

R. 9187

T-506

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DPTO. DE FARMACODINAMIA Y FARMACOGNOSIA

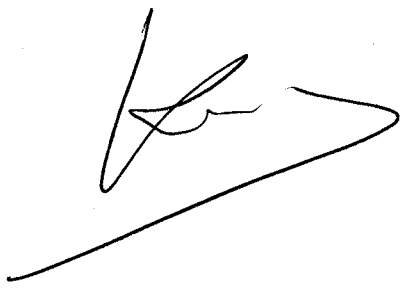
**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN
LIPÍDICA DE *RUVETTUS PRETIOSUS***

Memoria presentada por
Ma del Carmen Pérez Zarza
para aspirar al grado de
Licenciada en Farmacia

CODIRECTORES:

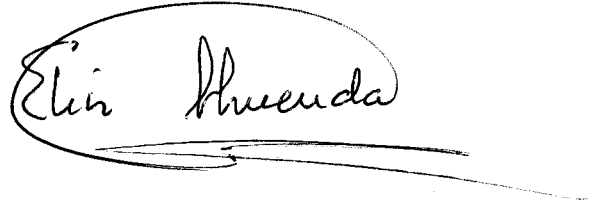
Vº Bº

La Directora del Trabajo
Dra. Valentina Ruiz Gutiérrez



Vº Bº

La Catedrática ponente
Dra. Elisa Marhuenda Requena



Valentina Ruiz Gutiérrez, Colaboradora Científica del Instituto de la Grasa y sus Derivados, centro del C.S.I.C. sito en Sevilla,

CERTIFICA : que la presente tesina de Licenciatura que presenta M^a del Carmen Pérez Zarza, ha sido realizada en dicho centro, bajo mi dirección, desde Septiembre de 1991 hasta Junio de 1992, reuniendo a mi juicio los requisitos exigidos a los trabajos de Licenciatura.

Y para que conste, firmo la presente certificación en Sevilla, a 30 de Junio de 1992.

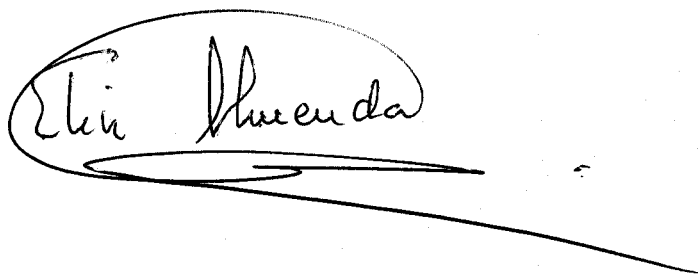


A handwritten signature in black ink, appearing to be 'V. Ruiz', written over the line extending from the stamp.

Elisa Marhuenda Requena, Catedrática y Directora del Departamento de Farmacodinamia y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA : ser la Catedrática ponente de la presente Tesina de Licenciatura que presenta M^a del Carmen Pérez Zarza, que reúne a mi juicio los requisitos exigidos a los trabajos de Licenciatura.

Y para que conste, firmo la presente certificación en Sevilla, a 30 de Junio de 1992.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a large, horizontal oval shape. The signature reads "Elisa Marhuenda". The ink is dark and the handwriting is cursive. The signature is positioned in the lower right quadrant of the page.

El trabajo correspondiente a la Memoria que se presenta ha sido realizado en el Instituto de la Grasa y su Derivados (C.S.I.C.) de Sevilla.

Deseo expresar mi profunda gratitud a la Dra. Valentina Ruiz Gutiérrez, por la dirección y el apoyo que me ha ofrecido en todo momento.

A la catedrática Dra. Elisa Marhuenda Requena por su interés durante la realización de la presente memoria.

Al catedrático Dr. Luis Bravo Díaz, mi agradecimiento por su colaboración y suministro de las muestras, sin las cuales esta Memoria no se habría realizado.

Mi reconocimiento al Instituto de la Grasa y sus Derivados y a su directora, Dra. M^a Carmen Dobarganes García, por las facilidades prestadas a la realización de este trabajo, y a algunos de sus miembros, como D^a Carmen Arévalo y el Dr. Roberto Maestro, por su inapreciable ayuda en algunas experiencias.

También al Cabildo Canario por la concesión de una Beca, sin la cual la realización de la presente Memoria no hubiera sido posible.

Finalmente, mi agradecimiento a mis compañeros, Choni, Cinta, Francisco, Emilio y José Luis, por su apoyo y comprensión, y a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a la elaboración de este trabajo.

A MI FAMILIA

ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres
COL	Colesterol
DG	Diglicéridos
EC	Ésteres de colesterol
FL	Fosfolípidos
LP	Lípidos polares
MG	Monoglicéridos
TG	Triglicéridos
TLC	Thin-layer chromatography (cromatografía en capa fina)

ÍNDICE

I. OBJETO DEL TRABAJO	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
II. 1. <u>Zoología</u>	4
II. 1. 1. Situación taxonómica	4
II. 1. 2. Descripción	4
II. 1. 3. Ecología	5
II. 2. <u>Estudios previos</u>	5
II. 2. 1. Primeros estudios	5
II. 2. 2. ¿Qué son los ésteres tipo ceras?	7
II. 2. 3. Funciones ésteres tipo ceras	9
II. 2. 4. Biosíntesis ésteres tipo ceras	11
II. 2. 5. Otros trabajos	12
III. MATERIAL Y MÉTODOS	30
III. 1. <u>Muestras</u>	31
III. 2. <u>Reactivos</u>	33
III. 3. <u>Aparatos</u>	34
III. 4. <u>Análisis de lípidos</u>	35
III. 4. 1. Aislamiento de los lípidos	35
III. 4. 2. Obtención del insaponificable	36
III. 4. 3. Cromatografía en capa fina	38
III. 4. 4. Fraccionamiento de la grasa por columna de sílice	41
III. 4. 5. Cuantificación de las distintas clases de lípidos y fosfolípidos	42
III. 4. 6. Cuantificación cromatográfica de ácidos grasos de lípidos totales	43
III. 4. 7. Cuantificación cromatográfica de ácidos grasos y alcoholes grasos de ceras	45

IV. RESULTADOS	48
IV. 1. <u>Porcentajes de grasa</u>	49
IV. 1. 1. Zonas musculares	49
IV. 1. 2. Órganos	49
IV. 1. 3. Otros	49
IV. 2. <u>Porcentajes de fracción insaponificable</u>	51
IV. 3. <u>Cromatografía en capa fina</u>	53
IV. 3. 1. Zonas musculares	53
IV. 3. 2. Órganos	53
IV. 3. 3. Insaponificables	54
IV. 4. <u>Fraccionamiento de la grasa</u>	59
IV. 5. <u>Composición de la grasa</u>	61
IV. 5. 1. Zonas musculares	61
IV. 5. 2. Órganos	61
IV. 5. 3. Otros	62
IV. 6. <u>Composición de los fosfolípidos</u>	70
IV. 7. <u>Composición de ácidos grasos de lípidos totales</u>	73
IV. 8. <u>Composición de las ceras</u>	90
IV. 8. 1. Ácidos grasos	90
IV. 8. 2. Alcoholes grasos	93
V. DISCUSIÓN	104
VI. CONCLUSIONES	112
VII. BIBLIOGRAFÍA	116

I. OBJETO DEL TRABAJO

El objeto de nuestro trabajo es estudiar la composición lipídica del pez *Ruvettus pretiosus*. Para ello, se ha realizado:

1) determinación del porcentaje de grasa en distintas zonas musculares y órganos.

2) determinación del porcentaje de insaponificable.

3) determinación de la composición lipídica del aceite extraído de las distintas zonas musculares y órganos.

4) estudio de los fosfolípidos de dos órganos: hígado y testículos.

5) determinación de la composición en ácidos grasos de los lípidos totales extraídos de estas zonas musculares y órganos.

6) determinación de la composición en ácidos grasos y alcoholes grasos de las ceras.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

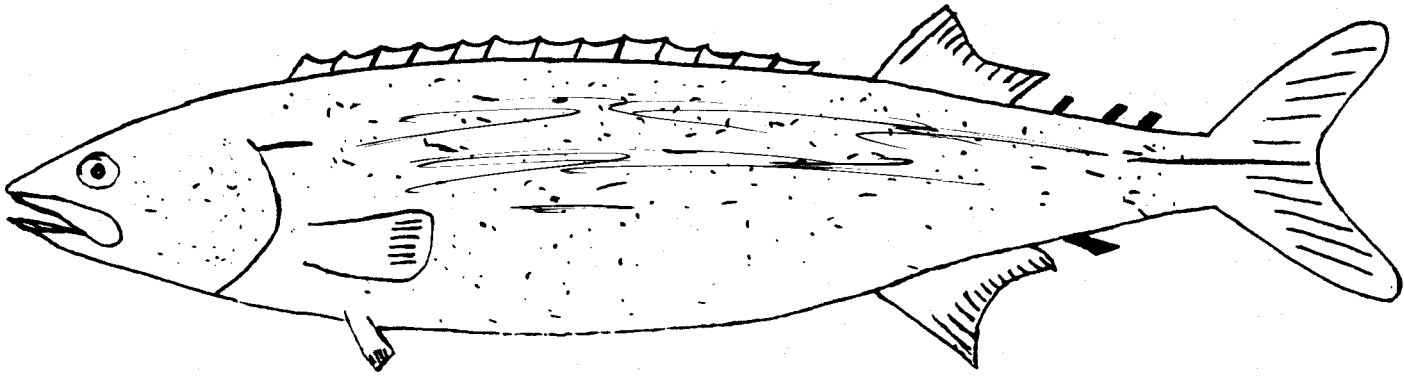


FIGURA 1 : RUVETTUS PRETIOSUS (SEGÚN GOODE AND BEAN).

II.1. ZOOLOGÍA

II.1.1 Situación taxonómica

REINO	<i>Animalia</i>
PHYLUM	<i>Chordata</i>
SUBPHYLUM	<i>Vertebrata</i>
CLASE	<i>Teleostei</i>
ORDEN	<i>Perciformes</i>
FAMILIA	<i>Gempylidae</i>
GÉNERO	<i>Ruvettus</i>
ESPECIE	<i>Ruvettus pretiosus</i> (Cocco, 1829 L.)

II.1.2. Descripción

Según Bauchot y Pras (1987) *Ruvettus pretiosus* (ver figura 1) pertenece a un grupo III caracterizado por contener peces derivados de las caballas por alargamiento del cuerpo y pérdida progresiva de las pínulas, con boca muy hendida, mandíbula prominente, pectorales bajas, y que viven cerca de la plataforma continental. Dentro de este tercer grupo se encuentra la familia *Gempylidae*, cuyos especímenes se caracterizan por poseer dos pínulas más o menos separadas en la parte posterior de la aleta dorsal y de la anal, además de menos de 50 radios dorsales (espinosos más blandos). Los peces pertenecientes a esta

familia tienen el cuerpo alargado, el pedúnculo caudal afilado, una aleta dorsal larga con una primera parte más baja con radios simples y la segunda parte opuesta a la anal, aletas pélvicas reducidas y caudal escotada.

Dentro de la familia *Gempylidae* nos encontramos peces con hocico normal, línea lateral poco visible y piel rugosa salpicada de pequeños bucles con muchos puntos, que corresponden a la especie *Ruvettus pretiosus*.

II.1.3. Ecología

Ruvettus pretiosus es bastante común, y se puede encontrar en Europa desde el Atlántico tropical hasta el golfo de Vizcaya, además de en el mar Mediterráneo. Vive entre los 200 y 800 metros de profundidad. Tiene el dorso pardo oscuro y los flancos y vientre más claros. Posee escudos dérmicos blanquecinos, cavidad bucal negruzca, cuerpo fusiforme, abdomen con quilla denticulada y pínulas reunidas por una membrana. La fórmula de las aletas es la siguiente: D_1 XIII-XV, D_2 -14-16+2. A II-III. 12-15+2. La talla media es de 2 metros y 45 kilos.

II.2. ESTUDIOS PREVIOS

II.2.1. Primeros estudios

Según Cox y Reid (1932), *Ruvettus pretiosus* fue descrito ictiológicamente por Lowe (1841), quien a su vez señalaba "se dice que los huesos contienen gran cantidad de un aceite o tuétano que produce diarrea al ser ingerido incautamente".

Desde esta observación inicial, varios investigadores [Becke (1901), Krämer (1901), Weber (1902) y Weber-van Bosse (1905)] han confirmado las cualidades purgativas del aceite. Además, el aceite extraído de la carne del pescado tiene un efecto tan remarcable como el de la menor cantidad de aceite obtenida de los huesos. Gudger (1925) reunió en un trabajo la información disponible sobre esta especie y las cualidades purgativas de su aceite, llamando a *Ruvettus pretiosus* "el pez con aceite de ricino", ya que, según parecía, su aceite contenía un 13% de ácido hidroxioleico (el principio purgativo del aceite de ricino). Por otro lado, C.B. Nordhoff (1928) manifestó que sin duda se le había concedido demasiada importancia a la cualidad purgativa del aceite.

Cox y Reid (1932) juzgaron de interés el llevar a cabo un estudio químico del aceite extraído de pescados capturados en las islas Ellice del Océano Pacífico Occidental, con vistas al aislamiento e identificación del principio o principios purgativos, si los hubiera. Llegaron a la conclusión de que el aceite consistía en porciones más o menos iguales de materia saponificable e insaponificable. Estas comprendían respectivamente ácidos grasos y alcoholes lineales. El aceite estaba formado principalmente por los ésteres cetílico y oleílico de los ácidos oleico e hidroxioleico y fue clasificado como una "cera líquida" (éster tipo cera). Encontraron en el aceite: ácidos grasos (esteárico, oleico, gadoleico, erúcico, lignocérico, cerótico y ácido hidroxioleico); alcoholes (oleílico, tetradecílico, cetílico, octadecílico, colesterol, glicerol); hidrocarburos (escualeno).

En cuanto a las propiedades purgativas del aceite, probablemente se les había concedido demasiada importancia ya que los resultados mostraban que las dosis relativamente altas requeridas para la purgación apuntaban más bien a un laxante

suave. También encontraron como razonable que ningún constituyente fuera responsable de esta acción, y que el efecto de todos los componentes combinados explicara la acción del total del aceite. Channon (1926) había afirmado que el escualeno poseía una acción purgativa, pero aquí sólo estaba presente en trazas. También el cetil acetato había sido ensayado previamente en el curso de un experimento de metabolismo realizado por Mancke (1926-1927), donde las diarreas no fueron una resultante generalizada. Uno de los autores (Cox, 1932) ingirió una pizca del aceite de *Ruvettus pretiosus*, con ningún efecto notificable. De todos modos, parecía ser que existía una pequeña acción farmacológica, que podía depender de su contenido en ésteres de alcoholes de cadena larga (ésteres tipo ceras).

II.2.2. ¿Qué son los ésteres tipo ceras?

Según J.C. Nevenzel (1969,a), los ésteres tipo ceras son ésteres de ácidos grasos (12-14 átomos de carbono) con alcoholes grasos de cadena larga (10-30 átomos de carbono).

Toda la evidencia disponible nos indica que los alcoholes grasos de cadena larga no se encuentran libres en los tejidos de animales vivos, luego la identificación de alcoholes grasos libres en los lípidos implica la presencia original de ésteres tipo ceras en el tejido.

Los ésteres tipo ceras constituyen una clase lipídica importante en al menos 30 especies de animales marinos, distribuidos en 17 órdenes y 3 tipos, aunque sólo uno, la ballena esperma (Familia *Physeteridae*, especie *Physeter catodon*) es fuente de cera comercial.

Según Nevenzel, la historia del estudio de los ésteres tipo ceras en el ambiente marino comenzó con el conocimiento de

la verdadera naturaleza química del aceite de la ballena esperma. En 1815, M.E. Chevreul (1817) descubrió que esta cera no contenía glicerol. Dos años más tarde, aisló los alcoholes de cadena larga liberados por saponificación, los caracterizó parcialmente, y denominó a la mezcla "alcohol cetílico". Este nombre vulgar se sigue usando hoy para el principal alcohol graso presente, 1-hexadecanol. Kimura (1926) afirmaba que el aceite de *Ruvettus pretiosus* contenía ésteres tipo ceras en gran proporción; su artículo nunca fue resumido por las revistas occidentales, y por lo tanto Cox y Reid no tuvieron conocimiento de él. Esta es la razón de que repitieran el trabajo en 1932.

La primera identificación de ésteres tipo ceras en invertebrados fue el aislamiento de cetil palmitato de corales de piedra por Lester y Bergman (1941). Apoyado por la creciente evidencia de que los ésteres tipo ceras eran constituyentes normales de muchas especies de ballenas dentadas y de peces marinos teleósteos, Lovern (1964) reinterpreto sus análisis del año 1935 de los lípidos de *Calanus finmarchicus*, arguyendo que estos crustáceos eran ricos en ésteres tipo ceras. Sin embargo, el primer aislamiento de ésteres tipo ceras de un crustáceo, la especie de aguas profundas *Gaussis princeps*, se realizó en 1967 (Lee et al, información no publicada).

Por otro lado, parece ser que la presencia de ésteres tipo ceras en el músculo de un pez teleósteo excluye su existencia en la hueva de dicha especie. Por ejemplo, los ésteres tipo ceras son la principal clase lipídica en el músculo de *Alloctytus verrucosus* (Mori et al, 1966, b) pero sólo están presentes como trazas en los huevos (Mori et al, 1966, c); la situación contraria ocurre en el mújol (*Mugil cephalus*), según Iyengar y Schlenck (1967) donde los ésteres tipo ceras se encuentran sólo en la hueva, y no en el músculo.

Nevenzel et al (1966) también estudiaron la carne de *Latimeria chalumnae*. Para ello realizaron una extracción de la grasa del tejido con cloroformo-metanol. La separación de las distintas clases de lípidos se hizo por cromatografía en columna de sílice, y posteriormente se realizó una saponificación de los ésteres tipo ceras, separando los componentes alcoholes de cadena larga y ácidos grasos mediante columnas con florisil. Por último, se efectuó una cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los alcoholes y ácidos grasos. Los resultados fueron un alto contenido de lípidos totales en la carne (de 30 a 71%, en peso seco), un alto porcentaje de ésteres tipo ceras en los lípidos del tejido muscular y adiposo (90%), y una gran uniformidad en la composición de los ésteres tipo ceras (homólogos desde C₃₀ a C₄₀, con uno o dos dobles enlaces) en los seis tejidos examinados (carne del tronco, hígado, bazo, vejiga natatoria presuntamente llena de grasa, y tejidos de almacenamiento de grasa situados en distintos lugares).

II.2.3. Funciones ésteres tipo ceras

Según Nevenzel et al (1969,a), las tres posibles funciones de los ésteres tipo ceras presentes en algunos organismos marinos son :

- almacenamiento de energía de reserva
- agente de flotabilidad
- elemento estructural

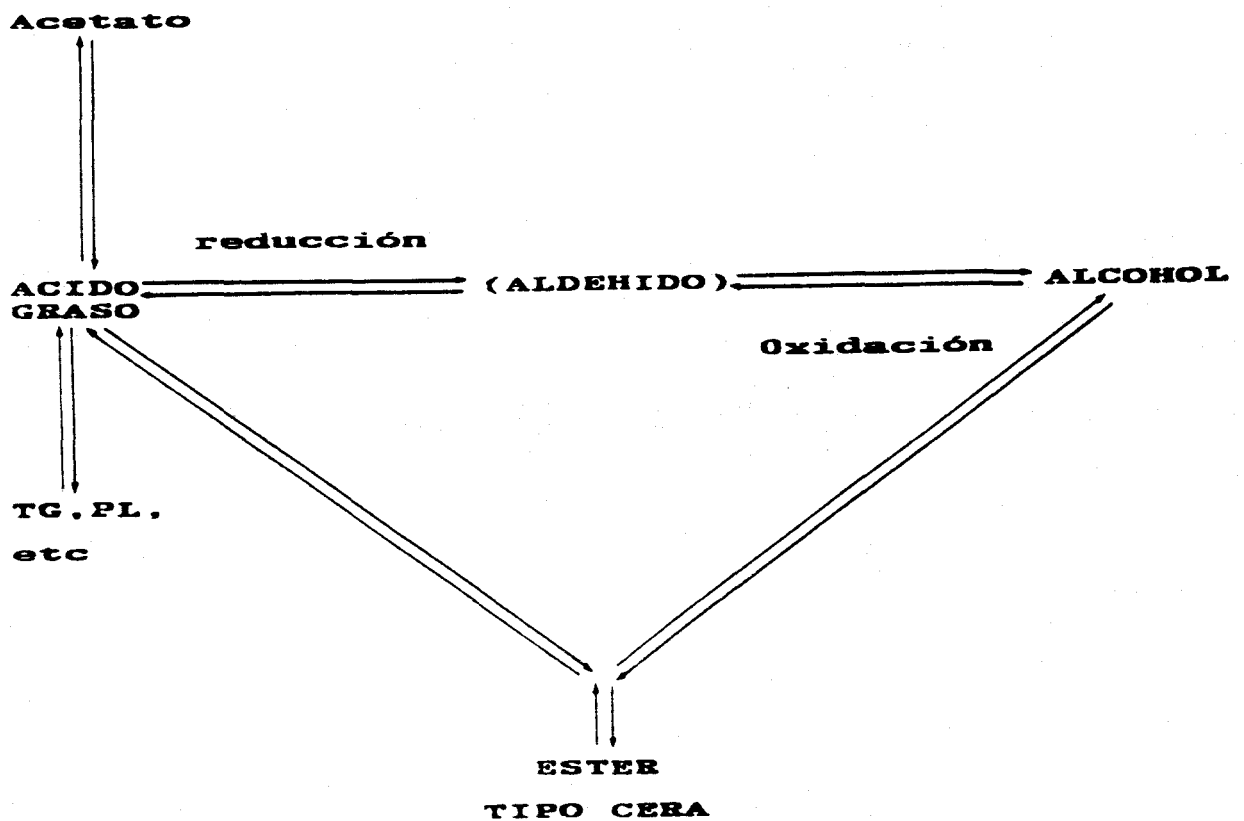
En la familia *Gempylidae* los ésteres tipo ceras se encuentran en el músculo y depósitos adiposos y son principal-

mente monoenos y dienos. Las cantidades masivas de estos lípidos depositadas en los gempílicos son probablemente un medio para alcanzar la flotabilidad neutra; en estas especies los ésteres tipo ceras son sólo secundariamente, si lo son, una reserva energética. La evidencia de este papel es triple. Cálculos teóricos (resumidos por Marshall, 1960, 1966) muestran que los peces marinos serían neutralmente flotantes si contuvieran un 21-24% de peso en fresco de lípidos, y los valores observados en estas especies son 14-16%. Capen (1967) demostró por medida directa que los individuos maduros de *Triphoturus mexicanus* (un pez linterna) realmente eran casi neutralmente flotantes. Por último, la mayoría de estas especies (Nevenzel et al, 1969,a) son peces mesopelágicos que realizan viajes diarios de ida y vuelta de varios cientos de metros en vertical. La actividad de las especies mesopelágicas se incrementaría si fueran neutralmente flotantes o si se aproximaran a esta condición, porque entonces disminuiría la energía gastada para mantener su posición vertical en la columna de agua. De las distintas formas en que los peces se han desarrollado para llevar a cabo este propósito, el depósito de cantidades masivas de lípidos parece ser la más satisfactoria para un pez migrador que nada vigorosamente en vertical, ya que el bajo coeficiente de compresibilidad de los lípidos comparado con el de una vejiga natatoria llena de aire, limita la fuerza de los cambios de presión tan grandes experimentados en un movimiento que va desde los 800 metros hasta los 500 metros y vuelta otra vez, teniendo en cuenta un cambio de presión de 30 atmósferas. Nevenzel et al (1969,b) estudiaron tres especies de la familia *Myctophidae* que contenían grandes cantidades de ésteres tipo ceras, de las cuales dos se sabía que de jóvenes poseían vejigas natatorias llenas de aire, pero a medida que iban madurando, llenaban la vejiga natatoria con grasa, llegando a colapsar completamente el lumen.

