (Davidson *et al.*, 2000)

El empleo de plantas para adormecer a los peces durante la pesca se considera como la técnica más productiva para algunas regiones como Chihuahua, Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca, etc. La mayoría de estas son envueltas en los sarapes de las personas se machacan con piedras y se extienden hasta la puesta de sol. En cuanto comienza a oscurecer, los hombres arrojan los fragmentos de estas plantas al agua que liberan una sustancia tóxica que se difunde y provoca que los peces que entran en

contacto con él salgan aturcidos a la superficie en un lapso relativamente breve, así pueden ser recogidos con facilidad (Andreas, 2004).

La aplicación de esta técnica se realiza cuando un grupo de personas se reúnen para pescar, una vez escogido un tramo de río se eligen dos líderes, cada uno de los cuales está a cargo de una de las orillas. Luego los participantes hacen un semicírculo de piedras para detener a los peces que flotan adormecidos en la corriente (Andreas, 2004).

El uso tradicional de compuestos anestésicos vegetales en actividades pesqueras es una práctica común en diversas regiones del mundo. En la Amazonía, hojas, tallos, raíces o frutos de plantas de determinadas familias se maceran y se arrojan a los ríos y arroyos para liberar sus sustancias tóxicas y con ello ocasionar el aturdimiento o la muerte de los peces; En Venezuela y Ecuador el “barbasco” o “embarbasco” es una práctica común entre muchas etnias indígenas y continúa siéndolo hasta la fecha entre los yanomamis y los piaroas; La pesca con “barbasco” es una actividad tradicional importante para los grupos étnicos ya que además refleja sus costumbres, divisiones sociales y el conocimiento que tienen de su entorno. Así, la planta que usan para preparar el “barbasco” puede variar dependiendo del río o la especie a pescar ya que diferentes plantas tienen diferente nivel de eficacia, al igual que las diferentes partes de la planta (L. de la Torre, et. al 2008).

Por otra parte el uso de aceites esenciales extraídos de plantas ha demostrado ser una alternativa viable a los anestésicos químicos.

El aceite de clavo de olor ha sido considerado un anestésico apropiado para los peces debido a su bajo costo, su eficiencia anestésica y su accesibilidad. Su principio activo es el eugenol que actúa como anestésico a una concentración entre el 70 y el 90%; además, no se reportan efectos tóxicos en los peces por su aplicación (Ross y Ross, 2008).

El aceite de clavo se ha utilizado ampliamente en varias especies de peces y los resultados muestran que la sustancia es una buena alternativa económica a los productos químicos normalmente utilizados en la anestesia de peces (Ross y Ross, 2008).

En una revisión global de plantas usadas por sus efectos ictiotóxicos se registraron 935 especies, siendo Fabaceae, Sapindaceae y Euphorbiaceae las familias más importantes con el 25, 12 y 10% de las especies, respectivamente (Acevedo-Rodríguez, 1990).

En la familia Fabaceae, las sustancias activas principales son la rotenona y sus derivados las cuales interfieren con la respiración celular a nivel mitocondrial. Las sustancias activas más importantes de las familias Sapindaceae y Euphorbiaceae son las saponinas las cuales bloquean la respiración a nivel branquial. Además, algunas plantas ictiotóxicas tienen a menudo otras aplicaciones, como insecticidas o medicinales (Acevedo-Rodríguez, 1990).

Es por ello que se plantea en este trabajo evaluar el efecto de los extractos acuosos del rizoma de barbasco *Dioscorea composita*, de la raíz de cacahuananche *Gliricidia sepium*, y de la corteza del mata piojos *Piscidia grandifolia* en los juveniles de Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), como uso anestésico, ya que en la actualidad se siguen usando para la pesca en cada una de las localidades de colecta, encontrando su función como anestésico en los peces, sin embargo las concentraciones para su uso potencial en acuicultura aun no son claras y se pretende con este trabajo conocer las concentraciones (CE50), (CL100) Y (CL50) para juveniles de *O. niloticus*.

1.2 Características de la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es el pez cíclido más comúnmente cultivado en el mundo (FAO, 2007). Los cíclidos se reconocen por presentar una fosa nasal a cada lado de la cabeza, así como por su línea lateral en dos secciones, son esencialmente dulceacuícolas y se distribuyen ampliamente en diversas regiones de África, sur de la India, Madagascar, Sri Lanka, Siria, las Indias Occidentales, Sur y Centroamérica (Bardach, 1982).

Si bien la familia Cichlidae se clasifica como un grupo dulceacuícola, *O. niloticus* puede vivir, crecer y reproducirse a una salinidad de 24 ppm. El cuerpo es generalmente comprimido y discoidal, raramente alargado. La boca es generalmente ancha y bordeada por labios gruesos; las mandíbulas presentan dientes cónicos y en algunas ocasiones incisivos.

Para su locomoción poseen aletas pares e impares. Las aletas pares las constituyen las pectorales y las ventrales; las impares están constituidas por las aletas dorsales, la caudal y la anal. La parte anterior de la aleta dorsal y anal es corta, consta de varias espinas y la parte terminal de radios suaves, disponiendo sus aletas dorsales en forma de cresta. La aleta caudal es redonda y le sirve para mantener el equilibrio del cuerpo durante la natación (Saavedra, 2006) (Figura 1).



Figura 1. Tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*.

Acuario Facultad de Ciencias, UNAM.

Su registro fósil data del Eoceno u Oligoceno en África y Sudamérica (Abdel Fattah, 2006). Varias especies del género de cíclidos africanos Tilapia se han introducido en Norte y Centroamérica como fuente alimentaria y para el control de vegetación acuática. Su incorporación a sistemas de producción acuícola comenzó entre los años de 1950 y 1960 en diferentes lugares del mundo (Fitzsimmons, 1997).

En México fueron introducidas en el año 1964, procedentes de Alabama E.U y fueron llevadas al Centro Acuícola de Temascal en el estado de Oaxaca; las especies fueron *Tilapia melanopleura*, *Tilapia nilotica* y *Tilapia mossambica* (Tenorio- Colín, 2003).

En las últimas dos décadas, la tilapia ha sido una de las especies líderes en la acuicultura mundial bajo sistemas muy variables de producción que van desde extensivos hasta súper intensivos, de pequeña y gran escala (Lazard, 1997) y se les encuentra habitando principalmente aguas lénticas. Son especies aptas para el cultivo en zonas tropicales y subtropicales de México. Son especies euritermas, siendo sus límites de tolerancia de 12°C a 42°C (Alamilla, 2001).

La temperatura ideal para su cultivo fluctúa alrededor de los 25°C, aunque logran reproducirse a los 18°C. La tilapia se ha distribuido en una gran cantidad de cuerpos de agua continentales, representando así un recurso más en las actividades piscícolas de México. La reproducción de *O. niloticus* empieza cuando el macho establece un territorio, excava un nido a manera de cráter atrayendo a la hembra para ser cortejada. La fecundación es externa; la hembra desova en el nido cuyos huevos son inmediatamente fertilizados por el macho. El número de huevos es proporcional al peso del cuerpo de la hembra. La hembra recoge los huevos fertilizados en su boca para incubarlos y protege a las larvas hasta que se absorbe el saco vitelino. El macho permanece en su territorio, cuidando el nido y puede fertilizar los huevos de varias hembras; así mismo las hembras pueden desovar continuamente.

Mientras la hembra está encubando no se alimenta. La incubación de los embriones se lleva a cabo en un periodo de una a dos semanas y su desarrollo depende directamente de la temperatura. Cuando eclosionan las larvas, éstas pueden volver a entrar a la boca si les amenaza algún peligro. La “Tilapia del Nilo” tiene una longevidad de 10 años (Saavedra, 2003).

Los cíclidos tienen hábitos alimenticios muy variados (omnívoros y herbívoros); en condiciones naturales generalmente se alimentan de pequeños crustáceos, algas y pequeños peces. El género *Oreochromis* se clasifica como omnívoro por presentar mayor diversidad en los alimentos que ingiere, variando desde vegetación macroscópica hasta algas unicelulares, tendiendo hacia el consumo de zooplancton. En cautiverio es muy recomendable optar por una alimentación artificial con subproductos de la agricultura (estiércol de bovinos, porcinos y aves), hojas (yuca), vegetales (papa, repollo) y básicos (maíz y soya) así como alimentos concentrados. El uso de estos productos como alimento para las tilapias permite reducir el tiempo de producción y cosecha en sistemas extensivos o de subsistencia (Tenorio-Colín, 2003).

La tilapia es considerada como uno de los organismos más apropiados para la piscicultura debido a diversas características como son su rápido crecimiento, resistencia a enfermedades, elevada producción, tolerancia para desarrollarse en condiciones de alta densidad, capacidad para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno y a diferentes salinidades, así como habilidad de nutrirse de una amplia variedad de alimentos naturales y artificiales. Además, presenta una versatilidad culinaria, de carne blanca y firme

y cocinado rápido; se reporta que cada 100 g de músculo contiene 20 g de proteína, 1.29 g de lípidos y 172 calorías, siendo de gran calidad nutricional (Arredondo et al., 1994).