Los ésteres tipo ceras presumiblemente fueron desarrollados por algunos animales marinos como alternativa a los triglicéridos para satisfacer demandas específicas de su medio ambiente. Las siguientes son las posibles ventajas que los ésteres tipo ceras pueden tener sobre los triglicéridos. 1a) Hay indicaciones de que los ésteres tipo ceras poseen una densidad ligeramente más baja (quizás un 5%) que la de los triglicéridos con un grado de insaturación similar, y así suministran mayor flotabilidad por unidad de volumen. 2a) Posiblemente los ésteres tipo ceras, en contraste con los triglicéridos, no están sujetos a una movilización controlada por hormonas durante los periodos de demanda de energía, estabilizando así la flotabilidad del organismo contra fluctuaciones a corto plazo; es decir, el control de la flotabilidad está separado de la demanda de energía. 3a) Ya que el glicerol para la síntesis de triglicéridos probablemente se obtendría a partir de carbohidratos, el depósito de ésteres tipo ceras en vez de triglicéridos podría ser una adaptación a una escasez de carbohidratos. Esta hipótesis sería coherente con la baja dieta en carbohidratos de los organismos de aguas profundas.

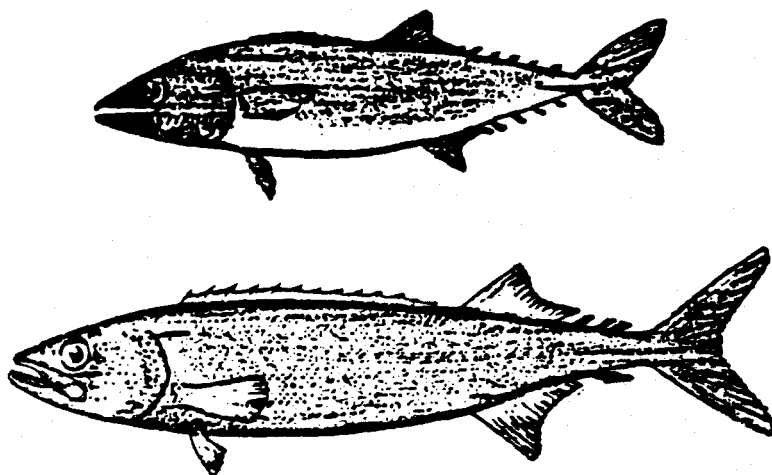
II.2.4. Biosíntesis ésteres tipo cera

Los ésteres tipo ceras son biosintetizados en casi todas las especies marinas en donde se encuentran. En la mayoría de los organismos marinos hay una síntesis neta de alcoholes, y éstos por turno son esterificados con ácidos grasos hasta convertirse en los ésteres tipo ceras, que se acumulan. La verdadera llave para la presencia de ésteres tipo ceras en los animales marinos debería buscarse en la actividad del catabolismo oxidativo de alcoholes de cadena larga respecto a su biosíntesis vía reducción de ácidos grasos.



II.2.5. Otros trabajos

En el artículo de Nevenzel (1969,a) se incluye una lista de los animales marinos que contienen ésteres tipo ceras en su composición. Dentro del orden *Perciformes* se destaca la familia *Gempylidae* (escolares), en la cual, de cinco géneros examinados [Lovern (1964), y también datos no publicados de Nevenzel], sólo dos, *Ruvettus pretiosus* y *Lepidocybium flavobrunneum* (ver figura 2), contienen en su carne un 92% y 89% de ésteres tipo ceras respectivamente como porcentaje de los lípidos totales.



A = *Lepidocybium flavo-brunneum* (según Kamohara)

B = *Ruvettus pretiosus* (según Goode and Bean)

FIGURA 2 : Dibujos tomados de Mori et al (1966,a).

De los datos expuestos en el artículo de Nevenzel se desprenden las siguientes generalizaciones:

- la longitud de la cadena de los ésteres tipo ceras en los peces se encuentra en un rango que va desde C₃₀ a C₄₂
- los alcoholes grasos son en su mayoría saturados y mono-insaturados
- en los peces y mamíferos marinos normalmente el alcohol cetílico (16:0) es el componente principal, siguiéndole el

alcohol oleico (18:1)

- el ácido graso principal es el oleico (18:1)
- los métodos analíticos aplicados hasta ahora a los ésteres tipo ceras no son lo suficientemente precisos como para establecer decisivamente si las porciones de alcoholes y ácidos grasos están combinadas al azar.

Mori et al (1966,a), en un trabajo sobre biotoxinas marinas, investigaron la composición y toxicidad de las ceras de la carne de *Lepidocybium flavo-brunneum* y *Ruvettus pretiosus*.

En Japón estos peces son capturados frecuentemente junto al atún, y la mayoría son desechados inmediatamente tras su captura. Sin embargo una parte (casi 10 toneladas al año) se reserva para su consumo como pescado desecado al sol, pues se piensa que así la carne resulta menos dañina, ya que el aceite se pierde fácilmente durante el secado. Debido al hecho de que en algunos trabajadores se acentuaba la seborrea como riesgo de la ingestión de cera, se investigó, utilizando ratas, la actividad como productores de seborrea de la carne y el aceite proveniente de estos peces, para evaluarlos como fuente de alimento.

Los peces se mandaron al laboratorio eviscerados y congelados, mantuviéndose a -20°C hasta su uso. Se cuantificó la humedad y el contenido en lípidos. En ambos peces la humedad era de alrededor del 62%. En cuanto a los lípidos, se dividió el cuerpo de los peces en tres partes (dorsal, ventral y cola), con un porcentaje de lípidos de 19%, 19,4% y 18,5% en *Lepidocybium flavo-brunneum*, y un 23,1%, 18,5% y 13,8% respectivamente en *Ruvettus pretiosus*.

La actividad purgante se evaluó en gatos y ratas. Dos gatos de 810 y 530 gramos se alimentaron con porciones de 20 gramos de carne de *Lepidocybium flavo-brunneum*. El primer gato no mostró ningún síntoma, mientras que el segundo sufrió una

diarrea con frecuentes evacuaciones acuosas cuatro horas después de la ingestión de la carne, aunque el animal se recuperó pronto, y 24 horas más tarde ya se encontraba bien.

Las ratas eran machos jóvenes que se mantuvieron primero con una dieta de arroz, caseína, levadura y mezcla de sales McCollum durante 6 días. Transcurrido este tiempo, se dividieron en 5 grupos de 4 ratas cada uno. Cada grupo recibió una dieta distinta, una vez al día. Un primer grupo sirvió como control, con la dieta descrita antes. Al segundo grupo se le administraron también 1,5 gramos del aceite obtenido de *Lepidocybium flavo-brunneum*. Al tercero, 7,5 gramos de carne de *Lepidocybium flavo-brunneum*. Al cuarto grupo, 1,5 gramos de aceite de *Ruvettus pretiosus*, y al quinto, 7,5 gramos de la carne. A los dos días, la mayoría de las ratas con dieta de carne o aceite mostraron el primer signo de seborrea: manchas de aceite en el pelo de alrededor de la boca y panza. Al séptimo día todas las ratas de estos grupos que sobrevivieron tenían húmedo todo el cuerpo. Generalmente la diarrea se observó en estos animales entre el tercer y séptimo día. Las ratas murieron dentro de los diez primeros días con pocas excepciones.

Mori et al analizaron la composición en ácidos grasos y alcoholes grasos de las ceras, y la de ácidos grasos de los glicéridos, resultando que los principales alcoholes grasos de las ceras eran el alcohol cetílico (16:0) y el alcohol oleico (18:1), que juntos sumaban un 58% del total en *Lepidocybium flavo-brunneum* y un 78% en *Ruvettus pretiosus*. Estos alcoholes iban seguidos por el eicosenoico (20:1) y el esteárico (18:0) en el primer pez, y por el palmitoleico (16:1) y esteárico (18:0) en el segundo. En cuanto a los ácidos grasos de las ceras, predominaba el oleico (18:1) seguido en ambas especies por el eicosenoico (20:1). Se apreciaron algunas diferencias en los ácidos grasos que se encontraban en menor proporción en ambas

especies, especialmente en los ácidos grasos altamente insaturados. También en los glicéridos los ácidos grasos principales eran el oleico (18:1) y eicosenoico (20:1).

Como conclusión, Mori et al atribuyeron la alta mortalidad y seborrea de las ratas a la presencia de casi un 90% de ceras en los aceites obtenidos de estos peces. También encontraron interesante que los alcoholes grasos (especialmente los de *Ruvettus pretiosus*) se asemejaran bastante, en cuanto a su composición, a los del aceite de la cavidad de la cabeza de la "ballena esperma" (*Physeter catodon*). Como consecuencia de estos datos, los autores consideraron que estos peces eran más adecuados como fuente de ceras marinas que como alimento.

Nevenzel et al (1965) reexaminaron los lípidos de *Ruvettus pretiosus* con el propósito de confirmar la presencia y establecer las estructuras del 13% de ácidos grasos hidroxilados del total de ácidos grasos presentes, e investigar los ésteres tipo ceras para su comparación con datos no publicados previamente obtenidos de un segundo pez de la familia *Gempylidae*: *Lepidocybium flavo-brunneum*.

Las conclusiones de su investigación fueron las siguientes :

- el músculo de *Ruvettus pretiosus* contenía un 14,7% (en peso húmedo) de lípidos, con un 91,5% de ésteres tipo ceras (predominantemente de 34-36 átomos de carbono y con uno o dos dobles enlaces), 3,3% de triglicéridos, 3,4% de lípidos polares (incluyendo aquí ácidos grasos libres, alcoholes, monoglicéridos y diglicéridos) y 1,8% de fosfolípidos

- los lípidos del hígado contenían un 3,9% de ésteres tipo ceras (incluyendo ésteres de esteroides), 43,1% de triglicéridos, 37,8% de lípidos polares y 15% de fosfolípidos

- contrariamente al informe previo de Cox y Reid (1932), la grasa del músculo no contenía ácidos grasos hidroxilados

- los ácidos grasos mayoritarios en los ésteres tipo ceras del músculo eran oleico (18:1, 76,7%), eicosenoico (20:1, 11%) y docosenoico (22:1, 3,6%)

- en el hígado, los ácidos grasos mayoritarios en triglicéridos, fosfolípidos y como ácidos grasos libres eran oleico (18:1) y palmítico (16:0)

- los alcoholes grasos mayoritarios de los ésteres tipo ceras del músculo eran los alcoholes cetílico (16:0) y oleico (18:1)

- se confirmaron las conclusiones de Cox y Reid (1932) y de Tsujimoto y Koyanagi (1937) de que los lípidos del músculo de *Ruvettus pretiosus* estaban formados sobre todo por hexadecil oleato y oleil oleato. Esta conclusión se ratificó además por el aislamiento de los ésteres tipo ceras como una clase (93% de los lípidos totales), y la confirmación de la longitud de sus cadenas por análisis en cromatografía gas-líquido

- la columna SE-30 usada para los análisis de cromatografía gas-líquido de los ésteres tipo ceras no fue capaz de determinar los componentes que diferían en un solo doble enlace. Además, el constituyente 36:1 por ejemplo, no era un único compuesto, sino que estaba formado por dos ésteres principales que se diferenciaban en la posición del grupo éster con respecto a los extremos de las cadenas de carbono. Según Lefort et al (1961), estas diferencias estructurales se sabía que producían pequeñas pero concretas variaciones en los tiempos de retención. Con los ésteres tipo ceras de *Ruvettus pretiosus*, las diferencias podían acentuarse por la presencia de isómeros en los cuales las posiciones de los dobles enlaces también variaban. De tal modo, podía existir algún solapamiento de los tiempos de retención de los monoenos y dienos. La presencia en los alcoholes y ácidos grasos de *Ruvettus pretiosus* de isómeros posicionales de dobles enlaces no había sido establecida, pero se conocía para los

lípidos de otros peces, como los lípidos del músculo del atún (Roubal, 1963) y del aceite del cuerpo de menhaden (Stoffel and Ahrens, 1960)

- por último, el efecto purgativo del aceite de este pez no era debido a los ácidos grasos hidroxilados (como se pensó al principio) al no contenerlos el músculo *in vivo* de *Ruvettus pretiosus*, sino que lo más probable era que fuera debido simplemente a la suave acción lubricante de la gran cantidad de aceite contenida en la carne (una porción de 227 gramos de la carne, en peso húmedo, contenía unos 39 ml de aceite), aumentada por la relativamente pobre absorción de los ésteres tipo ceras en el intestino.

En el año 1969, dos investigadores japoneses, Sato y Tsuchiya, estudiaron las propiedades purgativas de los lípidos de *Ruvettus pretiosus*. Para ello extrajeron los lípidos de varios tejidos y los analizaron por cromatografía gas-líquido. Con los resultados de su estudio publicaron dos trabajos. El primero (Sato et al, 1969), trataba sobre la composición en alcoholes y ácidos grasos de los lípidos. El pez utilizado fue un ejemplar capturado en la costa de Okinawa en mayo de 1965, desembarcado en Yaizu (Shizuoka) y congelado hasta su uso. Pesaba 6 kilos y tenía 83 centímetros de longitud. Se dividió en porciones: zona dorsal, ventral, cola, zona subcutánea (desde la superficie hasta 5 mm de profundidad), zona más interna de la carne (desde los 45 a los 50 mm de profundidad), carne más oscura, piel, espinas, hígado y corazón.

El contenido en lípidos resultó ser de 13 a 18% . La carne dorsal contenía un mayor porcentaje que la ventral (16,45% frente a 13,63%), y la zona subcutánea era más grasa que la interna (17,93% frente a 14,72%). La piel y las espinas contenían el mayor porcentaje de lípidos: entre 20 y 22% . El hígado contenía un 19,1%, valor inferior al 26,1% obtenido por Nevenzel

et al (1965). Esto pudo ser causado por la diferente época de captura o las distintas condiciones de alimentación. El corazón sólo contenía un 2,1%.

Los ácidos grasos de los lípidos de la carne, piel y espinas eran principalmente oleico (18:1), palmitoleico (16:1) y eicosenoico (20:1), mientras que los de corazón e hígado eran, de mayor a menor porcentaje, oleico (18:1), docosahexenoico (22:6) y esteárico (18:0). Tanto en este estudio como en el de Mori et al (1966,a), no se encontraron los ácidos grasos hidroxilados comentados por Cox y Reid en 1932.

En cuanto a los alcoholes grasos, los porcentajes eran: 40-50% de alcohol cetílico (16:0), 15,9-22,4% de oleico (18:1) y 7,6-13,1% de palmitoleico (16:1). La zona dorsal y la subcutánea contenían un 10% más de alcohol cetílico que el resto de las zonas. Por el contrario, los contenidos de palmitoleico (16:1), esteárico (18:0) y eicosenoico (20:1) eran menores que en otras zonas. Los lípidos del hígado y corazón contenían los alcoholes docosenoico (22:0), docosadienoico (22:2) y tetracosenoico (24:0), que no se encontraron en el resto de las zonas.

En el segundo trabajo (Sato et al, 1970), se estudiaba la composición de la materia insaponificable y la acción purgativa del aceite en ratones. La relación entre materia saponificable e insaponificable era de 55-60% en la carne, 61,5-75,6% en la piel y espinas y 96,3% en el hígado (los lípidos del hígado eran en su mayoría triglicéridos). Se confirmó que la grasa de *Ruvettus pretiosus* contenía principalmente ceras, con una pequeña cantidad de triglicéridos. Los lípidos totales de los testículos y vísceras contenían un 28-45% de triglicéridos y un 22-41% de ceras. La materia insaponificable estaba formada por un 91-96% de alcoholes grasos y 2-5% de lípidos polares (fosfolípidos en su mayoría), con pocos hidrocarburos

(principalmente escualeno) y esteroles (colesterol).

Se experimentó con ratones, mediante administración oral de aceite de *Ruvettus pretiosus*, aceite del músculo de la "ballena esperma", aceite del tejido adiposo de la "ballena esperma", aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de semilla de algodón y aceite de saurio. Al mismo tiempo se emplearon otros agentes purgantes como sulfato de magnesio, aceite de ricino, ácido ricinoleico, extracto de ruibarbo, glicerol y alginato sódico, para su comparación con la propiedad purgante del aceite de *Ruvettus pretiosus*. La cantidad de muestra administrada era de un 0,1-5% del peso del ratón (los ratones pesaban unos 20 gramos de media). Se encontró que la propiedad purgante del aceite de *Ruvettus pretiosus* en los ratones era distinta de la diarrea común. En otras palabras, las heces no eran líquidas, sino blandas, compuestas en su mayoría por comida no digerida. Al mismo tiempo, una sustancia cérea era excretada por separado desde las entrañas, no mezclada con la comida sin digerir. Sato y Tsuchiya designaron este síntoma como una evacuación blanda y cérea. También advirtieron que la mitad inferior del cuerpo del animal estaba manchada frecuentemente de la sustancia cérea.

Seguidamente el aceite de *Ruvettus pretiosus* se dividió en dos fracciones: materia saponificable e insaponificable. Las dos se administraron oralmente por separado. La materia saponificable produjo una diarrea grasa, mientras que la insaponificable provocó una evacuación blanda y cérea, como en el caso del aceite completo de *Ruvettus pretiosus*. Al incrementar la cantidad de materia insaponificable, aumentaba la evacuación. Sin embargo, la cantidad de heces en los ratones disminuía cuando los lípidos se administraban en más del 2% del peso del animal por día. En este caso se observó que el tubo digestivo del animal estaba hinchado con el alimento, y el hígado congestionado.

Se desconocía que ocurriera purgación al tomar una gran cantidad de aceite común vegetal compuesto principalmente por glicéridos. Pero estos autores demostraron que los animales de experimentación alimentados con una dieta que incluía aceite de sésamo o aceite de semilla de algodón, en una cantidad superior al 1,5% del peso corporal por día, sufrían una diarrea grasa. El aceite de saurio provocó también el mismo síntoma. El aceite obtenido del tejido adiposo de la "ballena esperma", que estaba compuesto fundamentalmente por ceras, causó una evacuación blanda bastante pequeña, y al mismo tiempo la cera no absorbida fue expulsada, no mezclada con la materia fecal. Además, el tubo digestivo estaba expandido con el alimento, como en el caso del aceite de estos peces. Sin embargo, el aceite proveniente del músculo de la "ballena esperma", con un contenido bajo de cera y alto de glicéridos produjo un flujo grasoso.

Los laxantes comunes usados en medicina fueron clasificados en tres grupos en el libro "Yakurigaku" de Morishima (1957):

- el extracto de ruibarbo, aceite de ricino, ácido ricinoleico y glicerol estimulan el tubo digestivo, activando la motilidad gastrointestinal.

- las sales inorgánicas como el sulfato de magnesio, degeneran las vellosidades intestinales, suprimiendo la absorción de alimento.

- el alginato sódico, que no es digerido en el tubo digestivo, causa una evacuación mecánica.

El aceite con alto contenido en glicéridos producía una diarrea grasa, dificultando la función intestinal, y a menudo con un efecto letal en el ratón, mientras que el aceite con pocos glicéridos causaba una pequeña acción purgante. Al comparar el aceite de ricino con el ácido ricinoleico (principal componente del aceite de ricino), el último era más purgante que el primero.