Las especies del género *Oreochromis* son las de mayor aceptación en cultivos comerciales destacándose entre ellas *O. niloticus* (“tilapia del Nilo”) junto con *O. aureus* (“tilapia azul”) y *Oreochromis sp* o (“tilapia roja”). Estas especies son introducidas para su cultivo en etapas larvarias y juveniles en granjas piscícolas y alcanzan su pronta madurez sexual a los 2 o 3 meses de edad (Tenorio-Colín, 2003).

Una de las actividades más importantes es el cultivo de especie su transporte y traslado en las etapas tempranas para su “siembra” en los estanques la cual se realiza en bolsas de polietileno selladas con atmósfera saturada de oxígeno y en horas tempranas para evitar que la siembra se realice bajo altas temperaturas (Fitzsimmons, 1997). La cantidad de alevines por bolsa depende del tamaño de los mismos y de la hora de transporte. Si éste es mayor a 8 h se recomienda bajar la temperatura para reducir su metabolismo, reducir el estrés y lograr una mayor sobrevivencia (Fitzsimmons, 1997).

1.3 Características de “*Dioscorea composita Helms*” *Dioscoreaceae* (Tellez Valdez Oswaldo, 2007).

El “barbasco” pertenece a la familia Dioscoreaceae con 670 especies a nivel mundial, de las que se registran entre 65 y 70 para México (Figura 2). Se distribuye en clima cálido desde el nivel del mar, hasta los 1500 msnm. El barbasco se encuentra asociado a bosque tropical caducifolio, subperennifolio y perennifolio en los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Tabasco (Hinke, 2008).

El rizoma de *D. composita* contiene grandes concentraciones de saponinas esteroídicas, de ellas se extrae la diosgenina por hidrólisis. La diosgenina es una sapogenina cuyo nombre fue dado por Tsukamoto y Ueno en 1936, con una enorme importancia en la industria farmacéutica por su función como precursor en la síntesis de fármacos esteroideos, que se utilizan como anticonceptivos (Waizel-Bucay, 2009). Las sapogeninas son esteroides glicosilados solubles en agua y fácilmente de extraer por medio de alcohol o agua (Marcano y Hasegawa, 1991).

Durante la década de los años 1930 las propiedades y estructura de las hormonas esteroideas, fueron determinadas en las compañías farmacéuticas de Europa y Estados Unidos, para producir síntesis de las hormonas sexuales (progesterona y estrógenos) con el objetivo de obtener un control de natalidad, de esta manera las agencias internacionales y las industrias farmacéuticas se dedicaron a buscar una fuente natural y útil para la producción de hormonas esteroideas (Bustamante, 2009).

En esos años en Estados Unidos el profesor Russell E. Marker, realizó una búsqueda de una fuente vegetal, para la obtención de hormonas y las encontró en las sapogeninas de una planta mexicana, llamada “zarzaparrilla” observó que era muy poca la cantidad que contenía esa planta, así que buscó vegetales semejantes y encontró en las selvas de Veracruz la llamada “cabeza de negro o barbasco” que producía grandes cantidades de un compuesto esteroide, la diosgenina y logró transformarla en progesterona.

Posteriormente encontró que la especie *D. composita* contenía diez veces más concentración de diosgenina y que su ciclo biológico es de tres años a comparación de *D. bartlettii* que dura veinte, estas características hicieron más redituable y de mayor importancia a *D. composita* y la demanda de esta se convirtió en una fuente importante de ingresos para el país (Hinke, 2008).

Por otra parte el rizoma de *D. composita* es también usado por muchos grupos étnicos en toda América Central para “embarbasco” el agua y pescar a los peces sin consecuencias tóxicas para los humanos (Gerald, 2009).

Esta práctica de pesca se reporta en varios países como Venezuela, Ecuador, el Amazonas y México. Sin embargo la forma de aplicación del “barbasco” varía dependiendo de la región y país; en Venezuela se machaca el rizoma con un palo o piedra sobre el mismo cuerpo de agua y se recolectan los peces con canastos o “chinchorros” (Rendón, et. al 2002).

En México, fuentes tradicionales reportan que los pescadores del estado de Oaxaca en el poblado de Loma Bonita, rebanaban el rizoma de “barbasco” lo ponían al sol en sus zarapes durante el día y por la tarde lo frotaban dentro del cuerpo de agua, previamente cercado con piedras en ambos extremos a lo largo de un tramo de río y en poco tiempo los peces empezaban a flotar; posteriormente se procedía a seleccionar a los peces más grandes para consumo humano y los demás se recuperaban en poco tiempo sin afectar a los peces más pequeños ni a los huevos (Rendón, et. al 2002). Ello tiene relación con la presencia de componentes esteroidales de acción antiinflamatoria y anestésica (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, 1981).



Figura 2. Rizoma de “barbasco” *Dioscorea composita*
Colectada en la localidad el Cerro del Campanario, Veracruz.

1.4 Características de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. (1842)

La *Gliricidia sepium* (Jacq. Kunth ex Walp. 1842) es un árbol de la subfamilia *Papilionoidae*, leguminosa que llega a medir 12 m de altura y habita en zonas de climas cálido, semicálido y templado con altitudes menores a los 1600 msnm; se distribuye en México, América Central y parte norte de Sudamérica. En México existen de 6 a 9 especies y se le conoce como “Cacahuanano”, “Cocuite” en el estado de Oaxaca, “Cacahuananche” en el estado de Michoacán, Guerrero, Sinaloa y Nayarit, “Cocoite” ó “Chanté” y “Mata ratón” (Simons y Stewart, 1994) (Figura 3).

El “cacahuananche” *Gliricidia sepium* es utilizado desde la época prehispánica; se usa como combustible para producir leña de excelente calidad y sus flores son comestibles. Actualmente es estudiada en varios países con miras a su producción como forraje y abono verde (Hughes, 2001).

En América Central lo usan como sombra para café y cacao; durante la época de secas al caer sus hojas estas mejoran y fertilizan el suelo pues se descomponen rápidamente y tienen un alto contenido de nitrógeno y otros nutrientes (Stewart et. al., 1996).

En la medicina tradicional se considera útil para el tratamiento de diversas enfermedades, infecciones de la piel (hongos, ectoparásitos y piojos), calvicie y enfermedades gastrointestinales, además de atribuirse efectos antiinflamatorios y anestésicos (Guardia, 2003).

Estudios sobre *G. sepium* han reportado la presencia de taninos en raíz, tallo y hojas los cuales influyen en los animales principalmente roedores, causando alteraciones fisiológicas y en algunos casos efectos tóxicos (Redd, 1995).

Es por ello que será probado en los juveniles de tilapia *O. niloticus* para evaluar su efecto anestésico.



Figura 3. Raíz de “cacahuananche” *Gliricidia sepium*

Colectada en la localidad el Cerro del Campanario, Veracruz.

1.5 Características de *Piscidia grandifolia* (Donn. Sm.) I.M. Johnston var. *glabrescens*

Piscidia grandifolia o también llamado “mata piojos” es un árbol que alcanza hasta 20m de altura; nativa del Sur de Florida, México, Guatemala y Honduras, se distribuye hasta el Norte de América del Sur. La corteza seca especialmente de la raíz tiene un olor desagradable similar a la del opio y causa sensación de fuego en la boca. Esta ha sido usada como remedio para el dolor de muelas. La corteza contienen alcaloides, glucósidos cardiotónicos,

sesquiterpenlactonas, taninos y triterpenos. A nivel popular la corteza de la especie se usa como desinflamatorio, narcótico y calmante (De Mena, 1994).

Algunos campesinos emplean la corteza como abortivo en humanos y ganado vacuno, además de su uso para la captura de peces (Williams, 1981). La corteza de *Piscidia grandifolia* contiene varias sustancias, una de las principales y usadas para la captura de peces es la piscidina, que en México se usa como narcótico y analgésico. También se usa el extracto acuoso en aplicaciones locales para aliviar el dolor de muelas (Zamorano, 2003) (Figura 4).



Figura 4. Corteza de tallo de mata piojos *Piscidia grandifolia*

Colectada en la localidad de Xochipala Guerrero.

La madera es dura y durable en el agua; se usa en la construcción, fabricación de muebles y embarcaciones, mangos de herramientas, leña, carbón, para durmientes de ferrocarril y en la decoración de interiores, además de tener una durabilidad natural de más de un siglo sin tratamiento alguno (Cáceres, 1999).

Los principios activos se sintetizan en determinados momentos del ciclo de vida de la planta y pueden ser afectados por factores bióticos y abióticos que pueden modificar la concentración y actividad de los metabolitos secundarios como la estacionalidad, hora del día, edad, morfología y características ambientales. Los factores físico-químicos como la humedad, la temperatura, el fotoperiodo y la intensidad lumínica, también son determinantes en la concentración de los metabolitos secundarios y por ende en la concentración de los componentes activos (Danna, 2006).

2 JUSTIFICACION

En la acuicultura existe un considerable número de sustancias químicas usadas como anestésicos en peces, la mayoría de estos son de alto costo y acarrear algunos efectos secundarios como bajo peso y falta de apetito durante el desarrollo del pez (Guzmán, 2010). Algunos de estos son metanosulfonato de tricaina MS-222, el hidrócloro de benzocaína, la lidocaína, la benzocaína, la quinaldina, etc. Estos son importantes para el manejo y toma de biometrías (talla y peso), sexado, transporte, muestreos, cirugía, inducción hormonal, despesque, etc. (Alderman, 1999).

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.& Perry), cuyo principal ingrediente activo es el eugenol (70-90 % del total). Desde hace más de veinticinco años se conoce su efectividad como anestésico para peces de agua dulce (A. Garcia et. Al 2002).

Fuentes tradicionales han reportado el uso de hojas, raíces, tallos y frutos de plantas de determinadas familias, las cuales se maceran y arrojan a los ríos para pescar. En este trabajo se evaluó el efecto anestésico de los extractos acuosos del rizoma de *Dioscorea composita* “barbasco”, la raíz de *Gliricidia sepium* “cacahuananche” y la corteza de tallo de *Piscidia grandifolia* “mata piojos”, en los juveniles de *Oreochromis niloticus* “tilapia del Nilo”, con el fin de implementar técnicas de anestesia de origen natural, a bajo costo y de uso tradicional, pudiendo ser rentable y efectivo para los acuicultores en el manejo de los peces.

3 HIPÓTESIS

Si el rizoma de “barbasco”, la corteza de “mata piojos” y la raíz de “cacahuananche” han sido empleadas, según fuentes tradicionales en ríos para pescar peces y permitir su fácil captura, entonces se espera que con los extractos acuosos de estos, se obtenga una respuesta anestésica.

Estas plantas se arrojan en grandes cuerpos de agua como ríos y lagunas lo que representa condiciones diferentes a las controladas en el laboratorio, por lo que puede esperarse un mayor potencial de efectividad anestésica para cada uno de los juveniles de *O. niloticus*.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto anestésico de cada uno de los extractos acuosos del rizoma de “barbasco”, raíz de “cacahuananche” y corteza de tallo del “mata piojos” en juveniles de *Oreochromis niloticus*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la concentración letal (CL100), la concentración letal media (CL50) y la concentración media efectiva (CE50) de cada uno de los extractos acuosos de rizoma de “barbasco”, raíz de “cacahuananche” y corteza de tallo del “mata piojos” en juveniles de *O. niloticus*.
2. Valorar el efecto anestésico de los extractos acuosos en los juveniles de tilapia *O. niloticus*, a través de la caracterización de los diferentes estados de anestesia (propuestas por Brown, 1993) y de la determinación de las correspondientes concentraciones efectivas medias.
3. Valorar la fase de “permanencia anestésica” en los juveniles de tilapia *O. niloticus* a través de la aplicación de técnicas de manejo.

5 Materiales y Métodos

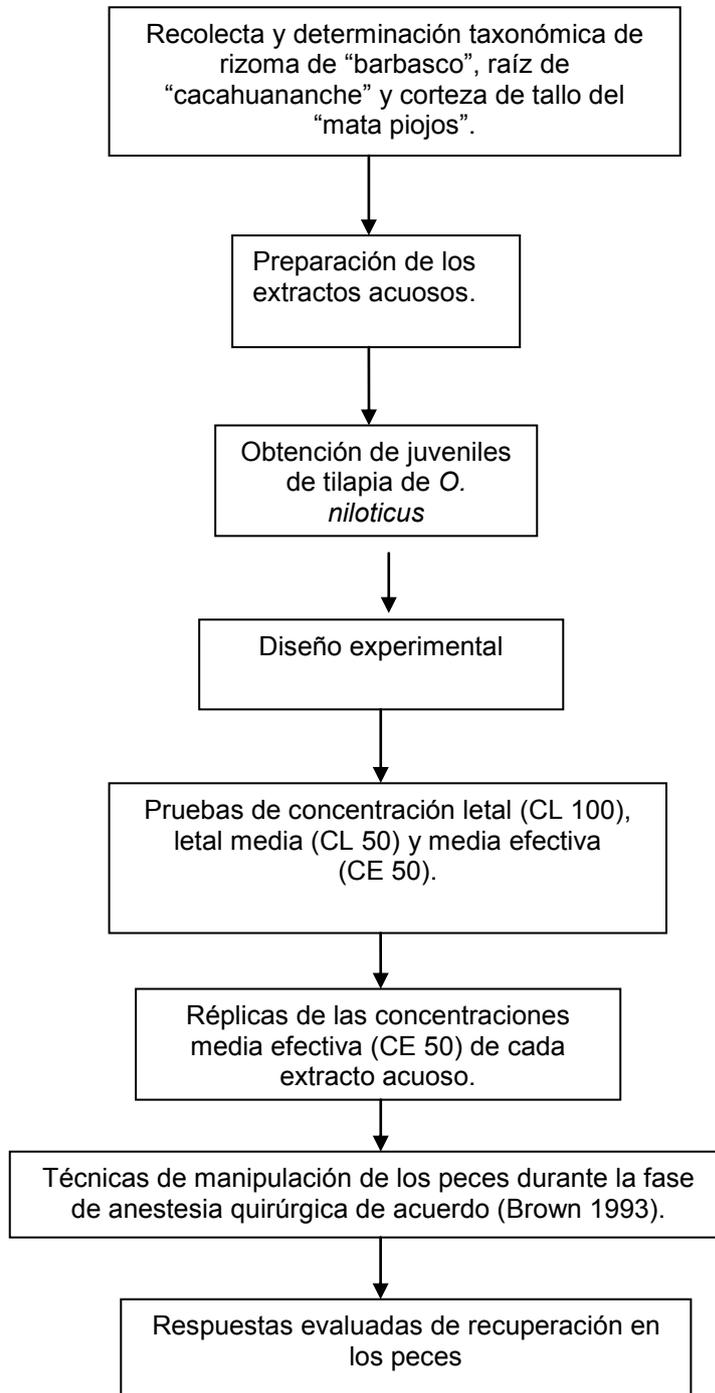


Figura 5. Diagrama de flujo

5.1 Recolecta y determinación taxonómica

Del rizoma de “barbasco”, raíz de “cacahuananche” y corteza de tallo del “mata piojos” las primeras dos se recolectaron en el estado de Veracruz por el M. en C. Ignacio Andrés Morales Salas en la localidad del cerro del campanario y ésta última en el estado de Guerrero en la localidad de Xochipala por el M. en C. Armando Gómez Campos ambos de la Facultad de Ciencias UNAM contando con su colaboración para la identificación de las especies de cada una de las plantas mencionadas, además de la revisión bibliográfica consultada en dicho trabajo, donde se recaba información de algunos de sus usos.

Todas ellas fueron colocadas en una prensa construida con madera, cartón y papel periódico para su traslado al acuario de la Facultad de Ciencias UNAM donde fueron puestas a secar en una estufa modelo BLUEM a una temperatura de 60°C, por un tiempo de 72hr. Una vez seco el rizoma de “barbasco”, la raíz de “cacahuananche” y el tallo de “mata piojos” se trituraron con un molino de mano convencional, hasta obtener el polvo de cada una de ellas.

5.2 Preparación de los extractos acuosos: De acuerdo a la información recabada en la recolecta, los pobladores utilizan un tanto del tallo de “mata piojos” el cual fue puesto en una bolsa de papel en el campo para tomarlo como medida para los experimentos; cada una de las plantas fueron pesadas en el acuario de la Facultad de Ciencias UNAM en una báscula digital modelo *Sartorius* con capacidad de 100g y se encontró en el caso del “mata piojos” que usan 25g de peso seco este fue molido hasta polvo y disuelto en 1L de agua y se nombró nuestra solución stock;

Por otra parte el rizoma del “barbasco” y la raíz de “cacahuananche” los pobladores mencionan que los usan dependiendo de la cobertura del cuerpo de agua que se requiere cubrir, así que se tomó la misma medida de los 25g de peso seco disueltos en 1L de agua como en el caso del tallo del “mata piojos”. El trabajo de laboratorio consistió en pesar los 25g de cada una de las plantas previamente deshidratadas y molidas hasta polvo y puestas cada una en un matraz Erlenmeyer agregando agua destilada hasta llevar el volumen a 1L tomando en cuenta el 100% de concentración como solución stock, se agito con una varilla de vidrio hasta disolver el polvo en el agua durante varios minutos, una vez disuelto se tapó, etiqueto y se mantuvieron en reposo por 72h en refrigeración con el fin de obtener un concentrado, se filtró con malla de 80 micras 2 veces y quedó listo para ser utilizado.

5.3 La obtención de juveniles de tilapia de *O. niloticus* fue realizada en el Centro Acuícola de Zacatepec Morelos, empleándose 320 ejemplares en este trabajo, con una edad de 1 mes y medio y peso promedio de 11 g peso húmedo (PH). Los peces fueron transportados al acuario de la Facultad de Ciencias UNAM en bolsas de plástico con atmósfera saturada de oxígeno. A su llegada se tenía preparado un acuario de 200L con agua, aireación y temperatura constante de 27°C donde permanecieron 1 semana; fueron alimentados 2 veces al día ad limitum con hojuela comercial Wardley y se realizó diariamente limpieza con un sifón para extraer las heces, además del recambio de agua del 25% manteniendo el acuario en buenas condiciones para los peces durante el desarrollo de este trabajo.

5.4 Diseño experimental

5.4.1. Determinación de la concentración letal (CL 100), concentración letal media (CL 50) y concentración media efectiva (CE 50) de los juveniles de tilapia *O. niloticus*.