Esto significaba que el ácido ricinoleico estimulaba más el tubo digestivo que el aceite de ricino, y provocaba un mayor peristaltismo. Por otro lado, el aceite de ricino se hidrolizaba en parte en el tubo digestivo, y el ácido ricinoleico producido causaba la peristalsis al animal, mientras que la mayoría del aceite no hidrolizado bajaba mecánicamente por el tubo digestivo, como hace el aceite común comestible. Un alto contenido en ácido ricinoleico tenía un efecto dañino en el ratón, y frecuentemente lo mataba. El alginato sódico, que actuaba como lubricante en el tubo digestivo, producía una evacuación blanda que no era fluida, pero que se parecía en aspecto a la del aceite del pescado.

Al considerar que la materia insaponificable de *Ruvettus pretiosus* estaba formada principalmente por alcoholes grasos, con un poco de escualeno, colesterol y fosfolípidos, sus propiedades purgantes parecían ser causadas por los alcoholes, complementados con el papel de la pequeña cantidad de escualeno. Según Sato y Tsuchiya, la actividad purgante se debía en gran parte al alto contenido en ceras del aceite de *Ruvettus pretiosus*, junto con el papel parcial de los alcoholes grasos de cadena larga. De esta manera explicaban el que la actividad purgante de la materia insaponificable (con sólo alcoholes grasos) fuera menor que la del aceite al completo (con un alto contenido en ceras). Las ceras eran fundamentalmente responsables de una acción mecánica como lubricante, pero no actuaban como estimulante químico. Por tanto, su acción recordaba en cierto sentido a la del alginato sódico. En general, la actividad purgante del aceite era debida no sólo al contenido en ceras, sino también a los triglicéridos del aceite. La administración por separado a los ratones de una única dosis de cera y de triglicéridos provocó diferentes síntomas: la cera, una evacuación blanda y cérea, y los triglicéridos, una diarrea grasa. Como la grasa de *Ruvettus pretiosus* estaba formada por

ceras y triglicéridos, su actividad purgante muestra ambos síntomas, pero es bastante característica la evacuación blanda y cérea debida al alto contenido en ceras.

Kinumaki et al (1977) publicaron un trabajo sobre el valor nutritivo de peces con gran cantidad de alcoxidiglicéridos o ésteres tipo ceras. Estudiaron la composición química de la carne de *Centrolophurus niger* y *Lepidocybium flavo-brunneum*, que contenían un 22,5% y 20,6% de lípidos totales, de los cuales un 29,6% y 47,1% respectivamente eran materia insaponificable. La carne desengrasada comprendía un 88,4% y 87,0% de proteínas, y un 0,5% y 0,7% de lípidos respectivamente. Los lípidos de *Centrolophurus niger* eran tóxicos para las ratas en crecimiento. Las digestibilidades de los lípidos de *Centrolophurus niger* y *Lepidocybium flavo-brunneum* eran de 83 y 73% respectivamente. Los niveles de crecimiento de las ratas alimentadas con los lípidos de ambas especies, diluidos en diez volúmenes de aceite de soja, eran similares a los del grupo control. El crecimiento de las ratas alimentadas con una dieta que contenía carne desengrasada de cada especie era menor que el del grupo control.

Un grupo de investigadores rusos, (Levanidov et al, 1979) estudiaron los lípidos del tejido muscular del pez graso *Ruvettus pretiosus*. Los lípidos fueron extraídos con cloroformo, separados por cromatografía y determinados cuantitativamente. Se caracterizaban estos lípidos por un alto contenido en materia insaponificable (40,3% de los lípidos totales), de la cual un 75% eran ceras. Los ácidos grasos en mayor proporción fueron 18:1 (oleico), 20:2 (eicosadienoico) y 20:5 (eicosapentenoico), mientras que los alcoholes grasos mayoritarios eran cetílico (16:0), octadecílico y oleico (18:1).

Un grupo de investigadores sudafricanos (Berman et al, 1981) publicó un trabajo sobre la keriorrhea (paso de aceite *per rectum*) tras la ingestión de ésteres marinos tipo ceras procedentes de *Lepidocybium flavo-brunneum*. Este pez es frecuentemente capturado junto al atún por pescadores de la costa sudafricana, y esporádicamente aparece en los mercados locales bajo la etiqueta de "pez manteca", término que se da normalmente a algunas especies de peces pertenecientes a las familias *Stromateidae* y *Nomeidae*, debido a su carne blanca, sabrosa, y con textura parecida a la manteca.

El problema clínico que surge tras la ingestión del pez fue apreciado por primera vez durante una reunión de rutina del personal del Departamento de Patología Química del Hospital Groote Schuur de la Universidad de Ciudad del Cabo. En ella, el doctor J. Carter enseñó una muestra de aceite marrón que había pasado por el recto de una paciente que no se había ofrecido como voluntaria para ningún régimen alimenticio que viniera al caso. Uno de los autores del artículo, presente en la reunión, observó que él había pasado por una experiencia similar durante un día o dos tras la ingestión del "pez manteca". Averiguaciones posteriores mostraron que más individuos podían acordarse de experiencias similares. Se efectuó por tanto una investigación para determinar con mayor detalle la naturaleza y la causa de este estado clínico, aparentemente no tan extraordinario.

Para confirmar las observaciones iniciales, dos de los autores consumieron cada uno cerca de 500 gramos de carne cocida de *Lepidocybium flavo-brunneum*. Durante doce horas no se apreciaron síntomas, tras las cuales el aceite comenzó a pasar por el recto. La dificultad para contener el aceite que se depositaba en cantidades apreciables en la parte baja del recto requería su frecuente evacuación. En una ocasión pasaron aproximadamente diez mililitros de aceite puro. El aceite era de

color naranja claro o verde, inofensivo, y en la mayoría de las ocasiones no contaminado significativamente con materia fecal. Esto, junto a que no se produjeron calambres en el vientre o molestias en las vísceras, significaba que las frecuentes defecaciones eran causadas más por el efecto lubricante del aceite que por alguna acción irritante.

El análisis químico preliminar de la composición del aceite que pasaba por el recto mostró que contenía ácidos grasos, pero no se detectaron ni colesterol ni glicerol, lo que sugería que el material no era un triglicérido, sino un éster tipo cera. Esto fue confirmado por cromatografía en capa fina. La carne del pez contenía un 23% de grasa en peso. Esta grasa presentaba el mismo cromatograma que los ésteres tipo ceras excretados, lo que sugería que los ésteres tipo ceras no sufrían cambios durante su paso a través del tubo digestivo humano. La hidrólisis del material que pasaba por el recto y de la grasa extraída del pescado fresco tenía como resultado la desaparición de la mancha de los ésteres tipo ceras en el cromatograma en placa fina, y su sustitución por manchas correspondientes a ácidos grasos libres y alcoholes grasos de cadena larga. El fraccionamiento de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que componían los ésteres tipo ceras por cromatografía gas-líquido mostró que el compuesto predominante era el ácido graso oleico, (18:1, 80%), seguido del eicosenoico (20:1, 15%), palmitoleico (16:1, 2%) y docosahexenoico (22:6, 2%). En cuanto a los alcoholes grasos, su composición resultó la siguiente: cetílico (16:0), 43%; oleico (18:1), 16%; eicosenoico (20:1), 15%; esteárico (18:0), 10%; palmitoleico (16:1), 5%; mirístico (14:0), 3% y margárico (17:0), 2% .

Según Berman et al, la fuente esencial de los ésteres tipo ceras en *Lepidocybium flavo-brunneum* (o al menos de los alcoholes grasos de los ésteres) era el zooplancton. Sin embargo,

la mayoría de los depredadores de zooplancton, como el arenque o la sardina, no acumulan ésteres tipo ceras. Esto es así porque la mayoría de los peces pueden secretar una lipasa intestinal capaz de hidrolizar los ésteres tipo ceras, y luego el alcohol graso hidrofóbico es oxidado hasta su ácido graso correspondiente. Este último paso, al menos, no puede ocurrir presumiblemente en *Lepidocybium flavo-brunneum* y otros vertebrados que acumulan ceras, como *Ruvettus pretiosus*, *Latimeria chalumnae* o la "ballena esperma".

Como conclusión, los autores señalaron que la alta proporción de ésteres tipo ceras, junto con su resistencia a los enzimas digestivos y su bajo punto de fusión, provocaban la introducción en el recto de volúmenes significativos de aceite, cuya cualidad lubricante era la causante de las frecuentes evacuaciones. Pero a pesar de los alarmantes estudios previos en animales (Mori et al, 1966,a), las cantidades de estos peces disponibles en una sola vez para su consumo humano limitaban la morbosidad a estas frecuentes defecaciones durante el periodo de unas pocas horas en que pasa el aceite por el recto, que además se podían considerar más como visitas de naturaleza profiláctica para evitar el ensuciamiento de la ropa, que incapacidad para retardar la evacuación del contenido del recto. El fenómeno no era por tanto estrictamente hablando una diarrea, definida como un paso más rápido y fluidez de la materia fecal. Como el material que pasaba era una cera fluida, los autores propusieron como término más apropiado *keriorrhea* (del griego *keras*, cera, y *diarrhein*, fluir). Además, algunos habitantes de las islas del Pacífico estiman mucho estos peces, lo que demostraba que los síntomas señalados más arriba no eran necesariamente un impedimento para su consumo. Los especialistas en medicina general deberían por tanto estar advertidos de los efectos de estos aceites marinos, de manera que pudieran informar de su

causa a los pacientes que mostraran los síntomas de keriorrhea.

El uso como alimento del "escolar" (*Lepidocybium flavo-brunneum*) y del "pez con aceite de ricino" (*Ruvettus pretiosus*), está prohibido en Japón por el ministerio de Salud y Bienestar, al ser ambos ricos en ceras (Halstead, 1967). Durante los años 80, *Ruvettus pretiosus*, y sobre todo *Lepidocybium flavo-brunneum*, fueron estudiados en Japón por una serie de grupos de investigación pertenecientes a distintos Institutos de Salud Pública.

En 1984, el Instituto de Salud Pública de Shizuoka (Ukishima, 1979) realizó un estudio encaminado a intentar distinguir entre trozos de estos peces prohibidos y trozos de peces comestibles, mediante el análisis de las ceras. Se extrajeron los lípidos de *Ruvettus pretiosus*, *Zeus faber*, y de otros 25 peces comestibles. Las ceras se detectaron en los lípidos de *Ruvettus pretiosus* y *Zeus faber* por cromatografía en capa fina, y luego fueron analizadas por cromatografía gaseosa - espectrometría de masas. Las ceras encontradas en mayor proporción en los lípidos de *Ruvettus pretiosus* y *Zeus faber* fueron respectivamente $C_{34}H_{66}O_2$ y $C_{40}H_{76}O_2$. Al saponificar se separaron de las ceras los alcoholes grasos de cadena larga, siendo los principales cetílico (16:0) y oleico (18:1) en *Ruvettus pretiosus*, y docosenoico (22:1) y eicosenoico (20:1) en *Zeus faber*.

Fukasawa et al (1982, Pub. 1983) estudiaron en el Instituto de Salud Pública de Kofu los lípidos de *Ruvettus pretiosus* y *Lepidocybium flavo-brunneum*, en este caso para identificar la causa de la diarrea producida en los humanos tras su ingestión. Se observó que en los dos peces, más del 60% de los lípidos totales eran ésteres tipo ceras.

Un grupo de investigadores del Instituto de Salud Pública de Osaka (Kawai et al, 1985) se dedicó al estudio de la composición lipídica de varios tejidos de *Lepidocybium flavo-brunneum* (músculo, intestino, hígado, corazón, riñón, ovario y contenido intestinal). El músculo e hígado contenían un alto porcentaje de lípidos. Además los lípidos de músculo, intestino y contenido intestinal comprendían grandes cantidades de materia insaponificable (eran tejidos con alta proporción de insaponificable), mientras que los lípidos del corazón, riñón, ovario e hígado contenían sólo pequeñas cantidades (tejidos con baja proporción de insaponificable). Los lípidos del tejido con alta proporción de insaponificable eran predominantemente ésteres tipo ceras, y la materia insaponificable estaba formada por alcoholes grasos. Se estudió la distribución específica de ésteres tipo ceras en los tejidos: 94,3% en músculo, 84,4% en intestino, 3,3% en hígado, 24% en corazón, 22,2% en riñón, 22,5% en ovario y 26,1% en el contenido intestinal. En los ésteres tipo ceras el principal ácido graso era el oleico (18:1). En las otras fracciones lipídicas, los ácidos grasos palmítico (16:0) y docosahexenoico (22:6) tenían mayores porcentajes, aunque más bajos que el oleico. Los alcoholes grasos cetílico (16:0) y oleico (18:1) eran los más importantes en los ésteres tipo ceras, alcanzando hasta alrededor de un 80% del total. Los lípidos de los tejidos con baja proporción de insaponificable (especialmente el hígado) contenían grandes cantidades de ácidos grasos libres que se formaban aparentemente por hidrólisis de los triglicéridos durante el almacenamiento en el congelador.

Por último, Ukishima (1987) vuelve a trabajar con *Lepidocybium flavo-brunneum*, purificando y refinando la cera obtenida del mismo para su uso farmacéutico y cosmético. Observó que el músculo de *Lepidocybium flavo-brunneum* contenía aproximadamente un 20% de lípidos, de los cuales un 88,8% eran

ceras. Esta cera estaba compuesta por ésteres de longitud desde C_{32} a C_{38} , de los cuales el principal era $C_{34}H_{66}O_2$. En el insaponificable, los alcoholes grasos principales eran el cetílico (16:0) y el oleico (18:1), igual que en el caso de la cera de la ballena esperma (*Physeter catodon*). En la materia saponificable de la cera, el ácido graso principal era el oleico. La cera del pez se purificó por desacidificación, decoloración con arcilla activada e hidrogenación con catalizador Cu-Cr. La cera purificada era semisólida a temperatura ambiente, y olía ligeramente a margarina. Su seguridad se ensayó con toxicidad aguda, irritación de la piel, irritación de la membrana mucosa del ojo y sensibilización por contacto, con el resultado de que la cera purificada era altamente segura para su uso farmacéutico o cosmético.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. 1. MUESTRAS

Se utilizaron tres peces de la especie *Ruvettus pretiosus*, pertenecientes a la familia *Gempylidae*, orden *Perciformes*.

Los ejemplares fueron capturados en el verano de 1991 en la isla de El Hierro (Islas Canarias) y mantenidos hasta su uso en congelación a -30°C , tanto en el almacenamiento en Canarias, traslado, y posterior almacenamiento en Sevilla.

Los dos primeros ejemplares medían 0,6 metros de longitud, mientras que el último ejemplar medía 1 metro.

Los peces fueron divididos en porciones, para su posterior procesado por separado (ver figura 3).

- Por un lado se analizaron distintas zonas musculares: dorsal, ventral, cola, subcutánea, periosteas.

- Por otro lado, distintos órganos: hígado, testículos, vesícula biliar.

- Por último, se analizó el tuétano de las espinas, y se hizo una sopa al modo canario, que consistió en el cocimiento de una porción del pescado con espinas, tomando la capa superior grasa de esta sopa para su análisis. Este tipo de sopa es utilizada en dicha región como laxante.

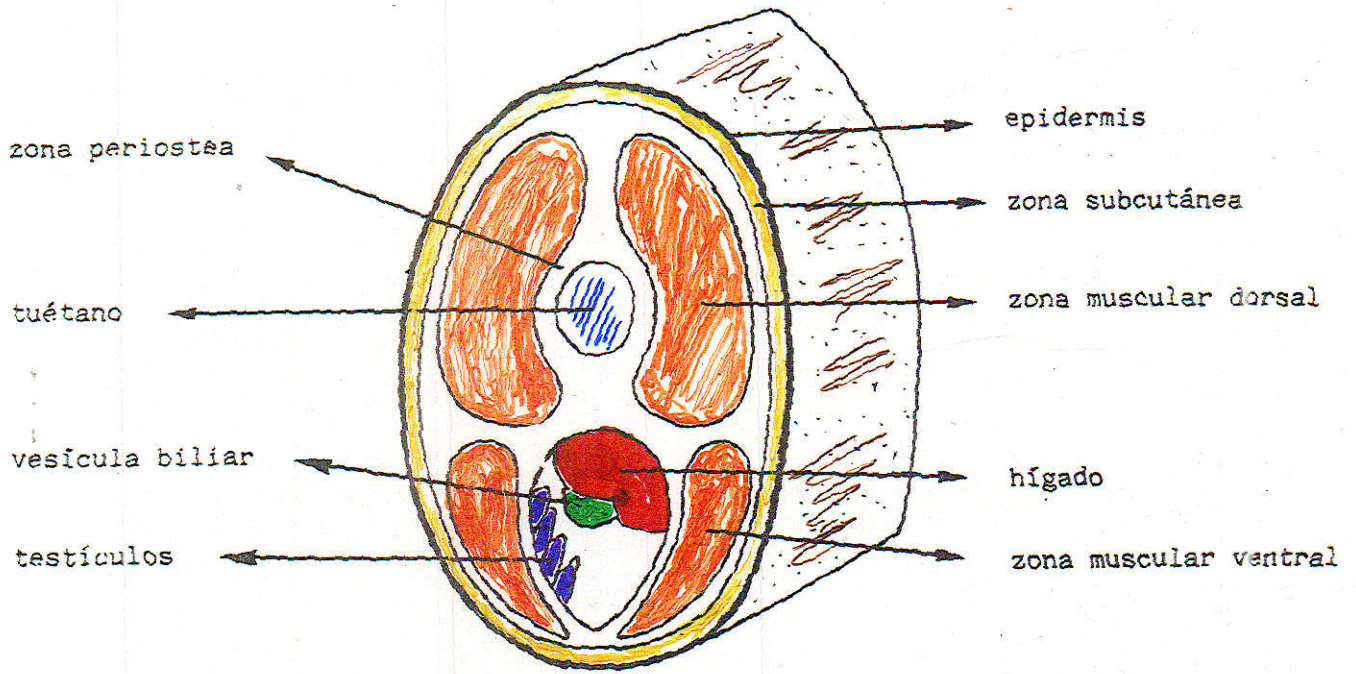


FIGURA 3

III. 2. REACTIVOS

- Para la preparación de soluciones se emplearon reactivos de Panreac (España), Sigma Chemical (U.S.A.) y Merck (Darmstadt, Alemania).

- El alcohol isopropílico, éter de petróleo, éter etílico, éter isopropílico, metanol y cloroformo fueron suministrados por Panreac (España).

III. 3. APARATOS

- Para el análisis de ácidos grasos y alcoholes grasos se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Series 5890 con detector de ionización de llama. La columna empleada en el análisis de los ácidos grasos fue una capilar de sílice fundida Supelcowax 10 (60m x 0,25mm I.D., de espesor de membrana 0,25µm), suministrada por Supelco (Bellafonte PA, USA). En el análisis de los alcoholes grasos se utilizó una columna capilar SP-2100., también suministrada por Supelco.

- Los datos de espectrometría de masas se obtuvieron con un sistema automático de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS), compuesto por un cromatógrafo de gases HP-5890 acoplado directamente a un espectrómetro de masas AEI MS-30 VG/70 y un sistema de datos VG-11/250 (VG Analytical, Manchester, UK).

- Para la cuantificación de las clases de lípidos y fosfolípidos se utilizó un Iatroscan (Technical Marketing Associates, Mississauga, Ont.) equipado con un detector de llama, scanner, integrador y registrador.

- Balanza analítica de precisión Mettler tipo AJ 100.

- Placa calefactora Selecta Agimatic N, con agitador magnético incorporado.

- Extendedor de placas para cromatografía en capa fina TLC Spreader (Quickfit) (Corning Limited Laboratory Division).

III. 4. ANÁLISIS DE LOS LÍPIDOS

III.4.1. Aislamiento de los lípidos

La fracción lipídica de los distintos tejidos del pez se extrajo por el método de Folch et al (1957). La muestra de tejido, previamente pesada, se troceó y trituroó en Omnimixer. Se homogeneizó con una agitadora (modelo Agimatic N, Selecta) durante dos horas a 900 rpm, en 10 volúmenes de una mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v) que contenía un 2% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. El extracto se mezcló en un embudo de decantación con 0,2 volúmenes de cloruro potásico al 0,8 % (0,1 M), con objeto de romper la emulsión formada, permitiendo la separación de fases.

Aparecieron dos fases:

- metanólica: superior, formada por metanol y la solución de KCl.
- clorofórmica: inferior, conteniendo los lípidos.

Las fases se encontraban separadas por una interfase que contenía los precipitados de proteínas.

La fase clorofórmica se recogió directamente sobre un matraz de rotavapor, previamente tarado, a través de un filtro con sulfato sódico anhidro, para eliminar posibles restos de agua.

Los extractos clorofórmicos se evaporaron hasta sequedad calculándose el peso del residuo seco (fracción lipídica). Se pudo así averiguar el porcentaje de grasa en las distintas porciones de tejidos. (Ver resultados en tablas 1, 2

y 3). Posteriormente se almacenaron en tubos de vidrio con cierre de teflón en atmósfera de nitrógeno. Dichos residuos se mantuvieron en frigorífico a 3°C hasta su uso.

III.4.2. Obtención del insaponificable

La obtención del insaponificable se realizó basándose en la norma UNE española 55004, pero partiendo de 2,5 gramos de grasa, y añadiéndose por tanto la mitad de las cantidades que se indicaban en la norma.

* Los insaponificables se prepararon en tandas de tres.

1) 2,5 gramos de materia grasa de cada muestra se pesaron en matraces de 250 ml.

2) Se prepararon 100 ml de potasa alcohólica 1 N (5,6 g de KOH en 100 ml de alcohol 96°).

3) Se añadieron 25 ml de potasa alcohólica 1 N a cada matraz, con un embudo.

4) Los matraces se colocaron en una placa previamente calentada, adaptando a la boca del matraz un refrigerante de reflujo (para no perder el alcohol), y cuando empezaron a hervir se contó una hora, cuidando que no se calentara demasiado la parte superior de la varilla de reflujo, porque entonces se evaporaría también el alcohol.