Se define como la concentración letal (CL 100) a la concentración que causa la muerte en un 100% de los organismos o especies bajo prueba; La concentración letal media (CL 50) se define como la concentración en la que se puede pronosticar, la muerte de un 50% de una población dada de organismos bajo un conjunto definido en condiciones experimentales; La concentración media efectiva (CE 50) es la concentración que causará efecto no letal definido, de un 50% de una población de organismos bajo condiciones definidas.

En este primer experimento se colocaron 4 acuarios de 10L de capacidad, llevados a 7L de agua con aireación y temperatura constante de 27°C, se introdujeron 10 peces en cada uno de ellos para encontrar la concentración letal (CL 100) de los extractos acuosos de “barbasco”, “cacahuananche”, “mata piojos” y el Clorhidrato de lidocaína, este último tomado como anestésico control para comparar el comportamiento fisiológico de los peces, a la exposición de los extractos acuosos de las plantas;

Se fue vertiendo 1 ml de extracto acuoso cada 5 minutos en cada uno de los acuarios experimentales, hasta llegar al estado de colapso medular 4' que implica la pérdida total de movimiento de las branquias, seguido de paro cardiaco según (Brown 1993) realizándose las observaciones de cada uno de

los estadios y tomando el tiempo de inducción, permanencia y muerte (Figura 6).



Figura 6. Pruebas de concentración letal (CL 100) para los juveniles de tilapia *O. niloticus*

Tomando en cuenta la concentración letal (CL 100) encontrada para cada uno de los extractos y el Clorhidrato de lidocaína, así como las características de comportamiento de cada uno de los estados de anestesia y los tiempos de inducción, permanencia y muerte.

Se colocaron 4 acuarios y su réplica de 10L de capacidad, llevados a 7L de agua con aireación y temperatura constante de 27°C, se introdujeron 10 peces en cada uno de los acuarios, para obtener la concentración media efectiva (CE 50) y la concentración media letal (CL 50) de cada uno de los extractos y el Clorhidrato de lidocaína, vertiendo 5ml de extracto acuoso cada 5 minutos y observando los estados de anestesia por los que pasan los peces de

acuerdo (Brown en 1993) y midiendo los tiempos de cada fase de inducción, permanencia y recuperación con cronómetro en mano.

La recuperación de los juveniles de *O. niloticus* se evaluó en acuarios libres de anestésico, en relación al número de acuarios experimentales con capacidad de 10L y llenados a un volumen de 7L con aireación y temperatura constante de 27°C para realizar las observaciones y tomar el tiempo de recuperación que consistió en el nado y movimiento de opérculo normal durante los primeros 5 minutos (Figura 7).

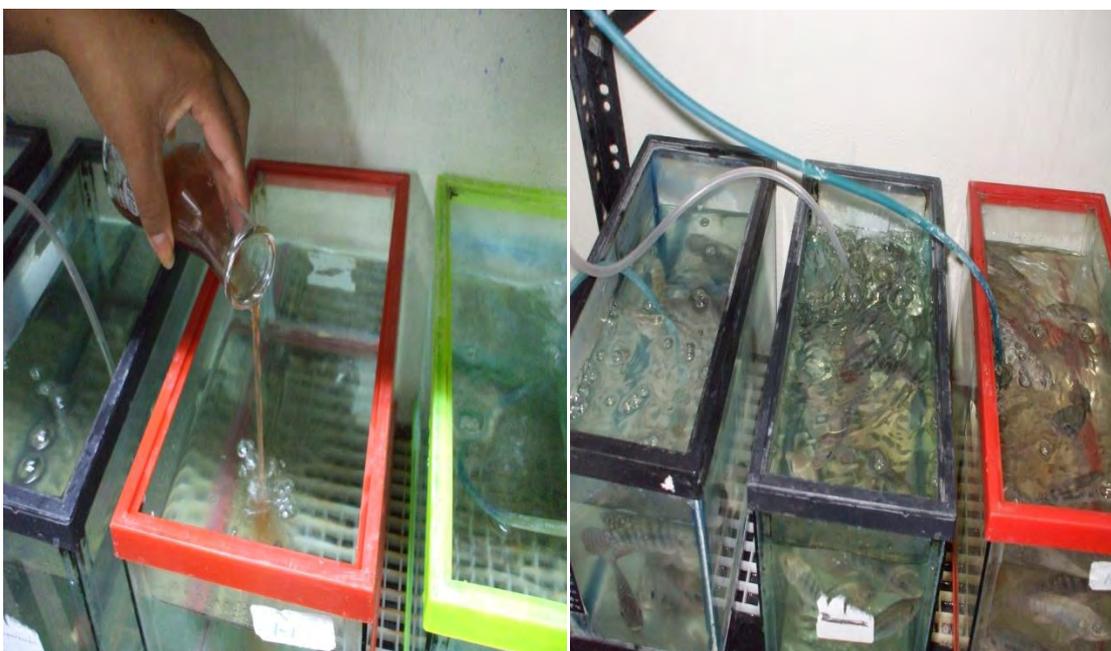


Figura 7. Pruebas de concentración media efectiva (CE 50) y la concentración media letal (CL 50) para los juveniles de *O. niloticus*.

1. Se mantuvieron 8 acuarios libres de anestésico preparados para la recuperación de los juveniles de *O. niloticus* con temperatura 27°C y aireación constante.

5.4.2. Exposición a la concentración encontrada media efectiva (CE 50) de cada uno de los extractos acuosos y el Clorhidrato de lidocaína.

Una vez encontrada la concentración media efectiva (CE 50) se vertió el total de mililitros usados por acuario, en matraces individuales Erlenmeyer, para revalorar la efectividad de cada uno de los extractos acuosos y el Clorhidrato de lidocaína; Colocando 5 acuarios experimentales por cada uno y tomando en cuenta las mismas características de temperatura, aireación y el número de organismos, se vertió el concentrado total en cada uno de los acuarios y se observaron cada una las fases de anestesia, además de medir el tiempo de inducción, permanencia y recuperación (Figura 8).

Los acuarios de recuperación se encontraban en relación al número de los acuarios experimentales con las mismas características físico-químicas pero con agua libre de anestésico para realizar las observaciones.



Figura 8. Acuarios experimentales con las concentraciones medias efectivas (CE 50) en juveniles de tilapia *O. niloticus*.

5.4.3 Técnicas de manipulación

Se realizaron, con el propósito de evaluar el tiempo de permanencia en la manipulación física de los juveniles de *O. niloticus* con las concentraciones medias efectivas (CE 50) y bajo el estado 3^o de anestesia quirúrgica de acuerdo a (Brown en 1993); Sacando a los peces de sus acuarios, una vez finalizado el tiempo de inducción, fueron pesados (g, PH), medidos (longitud patrón en cm) que va desde el final de la mandíbula superior de la boca del pez, hasta el comienzo de la aleta caudal y (longitud total en cm) que va desde el final de la mandíbula superior de la boca hasta el final de la aleta caudal, con un vernier (Figura 9 y 10).

Se revisó el estado de salud externa es decir, si tenían alguna irritación en la piel a causa de los extractos y el sexado se llevó a cabo colocando azul de metileno y tiñendo la papila genital de los organismos, identificando a los machos por la presencia del poro urogenital en la papila y a las hembras por el oviducto (Figura 11 y 12).



Figura 9. Longitud patrón (cm)



Figura 10. Longitud total (cm)

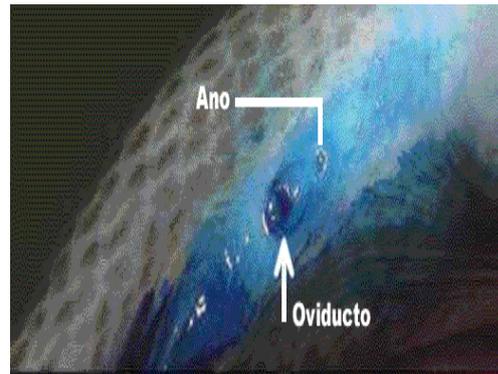
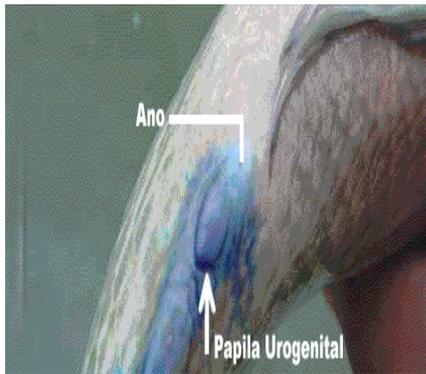


Figura 11. Papila urogenital de macho Figura 12. Oviducto de hembra

5.4.4 Evaluación de la recuperación a corto plazo en los juveniles de *Tilapia O. niloticus*

Se mantuvieron durante cuatro meses en observación con aireación y temperatura de 27°C constante, alimentados 2 veces al día con hojuela Wardley *ad limitum* en un acuario de 200L de agua con una densidad de 200 organismos usados en los experimentos de la concentración media efectiva (CE 50), se realizaron recambios y sifonado de heces diariamente. Todos los días se evaluó comportamiento, nado, estado de salud externo como hongos, irritaciones, golpes, etc. movimiento de opérculo normal, contracción muscular, falta de apetito y muerte.

6 .RESULTADOS

El promedio total de peso húmedo de los juveniles de tilapia de *O.niloticus* fue de 11g al llegar al acuario de la Facultad de Ciencias.