5) Tras retirar los matraces de la placa, se separaron del refrigerante, y se añadieron 50 ml de agua destilada en cada matraz. Se agitó un poco para que se mezclara bien, trasvasando luego el contenido del matraz a un embudo de extracción de 500 ml.

6) Cada matraz se enjuagó con 50 ml de éter etílico, vertiendo el éter en la ampolla, tapando y agitando

vigorosamente, y colocando por último la ampolla vertical para que se separaran las dos capas (hasta que se vieran transparentes).

7) Se extrajo la fase alcohólica-acuosa jabonosa (la fase inferior) y se vertió en el matraz empleado para la saponificación. La fase etérea (la superior) se pasó a una segunda ampolla de extracción de 500 ml que contenía 20 ml de agua, cuidando de que la interfase quedara en la ampolla.

8) La fase hidroalcohólica se añadió de nuevo a la primera ampolla de extracción, y se extrajo dos veces más con porciones de 50 ml de éter, reuniendo las tres fracciones de éter en la segunda ampolla de extracción.

9) Se agitaron suavemente las tres fracciones de éter con los 20 ml de agua que contenía la segunda ampolla, se dejó reposar, y tras separarse las fases, se tiró la fase inferior (el agua de lavado).

10) Las ampollas de extracción se lavaron dos veces, con 20 ml de agua cada vez, dejando luego que reposaran hasta que la fase inferior acuosa estuviera transparente.

11) Se lavó entonces con 20 ml de KOH acuosa 0,5 N (2,8 g de KOH en 100 ml de agua), lavando luego con 20 ml de agua.

12) De nuevo se lavó con 20 ml de KOH acuosa 0,5 N, dejando luego reposar durante unos 15 minutos.

13) Se lavó tres veces como mínimo con 20 ml de agua cada una, continuando los lavados con agua hasta que las aguas de lavado no dieran coloración rosa por adición de unas gotas de disolución de fenolftaleína (1 g de fenolftaleína en 100 ml de etanol 96%).

14) La fracción etérea con el insaponificable se recogió en un matraz previamente tarado de 200 ml de capacidad, pasando por un embudo con sulfato sódico anhidro (para eliminar

posibles restos de humedad). Luego se lavó tres veces la ampolla con porciones de éter y también el filtro.

15) Se llevó a destilar, colocándoles una camisa de Soxhlet y un enfriador. Cuando quedaba por destilar aproximadamente un centímetro entre el borde del pocillo donde se calentaba y el filo del líquido a destilar, se desconectó la destilación, terminando de eliminar el disolvente volátil en un rotavapor (unos 45 minutos), cuidando de no calentar a una temperatura superior de 40°C.

16) Una vez obtenidos los residuos secos de los insaponificables, se pesaron, obteniendo así los porcentajes de fracción insaponificable de las zonas musculares de *Ruvettus pretiosus* (ver tabla 4 con los resultados).

III.4.3. Cromatografía en capa fina

Una vez aisladas las fracciones lipídicas, los distintos tipos de lípidos a estudiar, a saber: fosfolípidos, colesterol, diglicéridos, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres de colesterol se separaron mediante cromatografía en capa fina.

PREPARACIÓN DE LAS CROMATOPLACAS

Antes de proceder al extendido de la pasta del adsorbente, se procedió a la limpieza cuidadosa de la superficie de las placas de vidrio de 20x20 cm, pasando por encima un algodón empapado con hexano. A continuación se extendió la pasta, efectuando el desplazamiento del repartidor de una manera continua para lograr la mayor homogeneidad posible de la capa de sílice.

Para la preparación de la pasta, en un erlenmeyer de unos 200 ml de capacidad se introdujeron 30 g del adsorbente (Silicagel tipo 60 G, Merck), añadiendo luego 60 ml de agua destilada. Se ajustó un tapón, y se agitó enérgicamente durante 2 minutos. Transcurrido el tiempo indicado, se vertió la masa en el repartidor, y se extendió sobre las placas, con un espesor de 0,25 mm, cuidando de realizar toda la operación en el tiempo más breve posible. Se dejaron secar las placas en el mismo aparato unos 30 minutos, tras los cuales se pasaron a un soporte y se activaron en estufa regulada a 120°C durante 2 horas, estando entonces listas para su uso.

PREPARACIÓN DE LA CUBETA

En la cubeta de desarrollo se dispusieron 200 ml de mezcla eluyente [hexano:éter etílico:ácido acético 80:20:1 (v/v/v)], de manera que al colocar la placa en su interior, se sumergiera un centímetro de la capa de sílice, quedando la superficie del líquido por debajo de la zona de aplicación del problema. Se tapó la cubeta y se esperó una 3 horas, tiempo necesario para lograr que se estableciera el equilibrio líquido-vapor.

APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Volúmenes apropiados de las soluciones a ensayar (fracciones lipídicas previamente pesadas y diluidas en 2-3 gotas de cloroformo:metanol, 2:1) se aplicaron con ayuda de capilares sobre la línea base, situada a 2 cm del borde inferior de la placa, y a 2,5 cm de los bordes derecho e izquierdo, con una separación de las aplicaciones entre sí de 1-2 cm. Una vez secas las muestras, se introdujo la placa en la cubeta, sumergiéndola en el eluyente alrededor de 1 cm. Se cubrió la cubeta y se dejó

desarrollar a la temperatura ambiente de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, de forma ascendente, hasta que el frente del disolvente alcanzó los 15 cm de longitud contados a partir de la línea base, procediendo entonces a sacar la placa de la cubeta y dejar evaporar el disolvente.

DETECCIÓN DE LAS MANCHAS SOBRE EL CROMATOGRAMA

La placa se pulverizó con el reactivo de revelado [una mezcla de agua:ácido sulfúrico (50:50)], y luego se procedió a carbonizar la placa.

De este modo se obtuvo una completa separación de los distintos componentes de la fracción lipídica. (Ver placa 1 y 2 en resultados).

También se separaron por cromatografía en capa fina los componentes de los insaponificables obtenidos por la norma UNE correspondiente, a partir de la fracción lipídica total. Para ello se redisolviéron los insaponificables en 5 ml de éter isopropílico cada uno. La mezcla de desarrollo usada fue hexano:éter etílico (70:30), y se reveló con mezcla ácido sulfúrico:agua (50:50), carbonizando la placa posteriormente.

Tras el desarrollo (ver placa 3 en resultados) se apreció una mancha muy grande, que fácilmente podía corresponder a los alcoholes grasos de las ceras descritas en la bibliografía. Para comprobarlo, se colocó en una misma placa una alícuota del insaponificable obtenido a partir de la fracción lipídica correspondiente a la zona muscular ventral, junto con dos de los alcoholes grasos más comunes (alcoholes oleico y esteárico), viéndose que coincidía la mancha grande del insaponificable con las de los alcoholes grasos. (Ver placa 4 en resultados). Como el único modo en que pueden aparecer alcoholes grasos en una

grasa es formando parte de ceras, queda demostrada la presencia de ceras en la fracción lipídica obtenida a partir de *Ruvettus pretiosus*.

Como ya se comentó en la bibliografía, las ceras son mezclas de ésteres de ácidos grasos largos (12-14 átomos de carbono) con alcoholes grasos (10-30 átomos de carbono). En la saponificación se desdoblan parcialmente, y los alcoholes grasos separados se identifican en el insaponificable.

III.4.4. Fraccionamiento de la grasa por columna de sílice

Para separar del total de la grasa la fracción con fosfolípidos en cantidad suficiente, y luego poder usarla para la cuantificación de las distintas clases de fosfolípidos, se tomaron 2 gramos de la grasa a fraccionar, y se mezclaron con 14 ml de hexano:éter etílico (90:10). La mezcla se añadió a una columna de elución rellena con sílice activada, y con un tapón de lana de vidrio en la extremidad del cuerpo intermedio. Tras eluirse la mezcla, se limpió la columna con 2-3 ml de hexano, obteniendo de esta forma la FRACCIÓN 1, que se recogió en un matraz pequeño en forma de pera.

Se vertieron en la columna 14 ml de éter isopropílico, limpiando después con 2-3 ml de éter isopropílico, obteniendo así la FRACCIÓN 2.

La FRACCIÓN 3 se obtuvo haciendo pasar 14 ml de alcohol isopropílico por la columna.

La FRACCIÓN 1 se evaporó en rotavapor, y se disolvió el extracto en 14 ml de hexano. Esta mezcla se eluyó por otra columna preparada de la misma manera, y tras lavar con 2-3 ml de hexano se obtuvo la FRACCIÓN 4.

Por último se hicieron pasar 14 ml de alcohol isopropílico por la segunda columna, recogiendo la FRACCIÓN 5.

Se efectuaron cromatografías en capa fina de las fracciones 2,3,4 y 5, junto con el aceite de partida, con mezcla de desarrollo hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1) y revelado con agua:ácido sulfúrico (50:50), carbonizando la placa posteriormente. (Ver placa 5 en resultados).

III.4.5. Cuantificación de las distintas clases de lípidos y fosfolípidos

Cada una de las muestras utilizadas se obtuvo disolviendo en 1 ml de mezcla cloroformo:metanol (2:1), 20 mg de los lípidos o fosfolípidos obtenidos de los distintos tejidos. De cada disolución se tomaron 3 µl para la cuantificación, que se realizó mediante separación sobre microvarillas de cuarzo recubiertas con sílice (Chromarod S) usando un aparato Iatroscan (Technical Marketing Associates, Mississauga, Ont.) equipado con un detector de ionización de llama (velocidad de flujo de H₂, 175 ml/min; velocidad de flujo de aire, 1850 ml/min), un scanner (velocidad de lectura, 0,47 cm/seg), un integrador y un registrador (sensibilidad, 10 mV; velocidad de carta, 0,42 cm/min). Las varillas (tipo S) fueron desarrolladas sucesivamente usando las siguientes mezclas:

1) cloroformo:metanol:agua:ácido acético (134:56:6:4)
(v/v/v/v).

2) hexano:éter etílico:ácido fórmico (99:100:1)
(v/v/v).

(Ver tablas 5, 6, 7 y 8, y cromatogramas 1-4 en resultados).

III.4.6. Cuantificación cromatográfica de ácidos grasos de lípidos totales

PREPARACIÓN DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS

La transmetilación se realizó de acuerdo con la norma UNE española 55-037-73. Para ello:

1) Una gota de fracción lipídica se colocó en un tubo Pyrex de 18 ml de capacidad.

2) Se saponificó con 3-4 ml de metilato sódico 0,2 N (5 g de sodio metal en un litro de metanol), cerrando el tubo tras agitar.

3) Durante 20 minutos se calentó a 120⁰C (40 minutos si se trataba de fosfolípidos), tras los cuales se dejó enfriar hasta 60-70⁰C, añadiendo entonces una gota de una disolución al 1% de fenolftaleína (1 gramo de fenolftaleína en 100 ml de metanol) como indicador de pH, debiendo adquirir color rosa fucsia.

4) Se neutralizó con 3-4 ml de una mezcla de sulfúrico al 6% en metanol anhidro (20 ml de ácido sulfúrico en un litro de metanol), cerrando el tubo tras agitar y calentando de nuevo 20 minutos a 120⁰C. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

5) 2 ml de hexano para cromatografía se añadieron, para de esta forma extraer los ésteres metílicos formados.

6) Se agregaron 5-10 ml de una solución de agua saturada con sal, lo que facilitó la separación de fases, quedando en la parte superior el hexano conteniendo los ésteres metílicos. Se agitó y dejó reposar después.

7) Con una pipeta Pasteur se recogió la porción superior, colocándola en un tubo Pyrex de 13 ml de capacidad con

tapón de teflón.

8) Se volvieron a hacer dos extracciones más con 2 ml de hexano cada una, recogiendo las porciones con los ésteres metílicos en el mismo tubo.

9) Por último se concentraron con una corriente de nitrógeno los extractos hexánicos que contenían los ésteres metílicos obtenidos en las tres extracciones hasta que quedaron 2-3 ml en el tubo, conservando la disolución en congelador a -30°C , y en atmósfera de nitrógeno.

ANÁLISIS DE LOS ÉSTERES METÍlicos DE ÁCIDOS GRASOS

Los extractos hexánicos concentrados se analizaron en un cromatógrafo de gases. Para ello, 1 μl de cada muestra se inyectó en el aparato, equipado con una columna capilar (ver sección aparatos), realizando un desarrollo isotérmico a 200°C durante 10 minutos, y programado de 200 a 260°C durante los 30 minutos siguientes, a una velocidad de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Como gas portador se utilizó helio, con una velocidad de 2 ml/min y 250 KPa de presión en cabeza de columna. La temperatura del inyector y detector fue de 275°C y el flujo del gas auxiliar (nitrógeno) de 25 ml/min.

Para el análisis por espectrometría de masas se utilizó la misma columna capilar y gas portador (helio), pero la temperatura de la columna se programó desde 130°C hasta 200°C , con una velocidad de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, siendo 250°C la temperatura del inyector. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: ionización por impacto de electrones, 70 eV; voltaje de aceleración, 4 kV; corriente de emisión, 100 μA ; temperatura de la fuente de iones, 200°C .

Cada ácido graso presente en el extracto se identificó mediante comparación de su tiempo de retención y espectro de masas con los patrones correspondientes.

(Ver tablas 9,10 y 11, cromatogramas 5-11 y espectros de masa 1-5 en resultados).

III.4.7. Cuantificación cromatográfica de ácidos grasos y alcoholes grasos de ceras

ÁCIDOS GRASOS

1) Se realizaron cromatografías en capa fina de las zonas musculares dorsal, ventral y periosteas, cada una en una placa.

2) Sólo una parte de la placa, suficiente para poder observar la situación de las distintas bandas, se reveló y quemó posteriormente.

3) La banda horizontal de la sílice conteniendo las ceras se delimitó con una varilla de punta fina y se raspó luego con una espátula pequeña, recogiendo el polvo en un papel satinado, e introduciéndolo seguidamente en un tubo Pyrex de 18 ml de capacidad.

4) Se procedió a la transmetilación siguiendo los pasos 2-9 explicados en el apartado III.4.6.

5) El análisis en cromatógrafo de gases se realizó de la misma manera que el de los ácidos grasos de lípidos totales. (Ver tabla 12 y cromatograma 12 en resultados).

ALCOHOLES GRASOS

1) Se realizaron cromatografías en capa fina de los insaponificables obtenidos de las zonas musculares dorsal, ventral y periosteal, cada una en una placa.

2) Se procedió al revelado del mismo modo que en el caso de los ácidos grasos.

3) La banda horizontal de la sílice conteniendo los alcoholes grasos se raspó con una espátula pequeña, recogiendo el polvo en un papel satinado, e introduciéndolo seguidamente en una pequeña columna de elución, que había sido preparada colocando un tapón de algodón en la extremidad del cuerpo intermedio de la columna.

4) Tras colocar bajo la columna un matraz de 25 ml en forma de pera, se añadieron 5+2 ml de éter isopropílico goteando por las paredes, para así arrastrar la muestra que hubiera quedado adherida.

5) La disolución eluida se evaporó en rotavapor hasta que quedó un residuo seco.

6) El residuo se silanizó. Para ello se disolvió en 2 ml de acetonitrilo, añadiendo después 0,1 ml de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y 10% de trimetil-clorosilano (TMCS), dejando reposar la mezcla durante 15 minutos.

7) Tras efectuar la silanización, la solución se evaporó hasta 0,5 ml con corriente de nitrógeno, y se procedió al análisis en cromatógrafo de gases. Para ello, 1 μ l de cada muestra se inyectó en el aparato, equipado con una columna capilar (ver sección aparatos), programando desde 160°C a 220°C durante 40 minutos, a una velocidad de 1,5°C/min. Como gas portador se utilizó helio, con una velocidad de 2 ml/min y

250 KPa de presión en cabeza de columna. La temperatura del inyector y detector fue de 250°C y el flujo del gas auxiliar (nitrógeno) de 25 ml/min. El análisis por espectrometría de masas se realizó de la misma forma que el de los ácidos grasos.

IV. RESULTADOS

IV.1. PORCENTAJES DE GRASA

IV.1.1. Zonas musculares

(Ver tabla 1)

El mayor porcentaje de grasa se encontró en la zona subcutánea, más cercana a la piel, con 21,40%. Los valores de la zonas musculares dorsal, ventral y periosteal resultaron ser muy parecidos (16,70%, 16,17% y 16,19% respectivamente), siendo algo menor el porcentaje en la carne blanca (15,43%) y en la cola (13,55%).

IV. 1.2. Órganos

(Ver tabla 2)

En los órganos existía una gran diferencia. El más graso era el hígado, con 22,66%, seguido por los testículos (3,77%) y la vesícula biliar (1,66%).

IV.1.3. Otros

(Ver tabla 3)

La porción grasa de la sopa contenía un 59,51% de grasa, mientras que el porcentaje de grasa en el tuétano era de 4,76%.

TABLA 1 : PORCENTAJES DE GRASA EN DISTINTAS ZONAS MUSCULARES DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

ZONAS MUSCULARES	%
Carne blanca	15,43 ± 3,01
Dorsal	16,70 ± 1,60
Ventral	16,17 ± 2,09
Carne subcutánea	21,40 ± 1,20
Zona periosteal	16,19 ± 0,04
Cola	13,55 ± 0,01

Resultados expresados en medias ± SD.

TABLA 2 : PORCENTAJE DE GRASA EN DISTINTOS ÓRGANOS DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

ÓRGANOS	%
Hígado	22,66 ± 2,02
Testículos	3,77 ± 0,52
Vesícula biliar	1,66 ± 0,30

Resultados expresados en medias ± SD.

TABLA 3 : OTROS PORCENTAJES DE GRASA.

	%
Tuétano	4,76 ± 0,12
Sopa	59,51 ± 3,27

Resultados expresados en medias ± SD.

IV.2. PORCENTAJES DE FRACCIÓN **INSAPONIFICABLE**

(Ver tabla 4)

Todas las zonas musculares de *Ruvettus pretiosus* eran tejidos que contenían lípidos con insaponificable alto, ya que ésta fracción constituyó casi la mitad del contenido total de lípidos.

Los valores de las fracciones insaponificables eran muy parecidos en las zonas musculares estudiadas. El mayor porcentaje correspondió a la zona periosteal, con 47,22%, seguida de la zona muscular dorsal (46,43%) y ventral (44,54%).

TABLA 4 : PORCENTAJES DE FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DE DISTINTAS ZONAS MUSCULARES DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

MÚSCULO	%
Dorsal	46,43 ± 2,01
Ventral	44,54 ± 2,50
Periosteo	47,22 ± 2,55

Resultados expresados en medias ± SD.

IV.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

IV.3.1. Zonas musculares

(Ver placa 1)

Como la mezcla de desarrollo utilizada (hexano:éter etílico:ácido acético, 80:20:1) estaba formada sobre todo por disolventes apolares, las manchas correspondientes a los componentes polares de la grasa tuvieron un Rf menor, y quedaron más cerca de la zona de aplicación de las muestras.

La mayor mancha apreciada en las tres zonas musculares correspondió a las ceras (ver explicación de placa 4). Los triglicéridos se observaron en dorsal y ventral, pero no en la cola. Los ácidos grasos libres se apreciaron ligeramente en dorsal, y los diglicéridos en dorsal y cola. Por último, en las tres zonas se observaron colesterol y fosfolípidos, pero en pequeñas cantidades.

IV.3.2. Órganos

(Ver placa 2)

Los ésteres de colesterol se observaron ligeramente en los tres órganos. En los tres había ceras, sobre todo en los testículos. Sólo se encontraron triglicéridos en el hígado. Los diglicéridos, colesterol y fosfolípidos se apreciaron en los tres órganos sobre todo en los testículos.

IV.3.3. Insaponificables

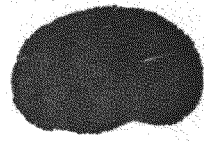
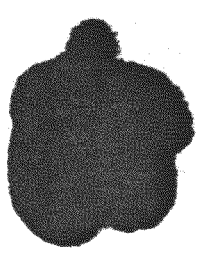
(Ver placa 3)

Los insaponificables de las tres zonas musculares son muy parecidos. El orden de separación de las distintas clases lipídicas en el insaponificable fue, de menor a mayor Rf: esteroides (los componentes más polares, que quedaron más cerca de la zona de aplicación de las muestras), alcoholes grasos (ver explicación de placa 4), escualeno (hidrocarburo insaturado) y los hidrocarburos saturados.

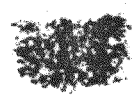
(Ver placa 4)

Al colocar en la misma placa el insaponificable de la zona muscular ventral y muestras de dos alcoholes grasos, se apreció que coincidían las manchas de los alcoholes grasos con la mancha más grande del insaponificable.

El único modo en que pueden aparecer los alcoholes grasos en una grasa es formando parte de ceras, luego esa mancha del insaponificable correspondía a alcoholes grasos, que al esterificarse con ácidos grasos formarían las ceras. Al cromatografiar los lípidos totales, aparecería la mancha correspondiente a las ceras.