Se puede observar que no existe alguna diferencia significativa en cuanto al peso húmedo, por lo que fue proporcional la cantidad de extracto acuoso que requirieron cada uno de los organismos en su momento (Figura 13).

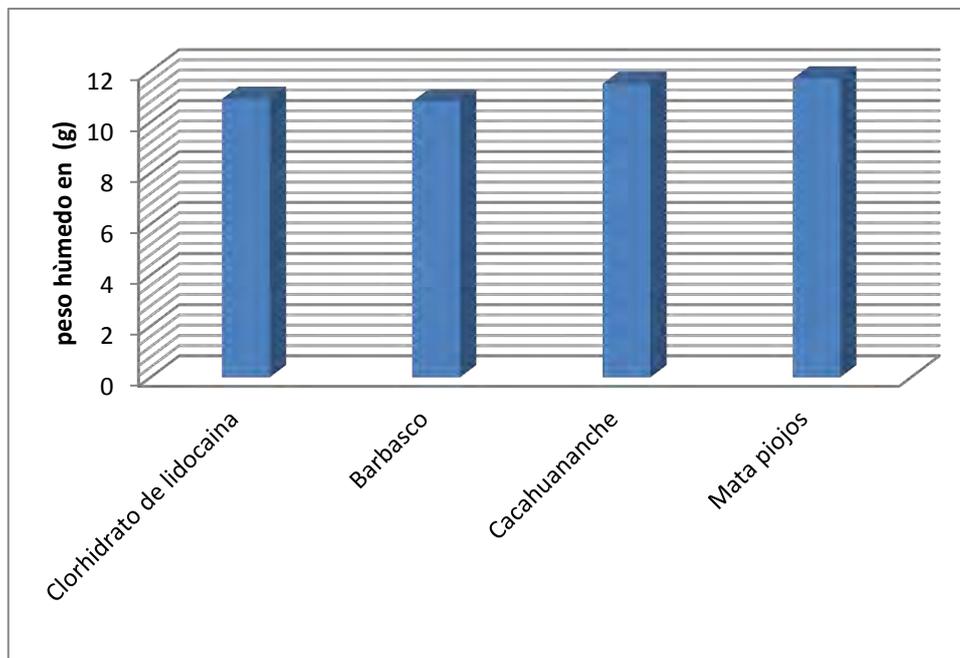


Figura 13. Promedio del peso húmedo de los juveniles de tilapia al llegar al Acuario de la Facultad de Ciencias UNAM.

El promedio de tallas de la longitud patrón fue de 6.61cm y de longitud total 8.42cm indicando una relación de crecimiento sin interferencias significativas durante dicho trabajo (Figura 14).

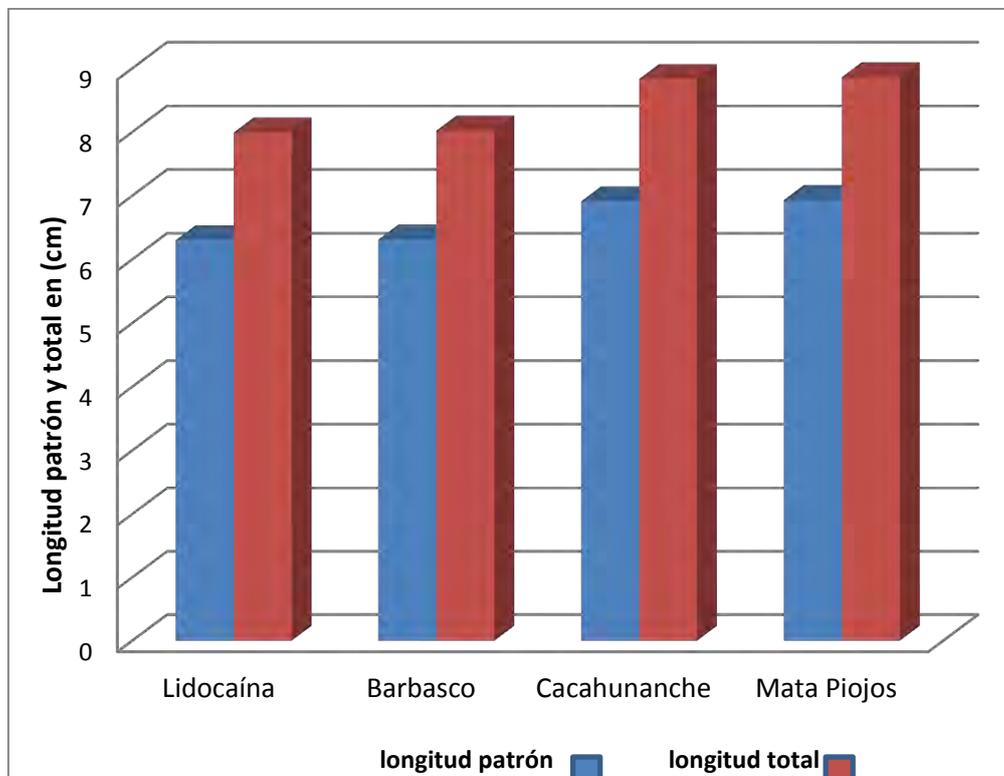


Figura 14. Promedio de tallas de longitud patrón y total de juveniles de tilapia *O. niloticus*

6.1 Concentración letal (CL 100) del clorhidrato de lidocaína, “barbasco”, “cacahuananche” y “mata piojos”.

La concentración letal (CL 100) de cada uno de los extractos acuosos y el clorhidrato de lidocaína para juveniles de tilapia *O.niloticus* se determinó en un primer experimento descrito en la parte de materiales y métodos, agregando cada 5 minutos 1 ml de la solución stock, en cada uno de los acuarios.

Durante la fase de inducción, en los 4 casos se alcanzó el nivel de leve sedación 1' donde continua nadando voluntariamente con ligera pérdida de respuesta a estímulos externos; Sedación profunda 1'' donde se detiene la natación voluntaria y pierde la respuesta a estímulos externos.

El estado de permanencia mostró las fases de 2' leve-narcosis donde los peces perdieron el equilibrio y mostraron una respuesta débil a cambios de posición, 2''narcosis profunda en esta fase cesa la respuesta a cambios de posición, baja la frecuencia del movimiento opercular y existe una pérdida total del equilibrio, 3' leve anestesia en esta fase el pez es maniobrable y 3'' anestesia quirúrgica el pez muestra completa ausencia de respuesta a estímulos y el movimiento opercular disminuye siendo plenamente maniobrable.

Finalmente se llegó al estado 4' de Colapso medular, donde ocurre la pérdida total de movimiento de las branquias y cae en paro cardíaco (muerte).

Los tiempos y las concentraciones letales de cada uno de los extractos acuosos y el clorhidrato de lidocaína fueron los siguientes (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo y concentraciones letales para juveniles de *O. niloticus*.

Anestésico	Tiempo letal (minutos)	Concentración letal (CL 100) mg/L	Estado	Respuesta
Clorhidrato de lidocaína	39 min	220 mg/L	Colapso Medular 4'	Pérdida total de movimiento de las branquias, seguido en pocos minutos de paro cardiaco
“barbasco”	35 min	456 mg/L	Colapso Medular 4'	Pérdida total de movimiento de las branquias, seguido en pocos minutos de paro cardiaco
“cacahuananche”	32 min	620 mg/L	Colapso Medular 4'	Pérdida total de movimiento de las branquias, seguido en pocos minutos de paro cardiaco
“mata piojos”	43 min	165 mg/L	Colapso Medular 4'	Pérdida total de movimiento de las branquias, seguido en pocos minutos de paro cardiaco

6.2 Concentración media efectiva (CE 50) y media letal (CL 50) del clorhidrato de lidocaína, “barbasco”, “cacahuananche” y “mata piojos”.

La concentración media efectiva (CE 50) y media letal (CL 50) para juveniles de tilapia *O. niloticus* se determinó en un segundo experimento, agregando 5 ml de la solución stock de cada extracto cada 5 minutos en los acuarios correspondientes y observando las características fisiológicas de los peces, durante cada estado de anestesia propuesto por (Brown en 1993) y tomando los tiempos de inducción, permanencia y recuperación; los resultados para la concentración media letal (CL 50) se muestran en la (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempos y concentraciones media letal (CL 50) encontradas para los juveniles de tilapia *O. niloticus* con cada uno de los extractos acuosos y el clorhidrato de lidocaína.

Anestésico	Inducción (minutos)	Permanencia (minutos)	Recuperación (minutos)	Concentración letal media (CL 50)	Estado
Clorhidrato de lidocaína	0.36 min	22 min	2 min	170 mg / L	Inducción 1', 1'' Permanencia 2', 2'', 3', 3''
“barbasco”	1.53 min	17.33 min	4 min	152 mg / L	Inducción 1', 1'' Permanencia 2', 2'', 3', 3''
“cacahuanan -che”	0.50 min	19.66 min	3 min	372 mg / L	Inducción 1', 1'' Permanencia 2', 2'', 3', 3''
“mata piojos”	0.25 min	29 min	4 min	110 mg / L	Inducción 1', 1'' Permanencia 2', 2'', 3', 3''

6.3 Concentración media efectiva (CE 50) para clorhidrato de lidocaína, “barbasco”, “cacahuananche” y “mata piojos”.

Al tener el registro de los mililitros vertidos en cada uno de los acuarios de las concentraciones medias efectivas (CE 50) en el caso anterior cuando se vertían 5ml cada 5 minutos, se procedió a verificar la efectividad de las mismas, realizando 5 réplicas con las concentraciones ya determinadas para cada uno de los extractos acuosos y el Clorhidrato de lidocaína, obteniendo los siguientes tiempos promedio de inducción, permanencia y recuperación y el registro de los estados de anestesia propuestos por Brown en 1993 (Tabla 4).