EC
CERAS



TG



AGL
DG

COL



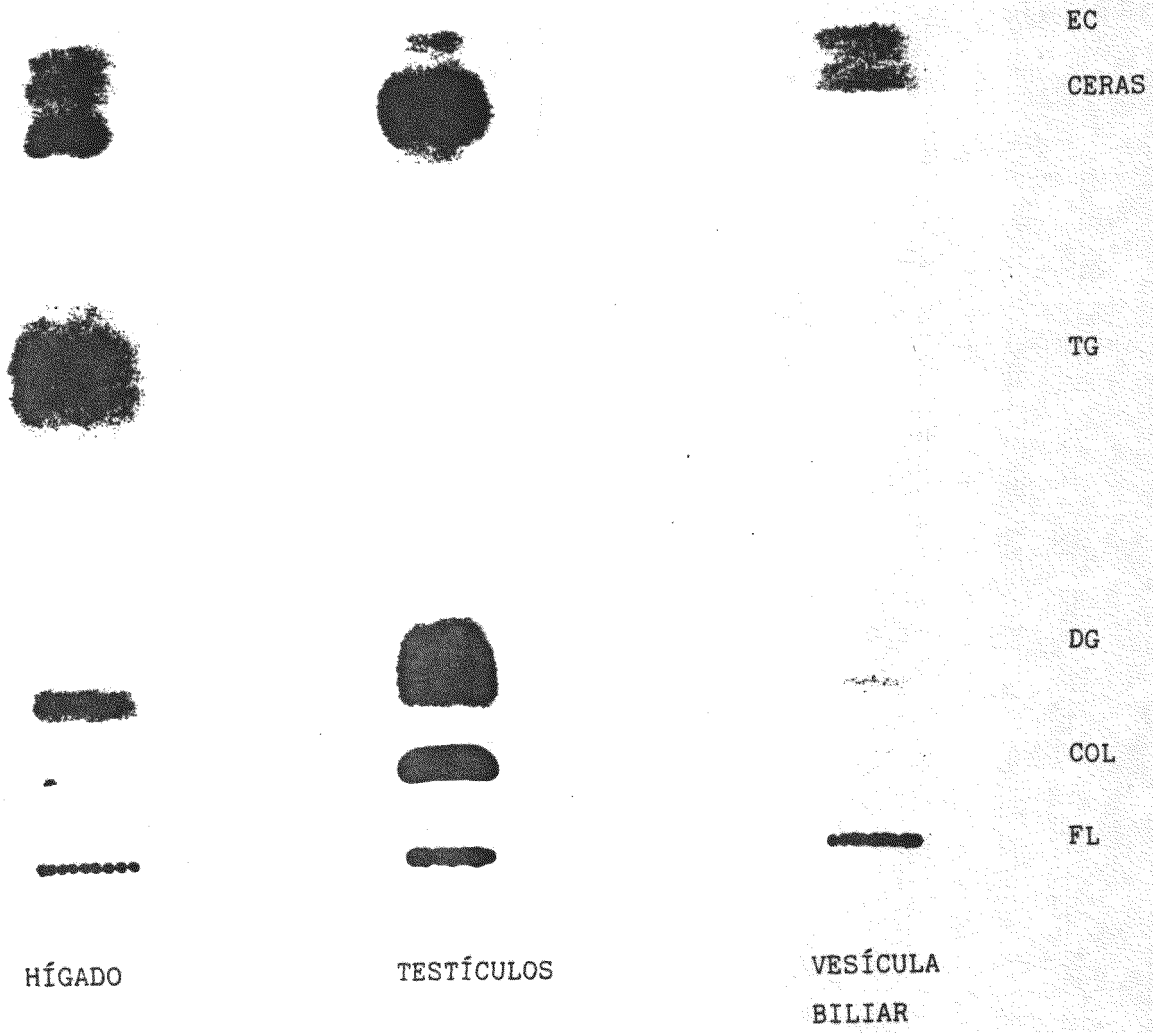
FL

DORSAL

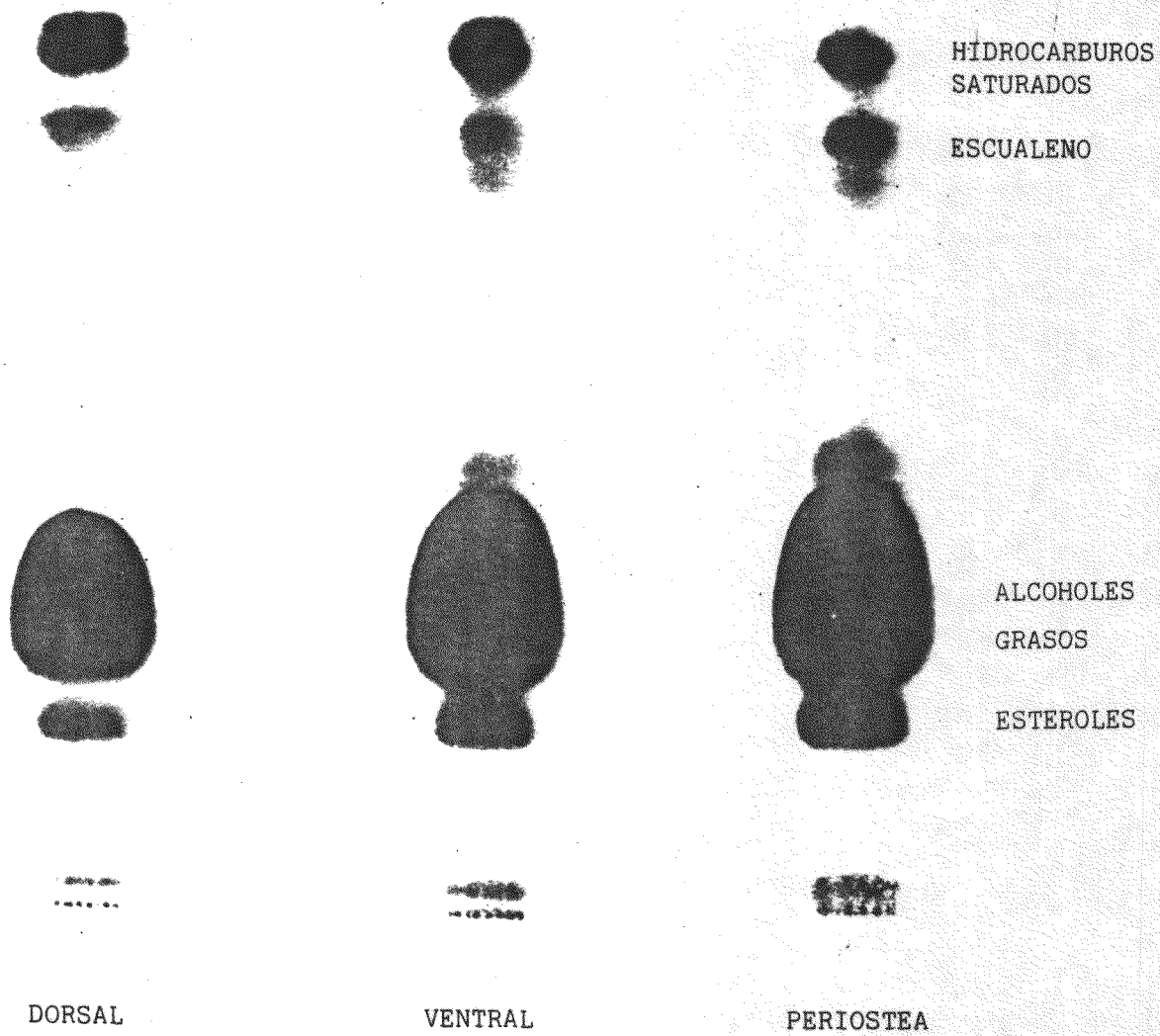
VENTRAL

COLA

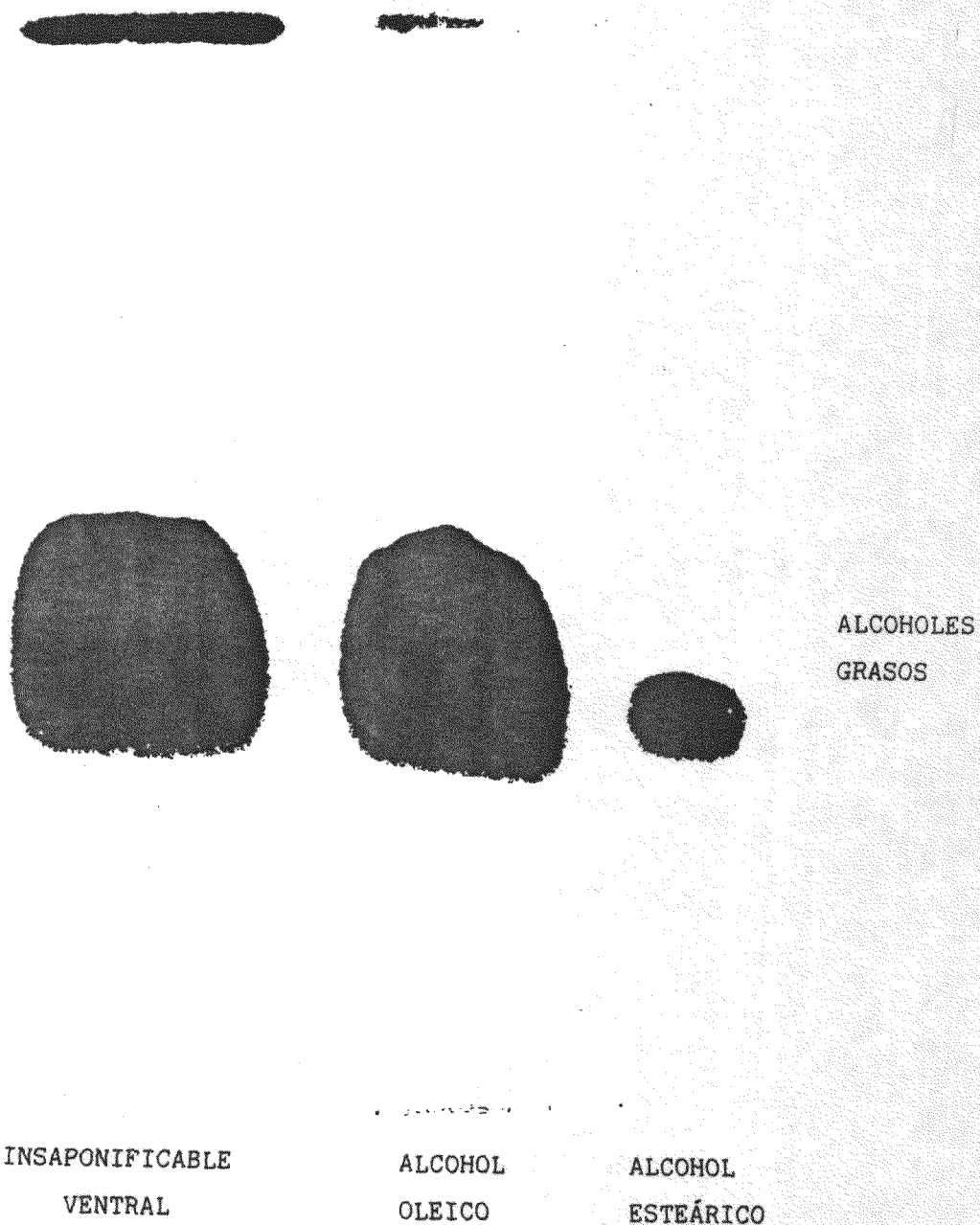
PLACA 1 : ZONAS MUSCULARES DE RUVETTUS PRETIOSUS .



PLACA 2 : ÓRGANOS DE RUVETTUS PRETIOSUS .



PLACA 3 : INSAPONIFICABLES DE ZONAS MUSCULARES DORSAL, VENTRAL Y PERIOSTEA.



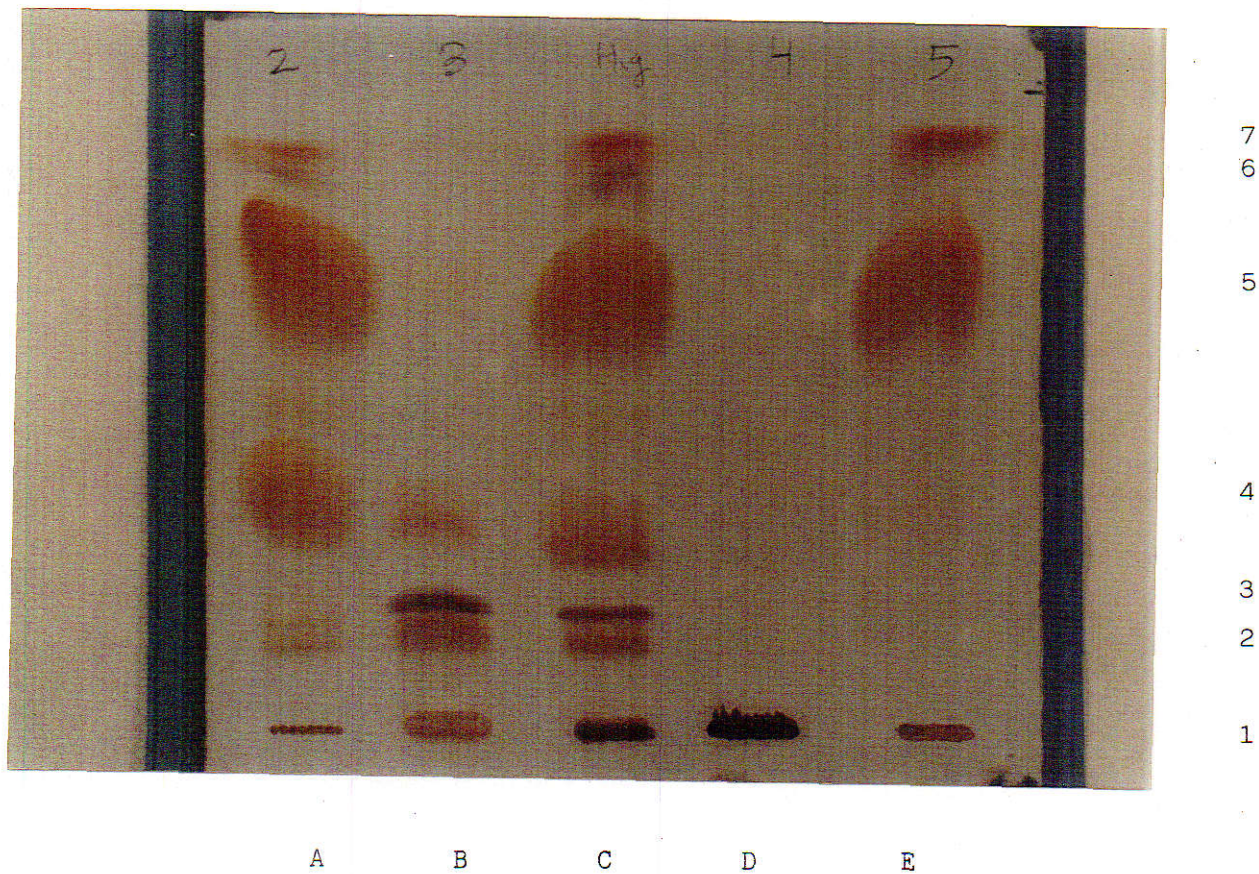
PLACA 4 : COMPARACIÓN DEL INSAPONIFICABLE DE ZONA MUSCULAR VENTRAL
Y DOS ALCOHOLES GRASOS.

IV. 4. FRACCIONAMIENTO DE LA GRASA

(Ver placa 5)

En la fracción 2 apareció una mezcla de diglicéridos, triglicéridos, ceras y ésteres de colesterol. En la fracción 3, fosfolípidos, monoglicéridos, colesterol y diglicéridos. En la fracción 4 se separaron los fosfolípidos del resto de las clases lipídicas. En la fracción 5 había triglicéridos y ésteres de colesterol.

Mediante este fraccionamiento se pudieron separar los fosfolípidos en la fracción 4. Esta fracción, al contener los fosfolípidos purificados, pudo más tarde usarse para intentar una separación y cuantificación de los distintos tipos de fosfolípidos.



PLACA 5 : FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DE LA GRASA DEL HÍGADO.

A, fracción 2; B, fracción 3; C, grasa total del hígado;
D, fracción 4; E, fracción 5.

1, fosfolípidos; 2, monoglicéridos; 3, colesterol; 4, diglicéridos;
5, triglicéridos; 6, ceras; 7, ésteres de colesterol.

IV.5. COMPOSICIÓN DE LA GRASA

IV.5.1. Zonas musculares

(Ver tabla 5)

En las zonas musculares, la fracción mayoritaria está formada por las ceras, con un 91,2% en zona muscular dorsal, 90,46% en ventral (ver cromatograma 1), y el mayor porcentaje en la cola (98,65%).

El segundo compuesto en porcentaje son los TG, con 4,59% en dorsal, y 4,15% en ventral, seguidos de los FL (2,67% y 3,61% respectivamente).

En la cola el segundo compuesto son los EC (0,79%), siendo la única zona muscular donde se detectaron, seguidos de los FL (0,56%).

Los AGL y DG alcanzaron valores bastante bajos en dorsal y ventral: 0,87% y 0,37% en dorsal y 1,19% y 0,60% en ventral.

En la tres zonas estudiadas no se detectó colesterol con el Iatroskan.

IV.5.2. Órganos

(Ver tabla 6)

La fracción mayoritaria en hígado (ver cromatograma 2) son los TG, con 72,47%, mientras que en testículos (ver cromatograma 3) son los FL (41,97%) y en vesícula biliar las ceras (75,10%).

El porcentaje de ceras es muy bajo en hígado (2,57%), y algo mayor en testículos (24,36%).

Los FL suman un 14,04% en hígado y 6,10% en vesícula biliar, además de 41,97% en testículos, por lo que se encuentran en bastante mayor proporción en los órganos que en las zonas musculares.

El porcentaje de AGL es mayor en las vísceras (alrededor del 6%), y también los DG, sobre todo en los testículos (13,57%) y vesícula biliar (9,72%).

Se encontró colesterol en los órganos, aunque con porcentajes más bien bajos: 2,51% en hígado, 2,78% en vesícula biliar y 0,44% en testículos.

IV.5.3. Otros

(Ver tabla 7)

En el tuétano, las ceras son las mayoritarias (72,85%) seguidas de los FL (12,97%) y TG (9,66%). EC, AGL y DG tienen valores de alrededor de 1,5%. En la sopa casi se puede decir que sólo había ceras (98,83%). No se detectó colesterol ni en tuétano ni en sopa.

Como conclusión, se puede decir que las ceras son la fracción mayoritaria (superior al 90%) en dorsal, ventral, cola y sopa, y también en tuétano y vesícula biliar, pero con porcentaje algo menor en estas dos últimas zonas (alrededor del 72%). En los otros órganos, los mayoritarios son los TG (en hígado) o los FL (en vesícula).

Sólo se detectó colesterol en los órganos, y con valores bajos: alrededor de 2,5% en hígado y vesícula biliar y 0,44% en testículos.

Hay que destacar también el 13,57% de DG de los testículos y el 9,72% en vesícula biliar, valores altos comparando con los demás, así como que los FL se encuentran sobre todo en testículos (41,97%), seguidos de hígado (14,04%) y tuétano (12,97%).

TABLA 5 : COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE DISTINTAS ZONAS MUSCULARES DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

	DORSAL	VENTRAL	COLA
EC	-----	-----	0,79 ± 0,01
CERAS	91,62 ± 0,51	90,46 ± 0,52	98,65 ± 0,12
TG	4,59 ± 0,16	4,15 ± 0,03	-----
AGL	0,87 ± 0,08	1,19 ± 0,01	-----
DG	0,37 ± 0,01	0,60 ± 0,06	-----
COL	-----	-----	-----
FL	2,67 ± 0,37	3,61 ± 0,11	0,56 ± 0,01

Resultados expresados en medias ± SD.

TABLA 6 : COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE DISTINTOS ÓRGANOS DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

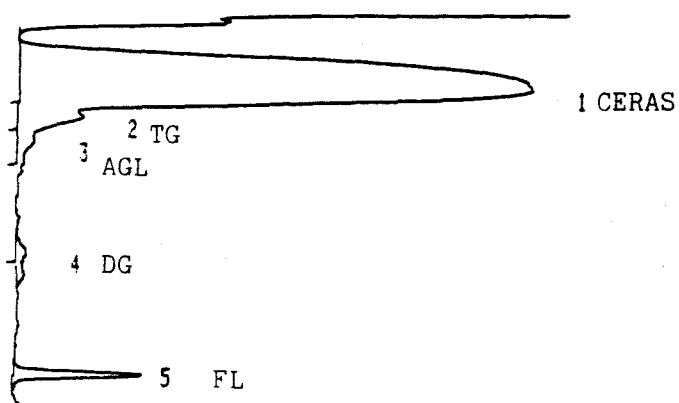
	HÍGADO	TESTÍCULOS	VESÍCULA
EC	0,95 ± 0,08	2,41 ± 0,01	-----
CERAS	2,57 ± 0,20	24,36 ± 0,87	75,10 ± 0,33
TG	72,47 ± 0,31	11,71 ± 0,75	6,36 ± 1,99
AGL	6,30 ± 0,58	5,53 ± 0,60	-----
DG	1,16 ± 0,08	13,57 ± 1,14	9,72 ± 0,10
COL	2,51 ± 0,06	0,44 ± 0,03	2,78 ± 0,20
FL	14,04 ± 0,51	41,97 ± 0,43	6,10 ± 1,57

Resultados expresados como medias ± SD

TABLA 7 : OTRAS COMPOSICIONES LIPÍDICAS.

	TUÉTANO	SOPA
EC	1,69 ± 0,09	-----
CERAS	72,85 ± 0,30	98,83 ± 0,20
TG	9,66 ± 0,11	0,34 ± 0,01
AGL	1,28 ± 0,07	0,28 ± 0,09
DG	1,55 ± 0,06	-----
COL	-----	-----
FL	12,97 ± 0,48	0,56 ± 0,01

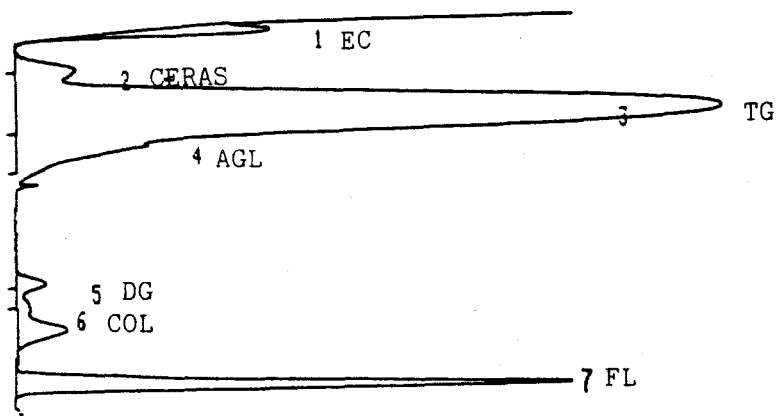
Resultados expresados como medias ± SD.



CROMATOGRAMA 1 :

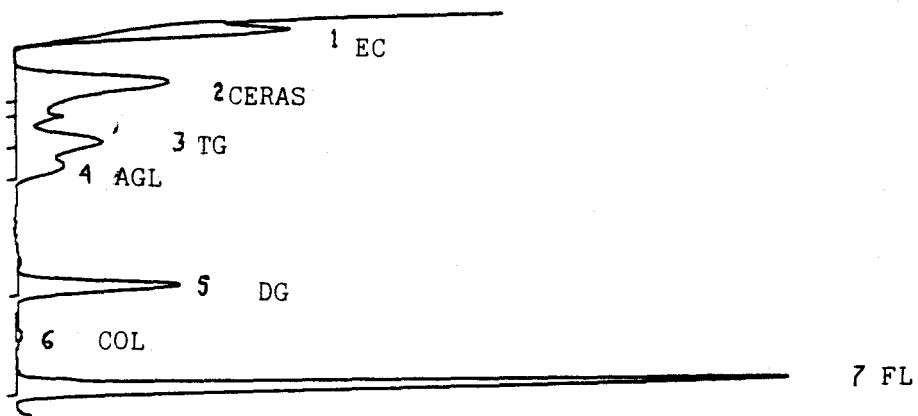
SEPARACIÓN DE LAS CLASES LIPÍDICAS DE LA ZONA MUSCULAR VENTRAL

POR TLC CON DETECTOR DE IONIZACIÓN (IATROSCAN).



CROMATOGRAMA 2 :

SEPARACIÓN DE LAS CLASES LIPÍDICAS DEL HÍGADO POR TLC
CON DETECTOR DE IONIZACIÓN (IATROSCAN):



CROMATOGRAMA 3 :

SEPARACIÓN DE LAS CLASES LIPÍDICAS DE LOS TESTÍCULOS POR TLC
CON DETECTOR DE IONIZACIÓN (IATROSCAN).

IV.6. COMPOSICIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS

(Ver tabla 8)

Se analizaron los fosfolípidos del hígado y testículos, por ser éstas las zonas del pez donde se encontraron los mayores porcentajes de esta clase lipídica: 14,04% en hígado y 41,97% en testículos.

En estos dos órganos, los tipos y porcentajes de los fosfolípidos eran bastante diferentes, coincidiendo sólo en el mayoritario, la fosfatidilcolina, que alcanzaba un 49,36% en testículos y un 43,74% en hígado.

En los testículos (ver cromatograma 4) la fosfatidilcolina iba seguida de la fosfatidilserina (29,78%) y la fosfatidiletanolamina (12,91%), siendo el minoritario la esfingomielina con un 7,96%.

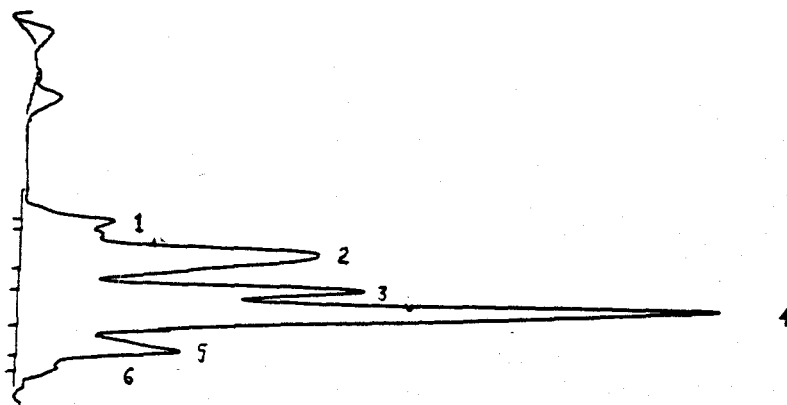
En el hígado la fosfatidilcolina iba seguida de la fosfatidiletanolamina (25,87%), fosfatidilserina (16,32%) y esfingomielina (10,03%).

Por último, en el hígado se detectaron la cardiolipina (2,58%) y la lisofosfatidilcolina (1,45%), que no fueron detectadas en los testículos.

TABLA 8 : TIPOS DE FOSFOLÍPIDOS EN HÍGADO Y TESTÍCULOS DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

FOSFOLÍPIDOS	TESTÍCULOS	HÍGADO
Cardiolipina	-----	2,58 ± 0,01
Fosfatidiletanolamina	12,91 ± 0,02	25,87 ± 0,85
Fosfatidilserina	29,78 ± 0,82	16,32 ± 1,10
Fosfatidilcolina	49,36 ± 0,50	43,74 ± 0,53
Esfingomiélinea	7,96 ± 0,34	10,03 ± 0,70
Lisofosfatidilcolina	-----	1,45 ± 0,11

Resultados expresados en medias ± SD.



CROMATOGRAMA 4 :

SEPARACIÓN DE LAS CLASES DE FOSFOLÍPIDOS DEL HÍGADO POR TLE
CON DETECTOR DE IONIZACIÓN (IATROSCAN).

- 1 CARDIOLIPINA
- 2 FOSFATIDILETANOLAMINA
- 3 FOSFATIDILSERINA
- 4 FOSFATIDILCOLINA
- 5 ESFINGOMIELINA
- 6 LISOFOSFATIDILCOLINA

IV.7. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS TOTALES

(Ver tablas 9, 10 y 11)

El ácido graso principal en todas las zonas estudiadas es el oleico [18:1(n-9)], alcanzando los valores siguientes: 45,21% en zona muscular dorsal, 47,68% en ventral, 45,61% en zona subcutánea, 52,44% en zona periosteal, 47,10% en hígado, 45,02% en tuétano, 49,70% en sopa, y descendiendo hasta un 22,22% en testículos.

El docosahexaenoico [22:6(n-3)] es el segundo ácido graso en dorsal (9,64%) y zona subcutánea (8,55%); el eicosenoico [20:1(n-11)], en ventral (8,37%), zona periosteal (6,35%) y sopa (6,89%); y el palmítico (16:0), en hígado (15,77%), testículos (18,79%) y tuétano (19,82%).

El eicosenoico es el tercer ácido graso en dorsal (6,40%), zona subcutánea (6,55%) y tuétano (7,15%); el docosahexaenoico en ventral (7,90%), zona periosteal (4,91%), hígado (7,84%), testículos (18,25%) y sopa (5,56%).

Los mayores porcentajes de ácidos grasos saturados se encuentran en las vísceras y tuétano (alrededor del 22%), siendo aproximadamente 6% en las demás zonas estudiadas.

Los ácidos grasos monoinsaturados son los mayoritarios en todas las zonas, aunque en los testículos (34,61%) su porcentaje es la mitad que en el resto de las zonas.

Los ácidos grasos diinsaturados tienen valores bajos, siendo el mayor porcentaje el del hígado (3,45%).

Los valores de los ácidos grasos poliinsaturados son más altos en testículos (37,51%), disminuyendo en dorsal (28,86%), ventral (24,15%), zona subcutánea (28,53%), zona periosteal (21%), sopa (23,68%), y siendo los más bajos los de hígado (14,27%) y tuétano (16,35%).

La relación saturados/poliinsaturados sólo es mayor de la unidad en hígado (1,54) y tuétano (1,42), siendo muy parecida en zona muscular dorsal, ventral, zona subcutánea y sopa (0,23, 0,33, 0,21 y 0,23 respectivamente), y algo mayor en testículos (0,71).

En el cromatograma 5 se indican los ácidos grasos que corresponden a cada pico, que pueden servir de referencia para el resto de los cromatogramas (6-11), en los que están indicados los tiempos de retención de cada ácido graso.

Por último se adjuntan los espectros de masa de algunos de los ácidos grasos presentes en los lípidos totales (ver espectros 1-5).

TABLA 9 : ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS TOTALES DE DISTINTAS ZONAS MUSCULARES DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

ÁCIDOS GRASOS	DORSAL	VENTRAL	SUBCUTÁNEA	PERIOSTEA
14:0	0.40 ± 0.00	0.32 ± 0.05	0.33 ± 0.02	0.42 ± 0.10
16:0	2.46 ± 0.19	2.93 ± 0.26	2.22 ± 0.03	2.90 ± 0.42
16:1(n-7)	3.06 ± 0.25	2.37 ± 0.37	3.42 ± 0.04	0.43 ± 0.03
16:1(n-9)	0.95 ± 0.03	0.73 ± 0.19	1.02 ± 0.07	2.93 ± 0.37
16:2(n-4)	0.83 ± 0.08	0.57 ± 0.12	0.79 ± 0.02	0.24 ± 0.10
17:1(n-7)	0.69 ± 0.03	0.72 ± 0.06	0.91 ± 0.07	0.70 ± 0.33
16:4(n-3)	3.07 ± 0.36	3.19 ± 0.43	3.62 ± 0.08	2.85 ± 0.28
18:0	1.93 ± 0.34	2.36 ± 0.08	1.46 ± 0.03	2.02 ± 0.11
18:1(n-9)	45.21 ± 0.75	47.68 ± 3.10	45.61 ± 0.06	52.44 ± 1.05
18:1(n-7)	3.39 ± 0.09	3.27 ± 0.26	3.11 ± 0.12	4.35 ± 0.57
18:2(n-6)	1.76 ± 0.16	1.20 ± 0.45	1.85 ± 0.04	1.89 ± 0.05
18:3(n-6)	0.75 ± 0.03	0.43 ± 0.23	0.79 ± 0.01	0.72 ± 0.02
18:3(n-3)	4.68 ± 0.03	4.40 ± 0.59	4.89 ± 0.05	4.60 ± 0.03
18:4(n-3)	-----	-----	-----	0.31 ± 0.10
20:0	1.73 ± 0.09	1.81 ± 0.09	1.94 ± 0.01	1.89 ± 0.08
20:1(n-11)	6.40 ± 0.42	8.37 ± 2.32	6.55 ± 0.13	6.35 ± 0.15
20:1(n-9)	0.32 ± 0.10	0.38 ± 0.19	1.51 ± 0.01	0.43 ± 0.08
20:3(n-3)	0.52 ± 0.05	0.38 ± 0.00	0.48 ± 0.08	0.66 ± 0.03
20:3(n-6)	-----	-----	0.33 ± 0.01	0.22 ± 0.09
20:4(n-6)	1.15 ± 0.07	1.02 ± 0.06	1.21 ± 0.03	1.00 ± 0.06
20:4(n-3)	2.19 ± 0.11	1.24 ± 0.82	2.24 ± 0.02	1.66 ± 0.32
20:5(n-3)	3.58 ± 0.23	3.21 ± 0.64	3.40 ± 0.17	2.43 ± 0.19
22:1(n-11)	0.47 ± 0.06	0.86 ± 0.36	0.46 ± 0.08	0.61 ± 0.13
22:1(n-9)	0.30 ± 0.05	1.03 ± 0.81	0.31 ± 0.10	0.33 ± 0.01
22:4(n-6)	-----	-----	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01
22:5(n-6)	0.81 ± 0.10	0.50 ± 0.22	0.90 ± 0.03	-----
22:5(n-3)	2.37 ± 0.09	1.90 ± 0.53	2.26 ± 0.11	1.49 ± 0.25
22:6(n-3)	9.64 ± 0.84	7.90 ± 2.64	8.55 ± 0.60	4.91 ± 0.06
24:1(n-9)	1.29 ± 0.02	1.47 ± 0.25	1.28 ± 0.05	1.06 ± 0.05
SATURADOS	6.53 ± 0.44	7.42 ± 0.38	5.94 ± 0.08	7.23 ± 1.64
MONOINSAT.	62.05 ± 1.47	66.85 ± 6.14	63.40 ± 0.99	69.64 ± 5.13
DIINSAT.	2.58 ± 0.23	1.76 ± 0.56	2.64 ± 0.06	2.13 ± 0.22
POLIINSAT.	28.86 ± 1.27	24.15 ± 6.12	28.53 ± 0.64	21.00 ± 2.36
SAT/POLIINSAT.	0.23 ± 0.01	0.33 ± 0.10	0.21 ± 0.01	0.34 ± 0.07

Resultados expresados en medias ± SD.

TABLA 10 : ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS TOTALES DE DISTINTOS ÓRGANOS DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

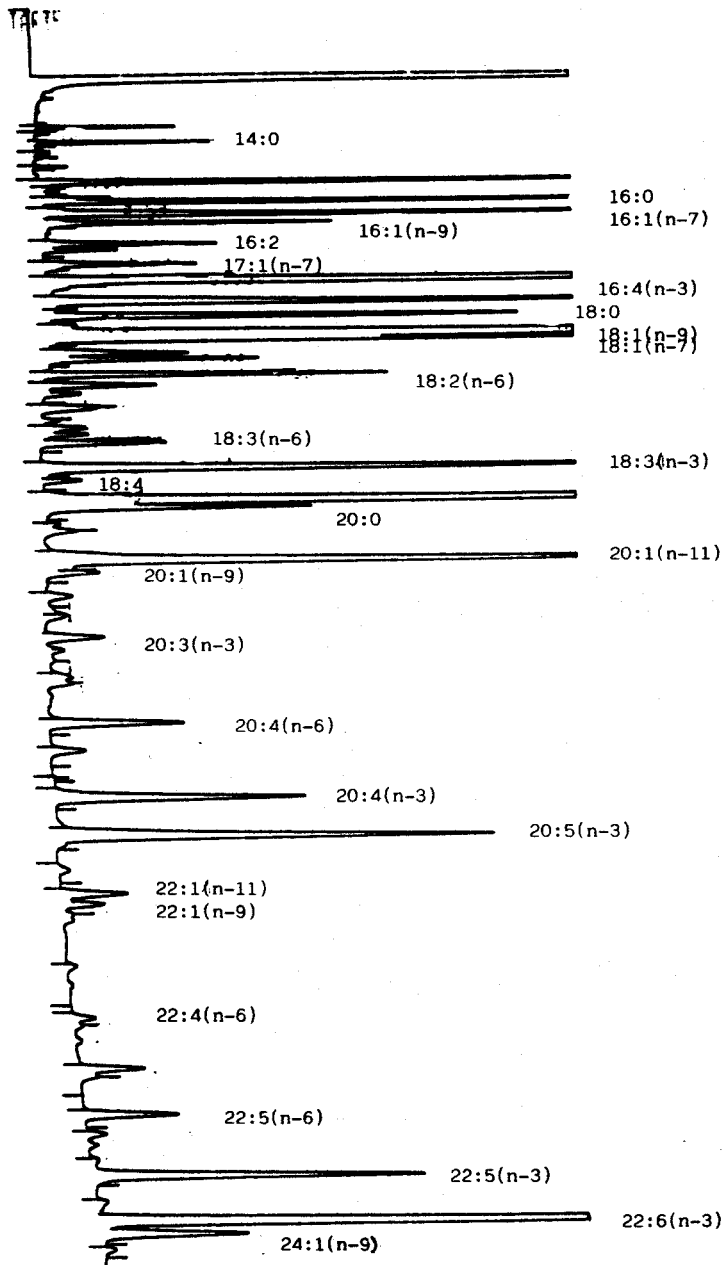
ÁCIDOS GRASOS	HÍGADO	TESTÍCULOS
14:0	0,68 ± 0,08	0,48 ± 0,05
16:0	15,77 ± 0,88	18,79 ± 2,05
16:1(n-7)	1,07 ± 0,29	0,91 ± 0,03
16:1(n-9)	0,94 ± 0,68	0,26 ± 0,05
16:2(n-4)	0,68 ± 0,01	0,66 ± 0,30
17:1(n-7)	0,84 ± 0,11	0,72 ± 0,07
16:4(n-3)	-----	0,63 ± 0,15
18:0	5,33 ± 1,13	7,43 ± 0,42
18:1(n-9)	47,10 ± 1,30	22,22 ± 2,09
18:1(n-7)	3,80 ± 0,52	2,56 ± 0,02
18:2(n-6)	0,47 ± 0,14	0,51 ± 0,10
18:3(n-6)	-----	-----
18:3(n-3)	-----	0,77 ± 0,04
18:4(n-3)	-----	-----
20:0	-----	-----
20:1(n-11)	4,77 ± 3,66	6,72 ± 2,30
20:1(n-9)	0,51 ± 0,10	-----
20:3(n-3)	0,37 ± 0,06	0,48 ± 0,15
20:3(n-6)	0,10 ± 0,03	-----
20:4(n-6)	1,03 ± 0,29	7,49 ± 0,60
20:4(n-3)	0,56 ± 0,26	-----
20:5(n-3)	1,87 ± 0,04	4,86 ± 0,09
22:1(n-11)	0,95 ± 0,67	0,68 ± 0,02
22:1(n-9)	0,59 ± 0,36	0,54 ± 0,05
22:4(n-6)	-----	-----
22:5(n-6)	-----	0,83 ± 0,03
22:5(n-3)	1,93 ± 0,22	4,20 ± 0,59
22:6(n-3)	7,84 ± 0,64	18,25 ± 0,90
24:1(n-9)	-----	-----
SATURADOS	21,78 ± 2,09	26,70 ± 2,50
MONOINSATURADOS	60,50 ± 3,82	34,61 ± 3,63
DIINSATURADOS	3,45 ± 2,45	1,17 ± 0,40
POLIINSATURADOS	14,27 ± 0,73	37,51 ± 2,52
SAT./ POLIINSAT.	1,54 ± 0,23	0,71 ± 0,11

Resultados expresados en medias ± SD

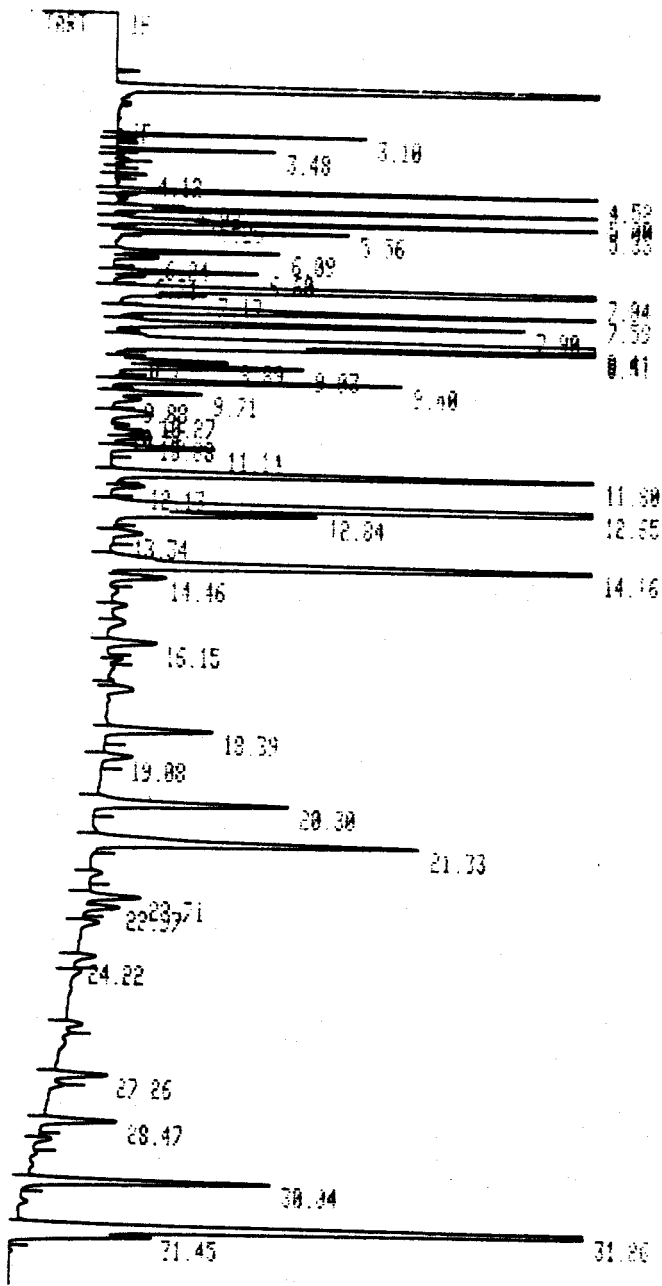
TABLA 11: OTRAS COMPOSICIONES DE ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS TOTALES
RUVETTUS PRETIOSUS.