Durante la fase de inducción en cada uno de los extractos acuosos y el clorhidrato de lidocaína no existe una diferencia significativa ($p > 0.05$) el tiempo promedio de respuesta fue de 0.79 minutos, el extracto acuoso del “barbasco” fue el único que obtuvo un tiempo de respuesta retardado con 1.53 minutos.

La fase de inducción incluye las siguientes etapas y características: 1' leve sedación el pez nada activamente y nada hacia la superficie para tomar bocanadas de aire, sedación profunda 1'' pasa de ligera a la total pérdida de estímulos externos con un nado errático.

En el tiempo de permanencia para los juveniles de tilapia *O. niloticus* incluye las siguientes etapas y características siguientes: 2' leve narcosis el pez muestra pérdida de equilibrio y dificultad para enderezarse, 2'' narcosis

profunda respuesta débil a cambios de posición y movimiento de opérculo lento, 3' leve anestesia, pérdida total del equilibrio y 3'' anestesia quirúrgica, pérdida de sensibilidad no responde a estímulos externos.

El extracto acuoso del “mata piojos” fue el que obtuvo un tiempo promedio mayor de permanencia con 29 minutos donde los peces se mantuvieron dentro del agua sin llegar a colapso medular, para los demás extractos acuosos y el clorhidrato de lidocaína la permanencia se mantuvo en un tiempo promedio de 19 minutos de igual manera sin llegar a colapso medular.

La recuperación muestra que entre el extracto acuoso del “cacahuananche” y el “mata piojos” existe un tiempo promedio de 3 minutos, mientras que para el clorhidrato de lidocaína su tiempo promedio de recuperación fue a los 2 minutos y para el extracto acuoso de “barbasco” fue de 4 minutos tiempo promedio.

Los resultados de los tiempos promedio obtenidos para cada uno de los extractos acuosos y el clorhidrato de lidocaína durante la fase de inducción, permanencia y recuperación se muestran en la (Figura 15).

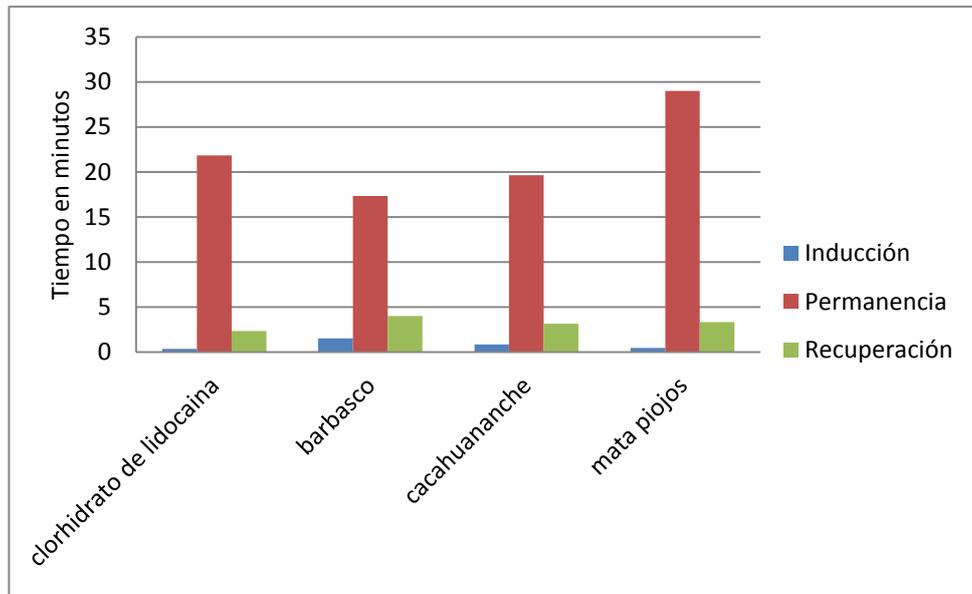


Figura 15. Tiempos promedio de inducción, permanencia y recuperación para los juveniles de tilapia *O. niloticus*

Tabla 4. Estados de anestesia, tiempos y concentración media efectiva (CE 50) alcanzados por los juveniles de *O. niloticus*

Anestésico	Estado de Anestesia	Categoría	Estado	Tiempo (minutos)	Concentración media efectiva (CE 50)
Clorhidrato de Lidocaína	Inducción	1', 1''	1' leve sedación 1'' sedación profunda	.35	95 mg/L
	Permanencia	2', 2'', 3', 3''	2' leve-narcosis 2'' narcosis profunda 3' leve anestesia 3'' anestesia quirúrgica	22	
	Recuperación	0	Normal	2	
Barbasco	Inducción	1', 1''	1' leve sedación 1'' sedación profunda	2	76 mg/L
	Permanencia	2', 2'', 3', 3''	2' leve-narcosis 2'' narcosis profunda 3' leve anestesia 3'' anestesia quirúrgica	17	
	Recuperación		Normal	4	

Cacahu- nanche	Inducción	1',1''	1`leve sedación 1``sedación profunda	.85	124 mg/L
	Permanencia	2',2'',3',3''	2`leve-narcosis 2``narcosis profunda 3`leve anestesia 3'' anestesia quirúrgica	20	
	Recuperación		Normal	3	
Mata Piojos	Inducción	1',1''	1`leve sedación 1``sedación profunda	.45	55 mg/L
	Permanencia	2',2'',3',3''	2`leve-narcosis 2``narcosis profunda 3`leve anestesia 3'' anestesia quirúrgica	29	
	Recuperación		Normal	3	

Las concentraciones encontradas para cada uno de los extractos acuosos y el clorhidrato de lidocaína fueron diferentes para todos los casos (Figura 16).

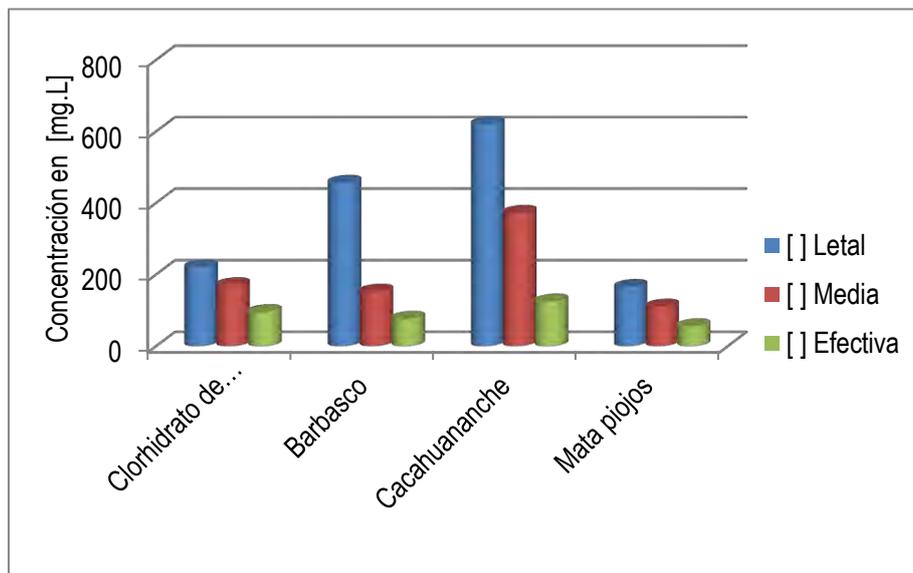


Figura 16. Concentraciones letal (CL 100), media letal (CL 50) y media efectiva (CE 50), obtenidos en cada uno de los tratamientos para juveniles *O. niloticus*

6.4 Técnicas de manejo llevadas a cabo en cada uno de los tratamientos en estado de anestesia quirúrgica con la concentración media efectiva (CE 50).

El sexado se llevó a cabo tiñendo la estructura de la papila genital de algunos organismos de juveniles de tilapia, posteriormente se procedió a pesar, medir y verificar el estado de salud externo observando daños en la piel como irritación, agallas, etc. de cada uno de los juveniles de *O. niloticus*.

Se logró la inmovilización y la pérdida de sensibilidad, comprobado con la inserción de una aguja en tejido muscular pinchando una de las aletas laterales y caudal del pez, con el propósito de descartar sensibilidad al tacto, observándose un comportamiento de total sedación y sin respuesta a estímulos externos, el tiempo promedio en el cual se pudieron realizar estas técnicas en los peces fuera del agua, varió en cada uno de los extractos acuosos dependiendo por el tiempo requerido como lo muestra la (Tabla 5).