ÁCIDOS GRASOS	TUÉTANO	SOPA
14:0	0,68 ± 0,06	0,32 ± 0,02
16:0	19,82 ± 1,92	1,69 ± 0,04
16:1(n-7)	2,41 ± 0,03	3,49 ± 0,10
16:1(n-9)	0,34 ± 0,04	1,08 ± 0,03
16:2(n-4)	0,40 ± 0,02	0,90 ± 0,03
17:1(n-7)	1,26 ± 0,07	0,85 ± 0,36
16:4(n-3)	2,50 ± 0,37	2,96 ± 0,08
18:0	2,64 ± 0,25	1,45 ± 0,09
18:1(n-9)	45,02 ± 0,75	49,70 ± 2,50
18:1(n-7)	-----	3,32 ± 0,32
18:2(n-6)	0,74 ± 0,03	1,90 ± 0,15
18:3(n-6)	-----	0,78 ± 0,65
18:3(n-3)	2,57 ± 0,11	5,13 ± 0,13
18:4(n-3)	-----	0,06 ± 0,02
20:0	-----	2,02 ± 0,03
20:1(n-11)	7,15 ± 0,60	6,89 ± 0,11
20:1(n-9)	-----	0,52 ± 0,01
20:3(n-3)	-----	0,56 ± 0,22
20:3(n-6)	-----	0,30 ± 0,06
20:4(n-6)	1,02 ± 0,05	1,02 ± 0,08
20:4(n-3)	-----	1,79 ± 0,53
20:5(n-3)	2,20 ± 0,10	2,80 ± 0,111
22:1(n-11)	0,84 ± 0,03	0,44 ± 0,07
22:1(n-9)	1,20 ± 0,05	0,36 ± 0,19
22:4(n-6)	-----	0,11 ± 0,08
22:5(n-6)	-----	0,75 ± 0,10
22:5(n-3)	3,30 ± 0,12	1,86 ± 0,04
22:6(n-3)	4,76 ± 0,55	5,56 ± 0,03
24:1(n-9)	1,14 ± 0,30	1,40 ± 0,07
SATURADOS	23,14 ± 2,20	5,48 ± 0,18
MONOINSATURADOS	59,36 ± 1,87	68,05 ± 3,51
DIINSATURADOS	1,14 ± 0,05	2,80 ± 0,18
POLIINSATURADOS	16,35 ± 1,10	23,68 ± 2,10
SAT./ POLIINSAT.	1,42 ± 0,15	0,23 ± 0,01

Resultados expresados en medias ± SD

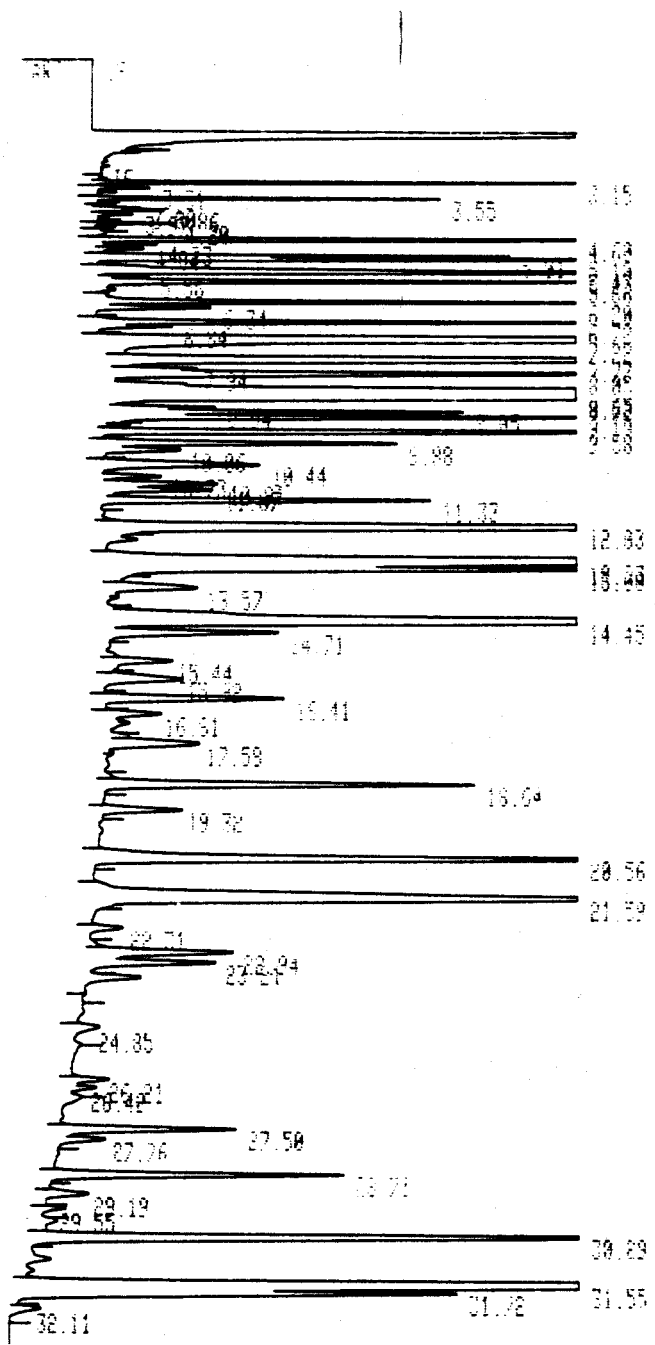


CROMATOGRAMA 5 : ZONA MUSCULAR DORSAL:

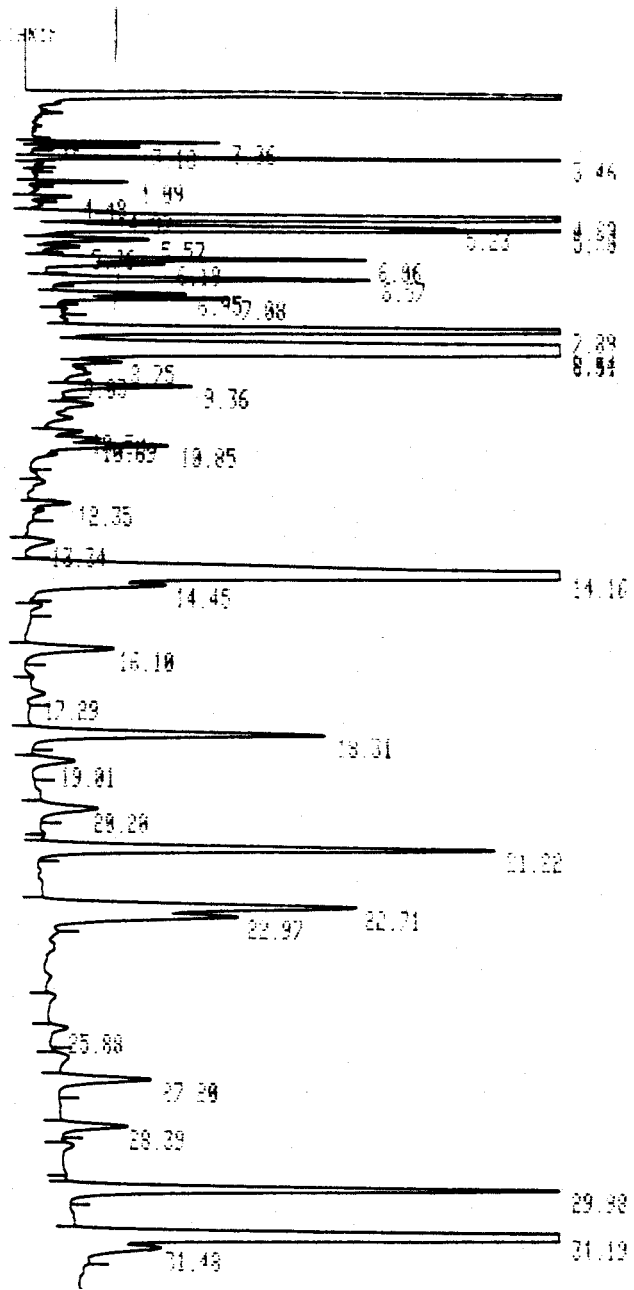


CROMATOGRAMA 6 : ZONA MUSCULAR VENTRAL.

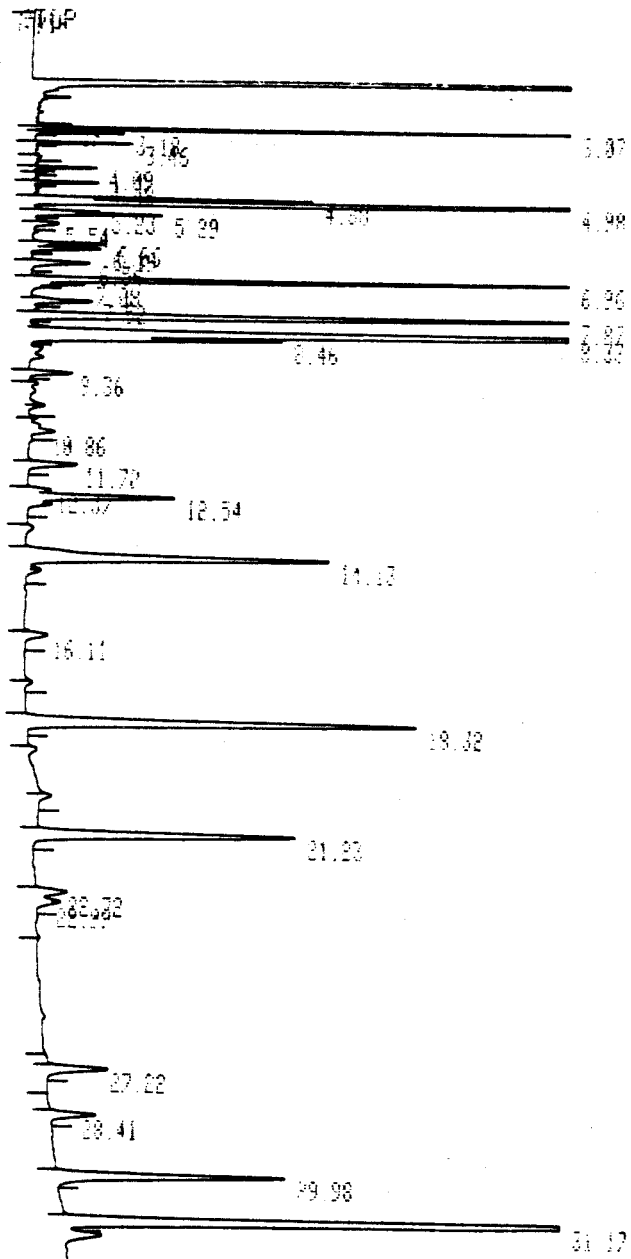
(Para composición en ácidos grasos, ver cromatograma 5).



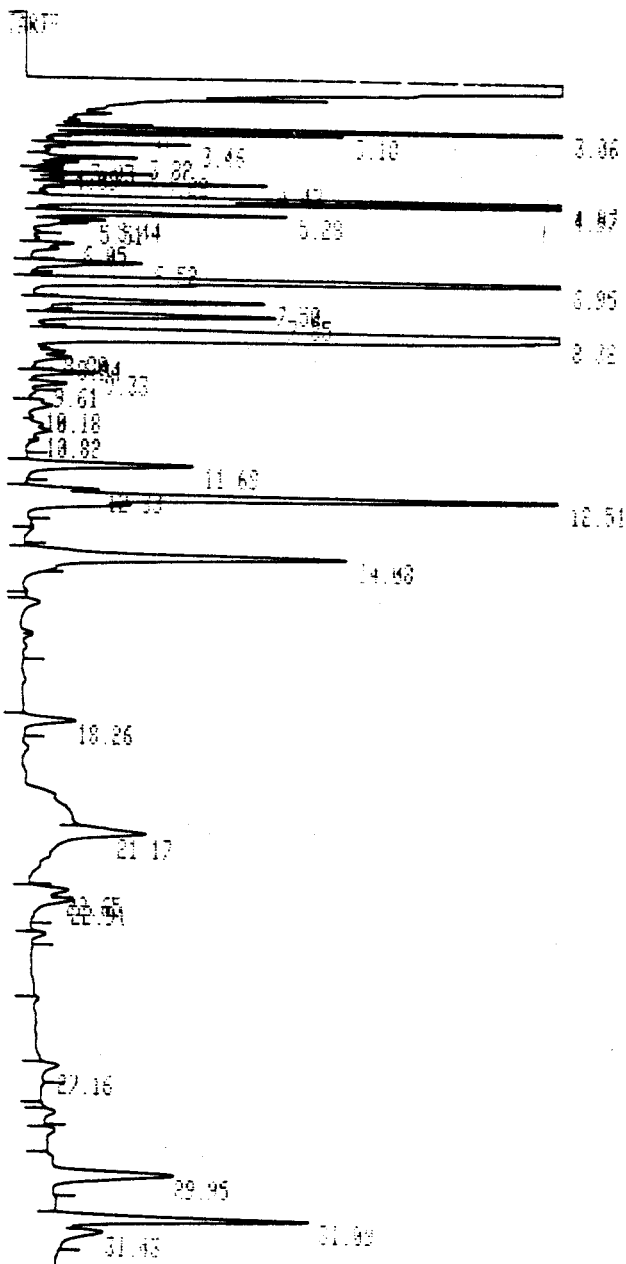
CROMATOGRAMA 7 : ZONA MUSCULAR SUBCUTÁNEA.



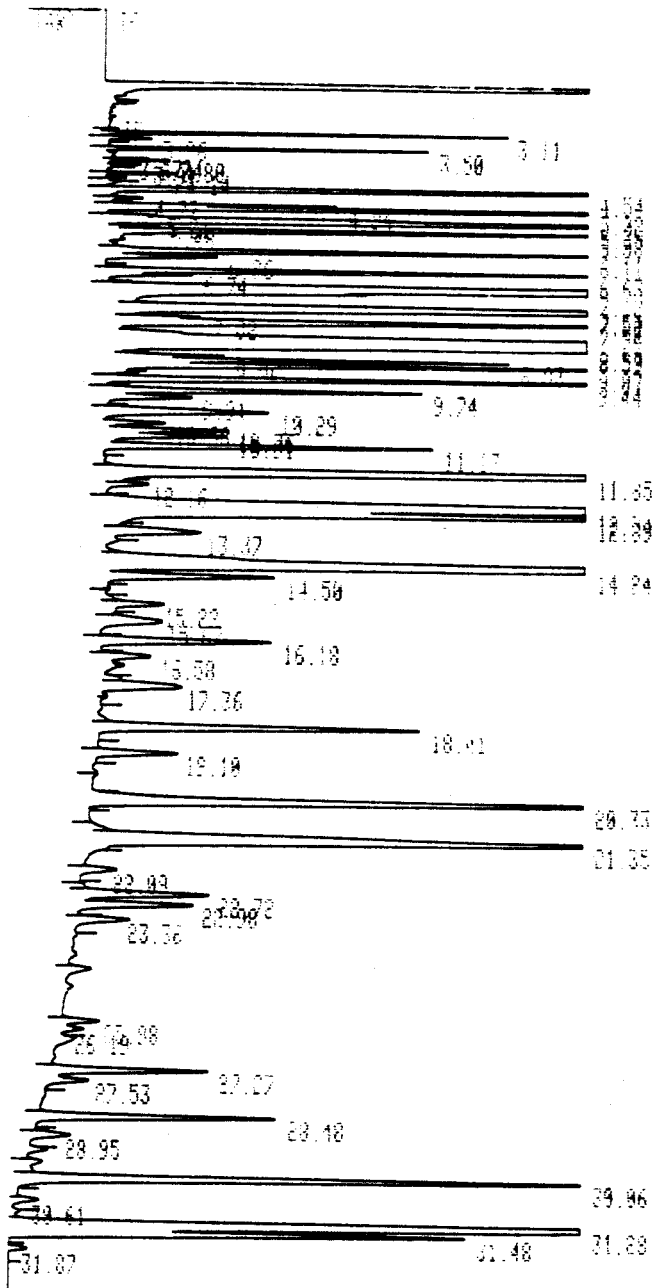
CROMATOGRAMA 8 : HÍGADO.



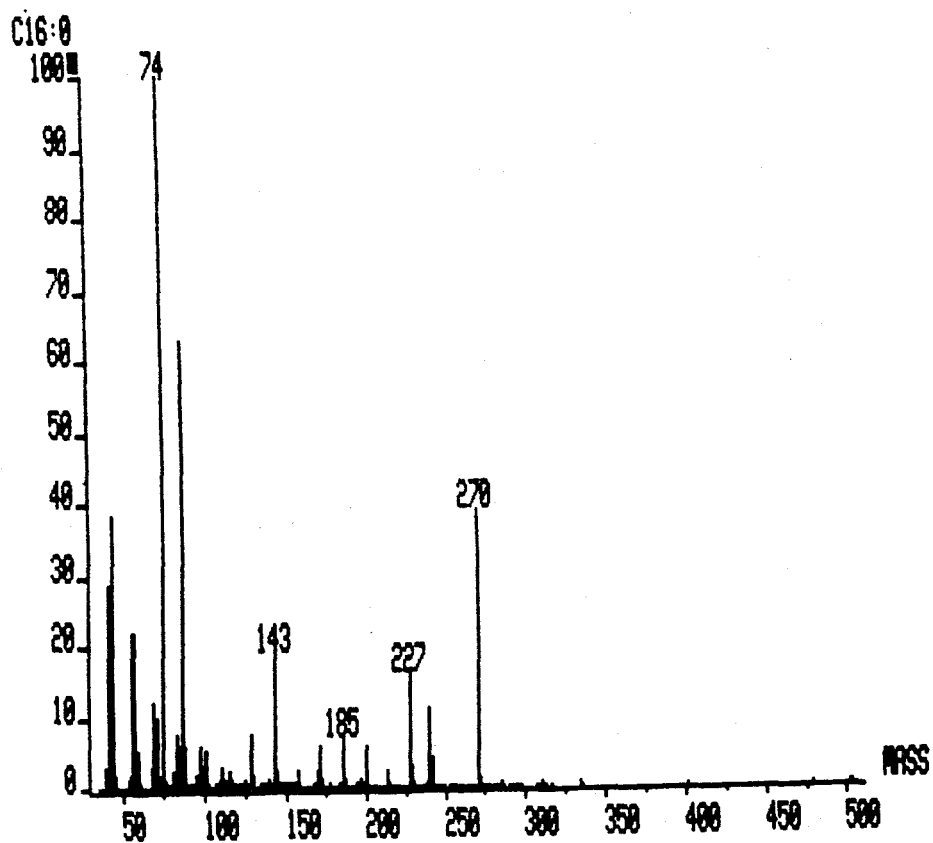
CROMATOGRAMA 9 : TESTÍCULOS.



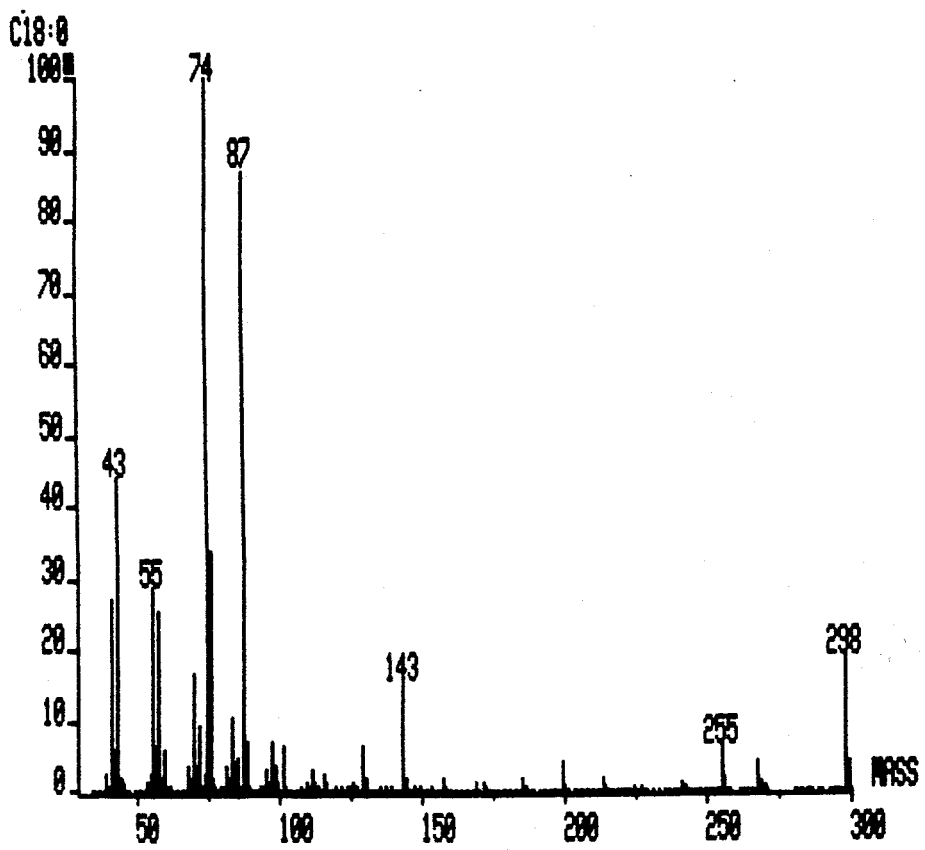
CROMATOGRAMA 10 : TUÉTANO.



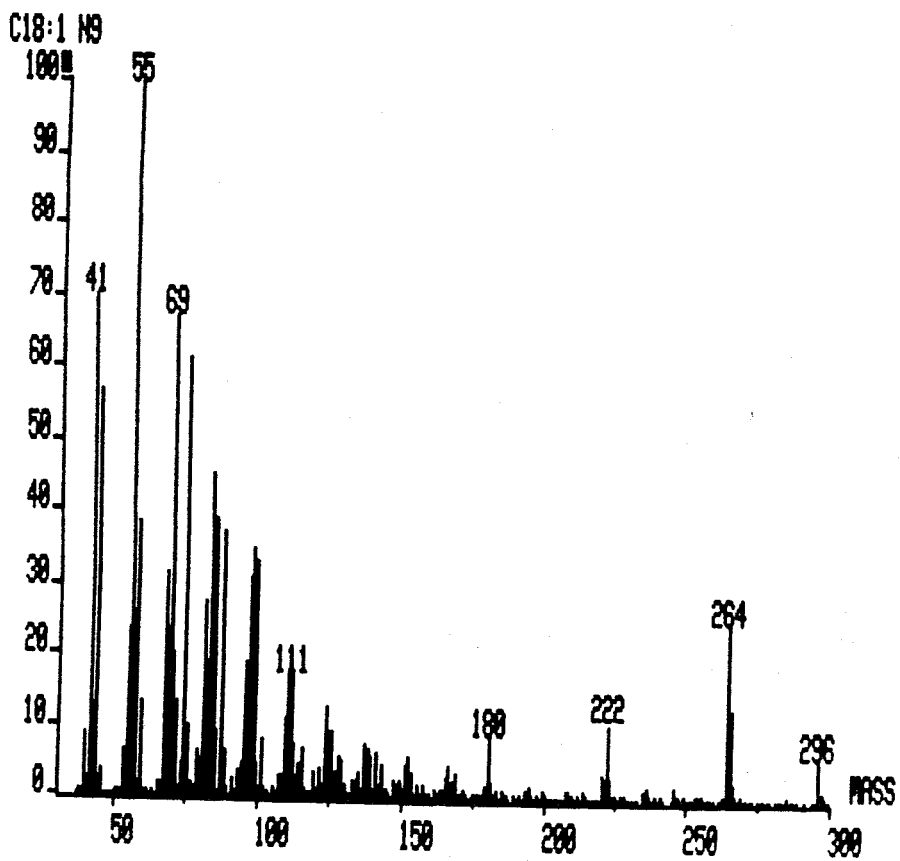
CROMATOGRAMA 11 : SOPA.