Tabla 5. Tiempo promedio de manejo de los juveniles de tilapia fuera del agua en cada uno de los tratamientos

Anestésico	Tiempo y técnica de manejo (minutos)
Clorhidrato de lidocaína	3 minutos (peso, talla, sexado y prueba de sensibilidad)
“barbasco”	3 minutos (peso, talla y prueba de sensibilidad)
“cacahuananche”	2 minutos (peso, talla, y prueba de sensibilidad)
“mata piojos”	4 minutos (peso, talla, sexado y prueba de sensibilidad)

7 DISCUSIÓN

Se sabe que la manipulación es un factor importante de estrés para los organismos acuáticos en sistemas de cultivo y laboratorio, siendo los anestésicos una alternativa importante para reducir los efectos (Biswas 2004).

En este sentido las alternativas de anestesia que se presentan para los juveniles de *O. niloticus* en este trabajo pueden ser de utilidad para reducir el estrés en los peces que son utilizados con fines de investigación favoreciendo el bienestar animal (Rollin 2006).

El uso de anestésicos sintéticos ha sido el más utilizado en el manejo de organismos acuáticos, sin embargo, el uso de extractos vegetales a dado a conocer nuevas alternativas naturales con bajo costo y efectividad anestésica ; Los extractos de plantas como anestésicos, están poco investigados, el aceite de clavo *Syzygium aromaticum* L. (Merr. & Perry) es un ejemplo comprobado científicamente, cuyo principal principio activo es el eugenol y es usado en peces marinos de *Seriola dumerili*, encontrando una concentración de 40 ppm como dosis óptima, sin embargo dependerá de la especie y el tamaño de los organismos (García, 2002).

De esta manera es importante seguir contribuyendo en esta línea de investigación ya que los extractos acuosos utilizados en este trabajo no habían sido comprobados científicamente como anestésicos de peces; sin embargo fuentes tradicionales de dichas comunidades como Xochipala en Guerrero, Loma bonita en Oaxaca, el Cerro del Campanario en Veracruz y otras

localidades más en el estado de Tabasco México, por mencionar sólo algunas, siguen usando los extractos de estas plantas.

Las variables de respuesta evaluadas en este estudio fueron el tiempo de inducción, tiempo de permanencia y tiempo de recuperación, respuestas caracterizadas de acuerdo a los estados de anestesia propuestos por Brown (1993).

El tiempo de inducción fue definido como el período transcurrido desde el momento en que el pez fue puesto en contacto con el extracto acuoso, hasta que sus movimientos operculares disminuyeron y se presentó pérdida del eje de nado.

El tiempo de permanencia se definió, desde que el pez estabilizó sus movimientos operculares, tuvo nado lento, ausencia de respuesta a estímulos y pérdida del eje de nado.

Finalmente el tiempo de recuperación se definió como el periodo transcurrido entre el retiro del pez del extracto acuoso y la recuperación total del eje de nado en agua sin extracto.

Durante estas fases la respuesta de los juveniles de tilapia *O.niloticus* con cada uno de los extractos acuosos fue igual de acuerdo a las observaciones de comportamiento propuestos por (Brown en 1993), sin embargo los tiempos y las concentraciones encontradas fueron las variables.

La lidocaína es un anestésico local ampliamente utilizado en técnicas de acuicultura la dosis recomendada para “tilapia” varía de acuerdo al peso y especie (Stoskopf, 1993).

En este trabajo fue utilizado el clorhidrato de lidocaína que es un anestésico muy soluble en agua y compuesto derivado de la lidocaína, fue usado como anestésico control, para verificar la eficacia de los extractos acuosos antes mencionados, con respecto a las características fisiológicas de comportamiento en cada una de las etapas de los estados de anestesia, de esta manera se obtuvo que el tiempo de inducción promedio de los cuatro tratamientos para la concentración media efectiva (CE 50) fue de 0.35 minutos, el estado de permanencia fue de 21.83 minutos y de recuperación de 3 minutos. Pasando por cada una de las etapas de sedación de acuerdo Brown (1993).

Comparando al anestésico control, con el extracto acuoso de “barbasco”, “cacahuananche” y “mata piojos” en relación a la respuesta de los tiempos de inducción permanencia y recuperación, muestra que el extracto del “barbasco” tuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$), en el tiempo de inducción con 2 minutos, obteniendo el tiempo más extenso en esta etapa, durante la permanencia se mantuvo en 17 minutos y la recuperación de 4 minutos.

En la literatura solo se indica el uso tradicional del “barbasco” sin incluir tiempos ni estados de anestesia por los que pasan los peces, haciendo de suma importancia dicho trabajo donde se exponen por primera vez.

El extracto acuoso de “cacahuananche” obtuvo los tiempos promedios siguientes inducción 0.85 minutos, permanencia 20 minutos y recuperación 3 minutos, mostrando una buena respuesta de acuerdo a los parámetros establecidos para ser aceptado como anestésico, en este caso no se encontró literatura que nos permita afirmar lo anterior como uso efectivo para peces, sin embargo el extracto conocido como “mata piojos” se acercó más a los tiempos del anestésico control del clorhidrato lidocaína en los tiempos de inducción, permanencia y recuperación.

Por otro lado el extracto acuoso del “mata piojos” muestra claramente la efectividad anestésica, mostrando los mejores tiempos de inducción 0.45 minutos permanencia 29 minutos y recuperación 3 minutos, destacándose así como el extracto con mayor tiempo de permanencia, con respecto al anestésico control y los extractos empleados en este estudio, permitiendo expandir las técnicas de manipulación, la investigación bibliográfica no nos permite conocer el comportamiento, ni los tiempos en que dura el efecto anestésico en los peces, pero si corroborar que es totalmente efectivo, si se toman en cuenta las concentraciones que se encontraron en este trabajo.

Aunado a lo anterior, los tiempos y el estado anestésico fueron claramente identificados para cada uno de los extractos acuosos.

La fase de recuperación para cada uno de los extractos acuosos y el control tuvo un tiempo promedio de 3 minutos, lo cual resultó satisfactorio de acuerdo a Gilderhus (1990), donde menciona que uno de los parámetros para determinar la eficacia anestésica de una sustancia en el tiempo de recuperación debe ser no mayor a 5 minutos sin presentar efectos fisiológicos prolongados, ni residuales en los tejidos y la ausencia de mortalidad los cuales fueron evaluados en este trabajo dándole un seguimiento observacional durante 4 meses verificando diariamente el estado de salud de los juveniles de *O. niloticus* con respecto a lesiones externas, alimentación comportamiento y mortalidad.

En varios lugares del mundo, hojas tallos, raíces y frutos de las plantas de determinadas familias se maceran y se arrojan a ríos para liberar sustancias tóxicas y con ello provocar el aturdimiento o muerte de los peces, como se ha mencionado anteriormente el grupo de los “barbascos” es muy conocido en este ámbito debido a la efectividad que tiene para la pesca.

Estas actividades son tradicionales principalmente en grupos étnicos donde participan todos los miembros de la casa desde la preparación del “barbasco”, arrojarlo al río y la colecta de los peces.

Aún no se cuenta con una investigación que nos permita resolver el adecuado uso de muchas plantas usadas en la pesca, en algunas comunidades Amazónicas las llaman plantas “ictiotóxicas”, debido a la acción que provocan en los peces, algunas de muerte y otras solo de aturdimiento.

Las plantas utilizadas en este trabajo tienen información documentada de sus usos tradicionales y medicinales donde se encontró además la importancia de su uso como plantas para pescar, los resultados demuestran las cualidades anestésicas de cada uno de los extractos acuosos de rizoma de “barbasco”, raíz de “cacahuananche” y corteza de “mata piojos”.

Sin embargo, las propiedades químicas y metabolitos secundarios que contiene cada una de las plantas aún no han sido reportado en su totalidad a excepción del “barbasco” *Dioscorea composita* descubierto desde la década de los años de 1930 por sus propiedades abortivas donde el principio activo es la diosgenina (Waizel – Bucay, 2009). Mientras que se reporta el principio activo de sapogeninas con efecto anestésico para su uso en la pesca (Marcano y Hasegawa 1991).

Por otra parte la raíz del “cacahuananche” *Gliricidia sepium* ha sido reportada con efectos sedantes y tóxicos, estudios realizados de extracto acuoso muestran los principales metabolitos secundarios que contiene la planta como las cumarinas, flavonoides, aminoácidos y azúcares, dichos resultados fueron corroborados por la cromatografía de capa delgada (De la Guardia, 2003).

Los resultados en este trabajo arrojaron un efecto positivo como anestésico en los juveniles de *O. niloticus* por lo que se infiere que algunas de las cumarinas encontradas en este extracto poseen la propiedad anestésica, las cumarinas benzo - α - pironas se conocen por tener principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común “propiedades sedantes” (Van Ginkel 2003).

Ahora bien, el “mata piojos” *Piscidia grandifolia* se reporta principalmente con propiedades anestésicas el principio activo es la “piscidina” la cual causa dicho estado en los peces, en México es usada como narcótica y analgésica (Zamorano, 2003).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la eficacia de su uso como anestésico en los juveniles de *O. niloticus*, no existen antecedentes científicos que respalden los tiempos y estados de sedación, es por ello que se presentan los primeros resultados de su uso ya que fue el extracto acuoso con mayor eficacia, en comparación con los anteriores obteniendo el mejor tiempo de inducción, permanencia y recuperación.

8 CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos de rizoma de “barbasco” *Dioscorea composita*, raíz de “cacahuananche” *Gliricidia sepium* y corteza de tallo del “mata piojos” *Piscidia grandifolia* resultaron ser eficaces para la sedación e inmovilización de los juveniles de “tilapia” *Oreochromis niloticus*.
- No se observó ningún tipo de respuesta adversa como contracciones nerviosas, convulsiones o saltos durante la fase de inducción a la anestesia, ni mortalidad después de la fase de recuperación en las concentraciones efectivas.
- El extracto acuoso del “mata piojos” obtuvo los mejores tiempos en la concentración efectiva, inducción menor a 1min, permanencia de 29 min y recuperación de 3 min, además de mostrar cada una de las fases de anestesia claramente propuestos por Brown 1993.
- El uso de los extractos acuosos de cada planta permite la manipulación de los organismos, para determinar el peso, longitud patrón, longitud total y sexado, sin tener efectos adversos.
- La utilización de los extractos acuosos permiten anestésiar a los peces de forma segura y reversible, facilitando de esta manera el manejo de ellos, reduciendo los niveles de estrés y el impacto negativo que ello genera.

9 LITERATURA CITADA

- A. García-Gómez. 2002. F. de la Gándara y T. Raja. Utilización de aceite de clavo en anestesia de peces marinos. Bol. Inst. Esp. Oceanografía.
- Abdel-Fattah, M. El-Sayed. 2006. Tilapia culture. Edited by CABI Publishing, Cambridge, USA.
- Acevedo-Rodríguez, P. 1990. The occurrence of piscicides and stupefactants in the plant kingdom. *Econ. Bot.* 8: 1-23p.
- Alamilla, H. 2001. Cultivo de tilapia. 20E Techni-Campo. México. 19p.
- Arredondo, B, A. Beltrán, M. Torres. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del banco de genoma de tilapia. Convenio SEPESCA/UAM-I. Secretaría de Pesca. 89p.
- Barr, S. Laming, P. R., Dick, J. T. A., Elwood, R. W. 2008. Nociception or pain in decapod crustacean. *Animal Behaviour*, 75:745-751p.
- Barton, B., Schreck, C. L. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 173-185p.
- Beamish, F. W. H. 1964. Influence of starvation on standard and routine oxygen consumption. *Transactions of the American Fisheries Society*. 93 -107p.
- Bell, D. J., Jerrett, A. R., y Holland, J. 1998. Rested harvesting using Aqual-S.
- Biswas. 2004. Length-weight relation ship of *Oreochromis mossambicus* (Peters) from a pond in Upper Assam. *Indian J. Environ.* 8 (1): 229-236p.

- Booth, N., L. y Mc Donald. 1988. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Vol. I .Ed. Acribia, Zaragoza.
- Bowser PR. 2001. Anesthetic options for fish. In: Gleed RD and Ludders JW (Ed), Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Comparison Animals, New York, USA: International Veterinary Information Service.
- Brown, L. A. 1993. Anesthesia and restraint. In: M.K. Stoskopf, D.P. Fish Medicine (eds.), W. B. Saunders Company. Philadelphia. 79-90p.
- Cho GK, Heath DD. 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquac Res*; 31(6):537-546p.
- Davidson GW, Davie PS, Young G, Fowler R. T. 2000. Physiological responses of rainbowtrout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUI STM. *J World Aquac Soc* ; 31(1): 105-114p.
- De la Guardia. 2003. Obtención de un extracto plaguicida de *Gliricidia sepium* (Jaq.) Steud bajo la irradiación con microondas *Rev. Cubana Plant Med.* Vol.8
- De Mena, M.G. 1994. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña. Segunda edición. Editorial universitaria, Universidad de El Salvador. 399 p.
- Deppe. R. 1983. Anestesia Veterinaria. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

- Descola. 1989. La acuicultura en México, importancia social y económica. En desarrollo pesquero mexicano. México, Secretaría de Pesca. L II: 219-232p.
- Ellis, T.; North, B.; Scott, A. P.; Bromage, N. R. y Porter, M. 2002. A review of the relationships between stocking density and welfare in farmed fish. European Aquaculture Society Special Publication. 32 : 226-227p.
- Elwood, R. W., Barr, S., Patterson, L. 2009. Pain and stress in crustaceans Applied Animal Behaviour Science, 118:128-136p.
- Erikson, U.; Sigholt, T. y Seland, A. 1997. Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 149 (3-4): 243- 252p.
- Farland, Me. and G. Klontz. 1999. Anesthesia in fishes. Federation Proceedings 28:1535-1540p.
- Fitzsimmons. 1997. Tilapia Aquaculture Proceedings from the Fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture: Introduction to tilapia aquaculture conference proceedings; Ed. K. Fitzsimmons. The Northeast Regional Agricultural Engineering service (NRAES).
- Fuentes, V. 1992. Farmacología y terapéutica veterinarias. 2ª ed. Edit. Interamericana S.A., Ciudad de México.
- Gerales Martha Diaz. 2009. Interacciones entre preparaciones a base de plantas medicinales y medicamentos. Revista de fitoterapia pdf Vol. 9 N° 1 5-22p.

- Gilderhus, Marking LL.1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management . 7(2): 288-292p.
- Gilderhus. 1990. Benzocaine as a fish anesthetic: efficacy and Safety for spawning-phase salmon. 52(3):189-191p.
- Hinke, Nina. 2008. "El barbasco". Ciencias, num. enero-marzo, 54-57p.
- Hughes. 2001. Biological considerations in designing a seed collections strategy for *Gliricidia sepium*. Commonwealth Forestry Review 66: 31-48p.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. 1981. El barbasco mexicano condiciones y perspectivas para su aprovechamiento.
- Iwama, G.; Ackerman, A. 1994. Anaesthetics. In. Hochachka, P.; Mommsen. Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes. Amsterdam: Elsevier Science, V.3, Cap.1, 1-15p.
- Jacq. Kunth ex Walp. 1842. *Gliricidia sepium*; Publicado en: Repertorium Botanices Systematicae. 1(4): 679p.
- L. de la Torre et. al 2008 Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus. 99–104
- Lazard, 1997. Tilapia Aquaculture Proceedings from the Fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture: tilapia more than a fish a tool for sustainable development. Arizona, USA. V. 437-440p.
- Marcano y Hasegawa. 1991. Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper *Epinephelus septemfasciatus* reared in laboratory. Japan Journal of Ichthyology, 38: 47-55p.

- McCormick, S. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture* 168: 221-235p.
- Morales D. A. 1974. El cultivo de la tilapia en México. Instituto Nacional de la Pesca. INP. 24-25 p.
- Muir, W. et. al 2008. Manual de Anestesia Veterinaria, cuarta edición, Madrid, España.
- Pankhurst N. Van Der Kraak G. 2000. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. *General and Comparative Endocrinology* 117: 225-237p.
- Parra, G. y Yúfera, M. 2000. Feeding, physiology and growth responses in first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to prey density. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 243 (1): 1- 15p.
- Pickering, A. D. 1993. Husbandry and stress. En: *Recent Advances in Aquaculture*, 4. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 155-169p.
- Red J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci* 73: 1516-1528p.
- Rendón, B., S. Rebollar, J. Caballero y M. A. Martínez. 2002. *Plantas Cultura y Sociedad*. Universidad Autónoma Metropolitana-SEMARNAP. México, D.F. 180 p.
- Rollin, B.E. 2006. The regulation of animal research and the emergence of animal ethics: A conceptual history. *Theoretical Medicine and Bioethics*, 27: 285-304p.

- Saavedra, M. A. 2003. Introducción al Cultivo de Tilapia. Coordinación de Acuicultura, Departamento de Ciencias Ambientales y Agrarias, Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente. Universidad Centroamericana. Managua, Nicaragua. Mayo, 2003.
- Saavedra, M. A. 2006. Texto de Asignatura Producción Agropecuaria y Acuícola. Carrera Ingeniería Industrial. Departamento de Tecnología y Arquitectura. Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente. Universidad Centroamericana. Managua, Nicaragua.
- Simons y Stewart. 1994. *Gliricidia sepium* a multipurpose forage tree legume. CAB International, Queensland, Australia. 30p.
- Siwicki, A. 1984. New anaesthetic for fish. *Aquaculture*, 38:171-176.
- Stewart JL, Allison GE, Simon AJ Ed. 1996. *Gliricidia sepium*. Oxford Forestry Institute, University of Oxford.
- Stoskopf, M. K. 1993. Environmental requirements and diseases of temperate freshwater and estuarine fishes. *Fish Medicine*. W. B. Saunders. Company. Chapter 21 240 – 245p.
- Summerfelt RC, Smith L. S. 1990. Anesthesia, surgery and related techniques. In: Schreck CB and Moyle PB (Ed), *Methods for Fish Biology*, Bethesda, MD. USA: American Fisheries Society.
- Tenorio-Colín Guadalupe. 2003. Caracterización isoenzimática de *Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus* introducidas en México.
- Van Ginkel, A. 2003. Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.”
- Waizel-Bucay. 2009. *Revista de Fitoterapia* Vol. 9; N° 1; 67p.

- Witsbenger, D., Current, D., Archer E. 1982. Arboles de Parque Deninger. San Salvador. 336p.
- Zamorano. 2003. Consumo de alevines de tilapia (*O. niloticus*) por el guapote tigre (*Cichlasoma managuense*) 22p.