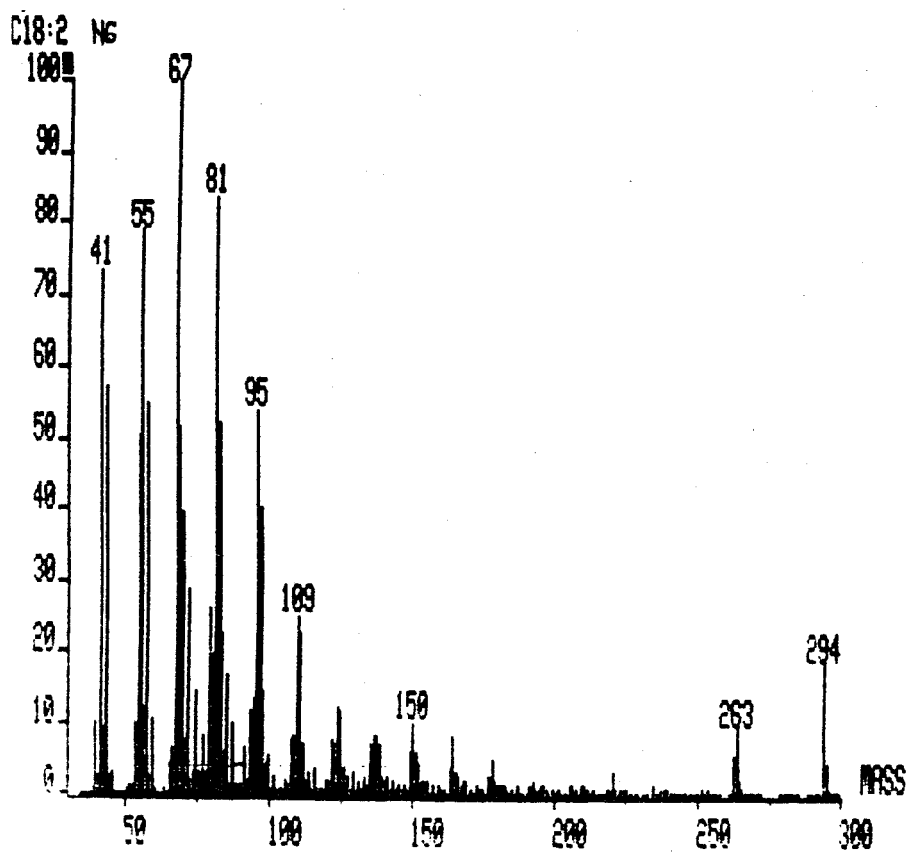
ESPECTRO 1 : ÁCIDO GRASO 16:0.



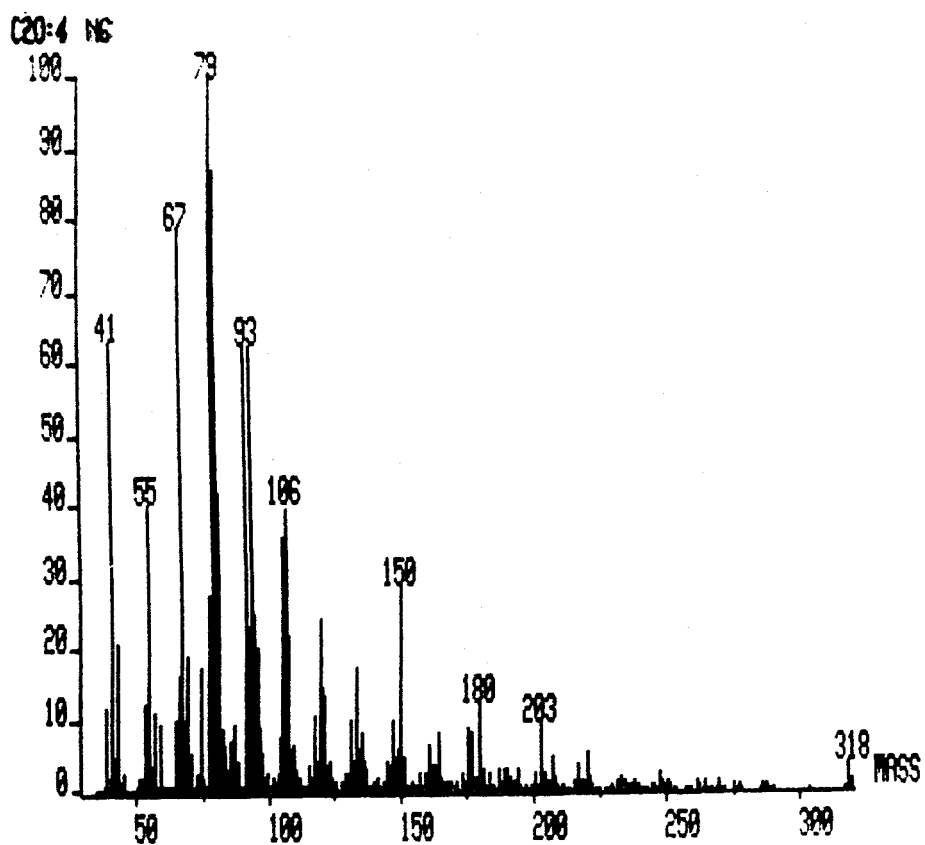
ESPECTRO 2 : ÁCIDO GRASO 18:0.



ESPECTRO 3 : ÁCIDO GRASO 18:1(n-9).



ESPECTRO 4 : ÁCIDO GRASO 18:2(n-6).



ESPECTRO 5 : ÁCIDO GRASO 20:4(n-6).

IV.8. COMPOSICIÓN DE LAS CERAS

IV.8.1. Ácidos grasos

(Ver tabla 12)

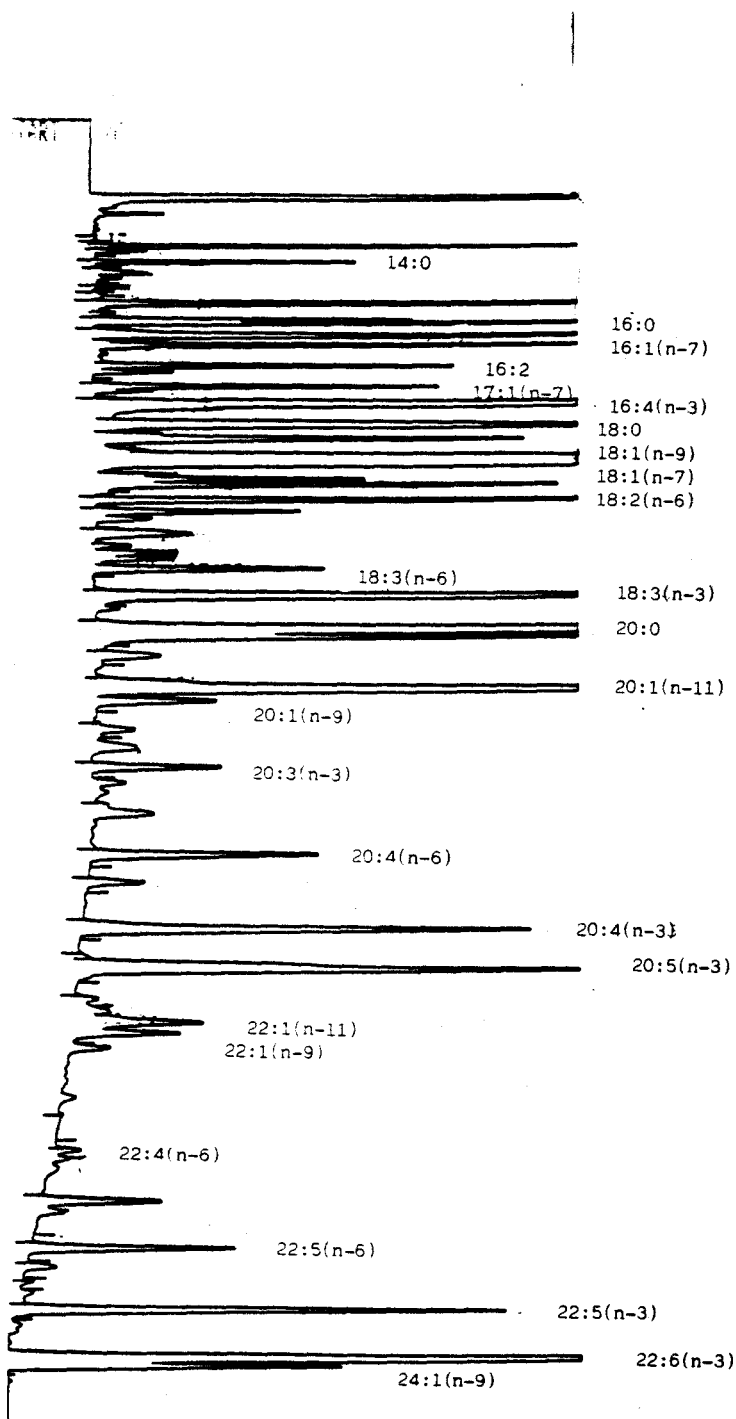
Los porcentajes de los ácidos grasos correspondientes a las ceras de las zonas musculares dorsal, ventral (ver cromatograma 12) y periosteal se asemejan bastante a los correspondientes a los lípidos totales de las mismas zonas.

El ácido graso mayoritario en las tres zonas es el oleico [18:1(n-9)], con porcentajes de 45,03% en dorsal, 46,71% en ventral y algo superior en la zona periosteal (51,96%).

El segundo ácido graso en porcentaje es el docosahexaenoico [22:6(n-3)]: 7,19% en ventral, 6,83% en zona periosteal y ligeramente mayor en dorsal (10,15%).

El eicosenoico [20:1(n-11)] es el tercer ácido graso, con porcentajes que van desde 5,64% en dorsal hasta 7,00% en ventral, con el valor intermedio de 6,09% en zona periosteal.

El porcentaje de ácidos grasos saturados es bajo en las tres zonas, con un máximo de 6,11% en la zona periosteal. Los mayoritarios en las tres zonas musculares son los ácidos grasos monoinsaturados, con un porcentaje aproximado de 63%, seguidos de los poliinsaturados, con un valor medio de 27%. Los ácidos grasos en menor proporción son los diinsaturados, por debajo del 3% en las tres zonas. Por último, la relación saturados/poliinsaturados es en las tres zonas de aproximadamente un ácido graso saturado por cada 5 poliinsaturados.



CROMATOGRAMA 12 : ÁCIDOS GRASOS DE CERAS DE ZONA MUSCULAR VENTRAL.

IV.8.2. Alcoholes grasos

Los alcoholes grasos de las ceras se analizaron en cromatógrafo de gases (ver cromatogramas 13-15) y en espectrometría de masas (ver espectro de masa 6). También se adjuntan espectros de masa de alcoholes grasos presentes en las ceras, que sirvieron para la identificación de los mismos (ver espectros 7-11).

(Ver tabla 13)

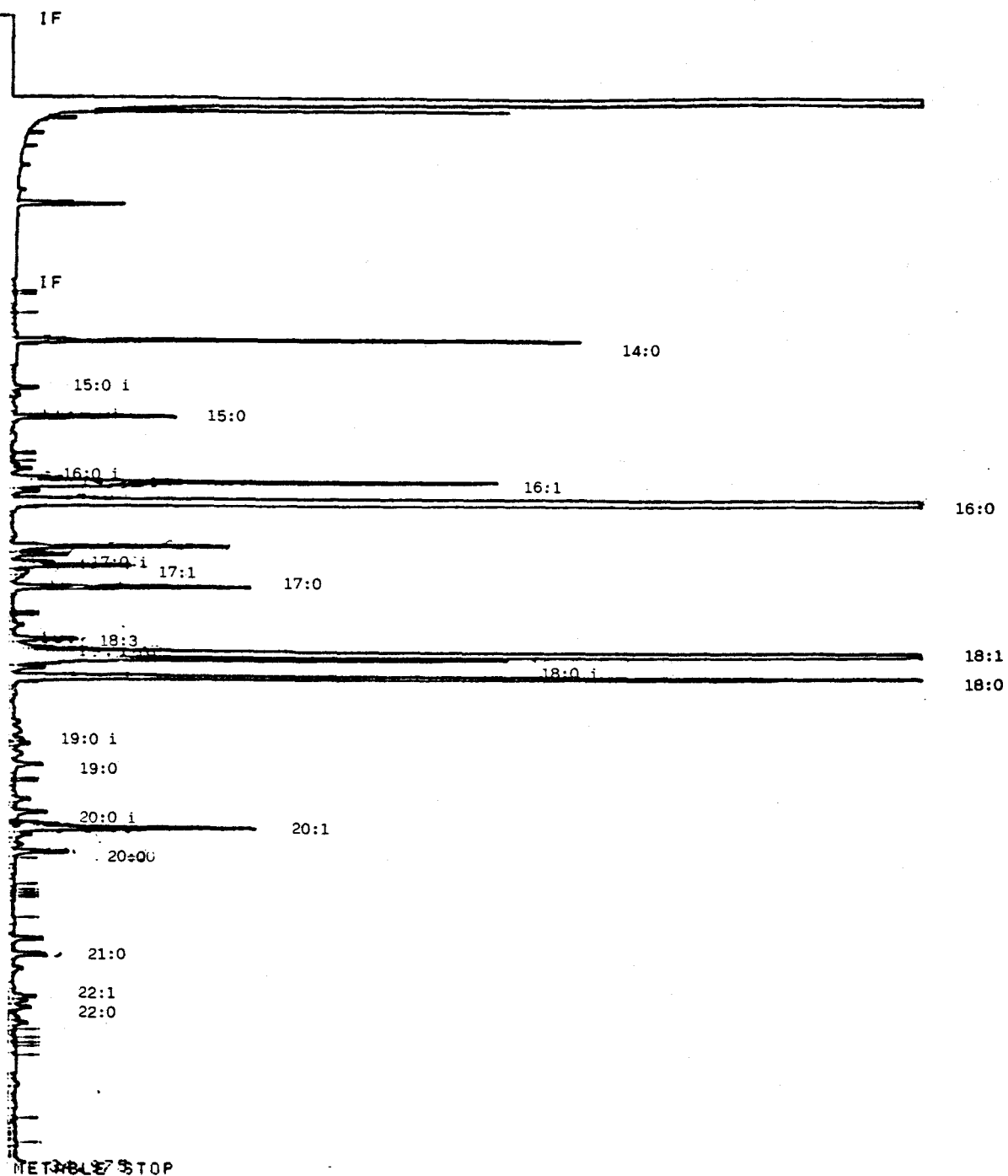
Las composiciones de alcoholes grasos resultaron ser casi idénticas se tratara de zona muscular dorsal, ventral o periosteal, siendo el alcohol graso mayoritario el alcohol cetílico (16:0), con porcentajes de 44,55%, 46,04% y 46,41% respectivamente, seguido del alcohol oleílico (18:1) con 24,41%, 23,39% y 24,37%. El tercer alcohol graso en porcentaje es el alcohol estearílico (18:0), con 9,31%, 8,91% y 8,58%, y el cuarto, el alcohol palmitílico (16:1), con 3,95%, 4,88% y 3,97% respectivamente.

TABLA 13 : COMPOSICIÓN EN ALCOHOLES GRASOS DE LAS CERAS DE DISTINTAS ZONAS MUSCULARES DE *RUVETTUS PRETIOSUS*.

ALC., GRASOS	DORSAL	VENTRAL	PERIOSTEA
14:0	3,56 ± 0,07	3,43 ± 0,08	3,50 ± 0,09
15:0 i	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,21 ± 0,05
15:0 ai	-----	0,05 ± 0,01	-----
15:0	1,14 ± 0,25	1,26 ± 0,13	1,17 ± 0,10
16:0 i	0,41 ± 0,08	0,35 ± 0,11	0,49 ± 0,05
16:1	3,95 ± 0,17	4,88 ± 0,55	3,97 ± 0,43
16:0	44,55 ± 2,52	46,04 ± 2,86	46,41 ± 2,63
17:0 i	0,30 ± 0,10	0,39 ± 0,12	0,30 ± 0,09
17:1	0,96 ± 0,03	1,01 ± 0,06	1,06 ± 0,15
17:0	1,91 ± 0,05	1,79 ± 0,11	1,90 ± 0,08
18:3	0,57 ± 0,06	0,35 ± 0,25	0,63 ± 0,16
18:2	0,48 ± 0,15	0,47 ± 0,06	0,41 ± 0,09
18:1	24,41 ± 1,35	23,39 ± 1,51	24,37 ± 2,05
18:0 i	3,82 ± 0,16	3,69 ± 0,17	3,83 ± 0,20
18:0	9,31 ± 0,50	8,91 ± 0,54	8,58 ± 0,35
19:0 i	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	-----
19:1	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,02	-----
19:0	0,28 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,24 ± 0,02
20:0 i	0,38 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,34 ± 0,02
20:1	2,29 ± 0,20	1,96 ± 0,23	1,85 ± 0,18
20:0	0,45 ± 0,09	0,47 ± 0,10	0,34 ± 0,03
21:0	0,42 ± 0,07	0,52 ± 0,09	0,39 ± 0,07
22:1	0,22 ± 0,02	0,26 ± 0,03	-----
22:0	0,17 ± 0,04	0,22 ± 0,05	-----

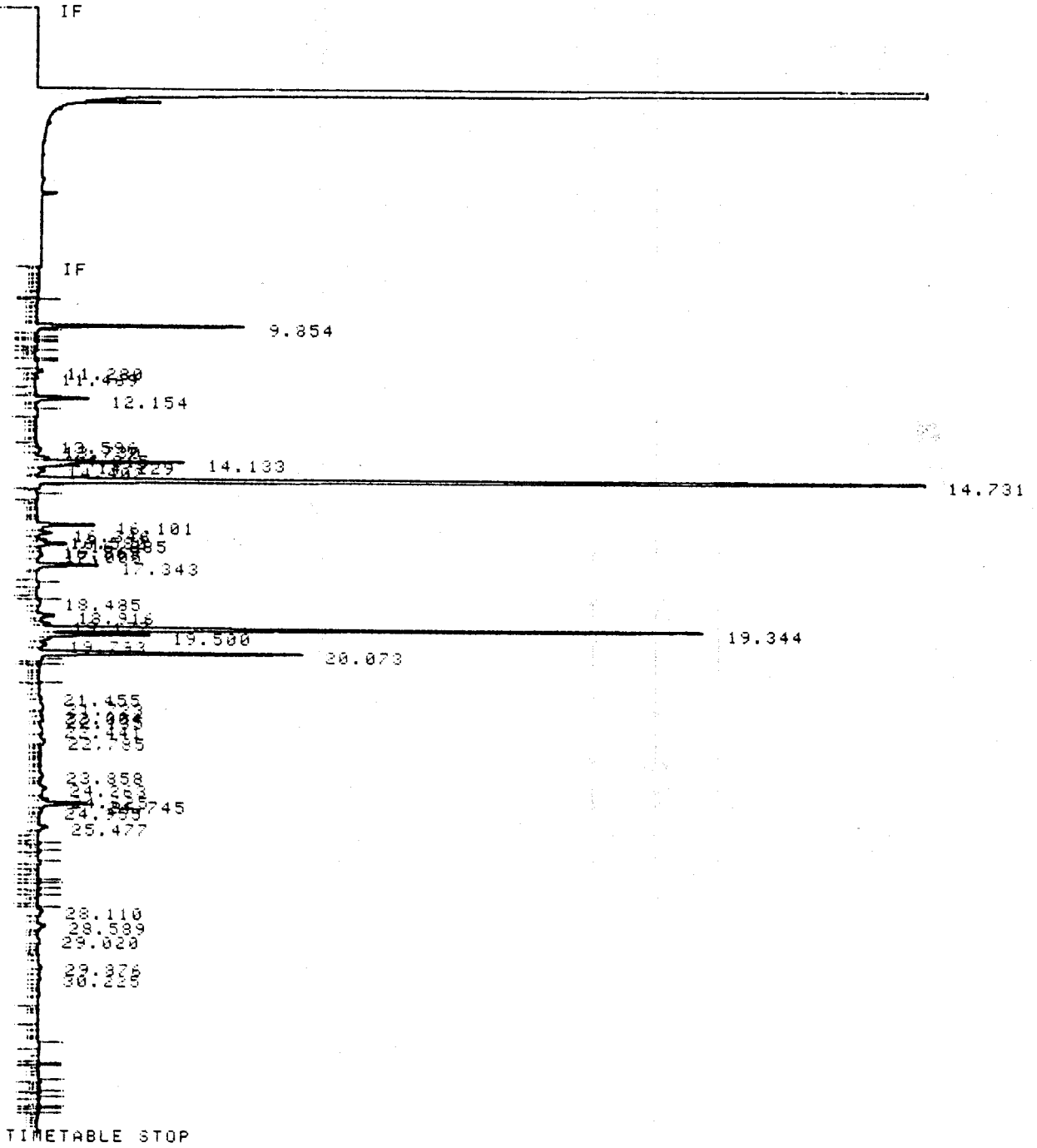
Resultados expresados en ± SD.

START

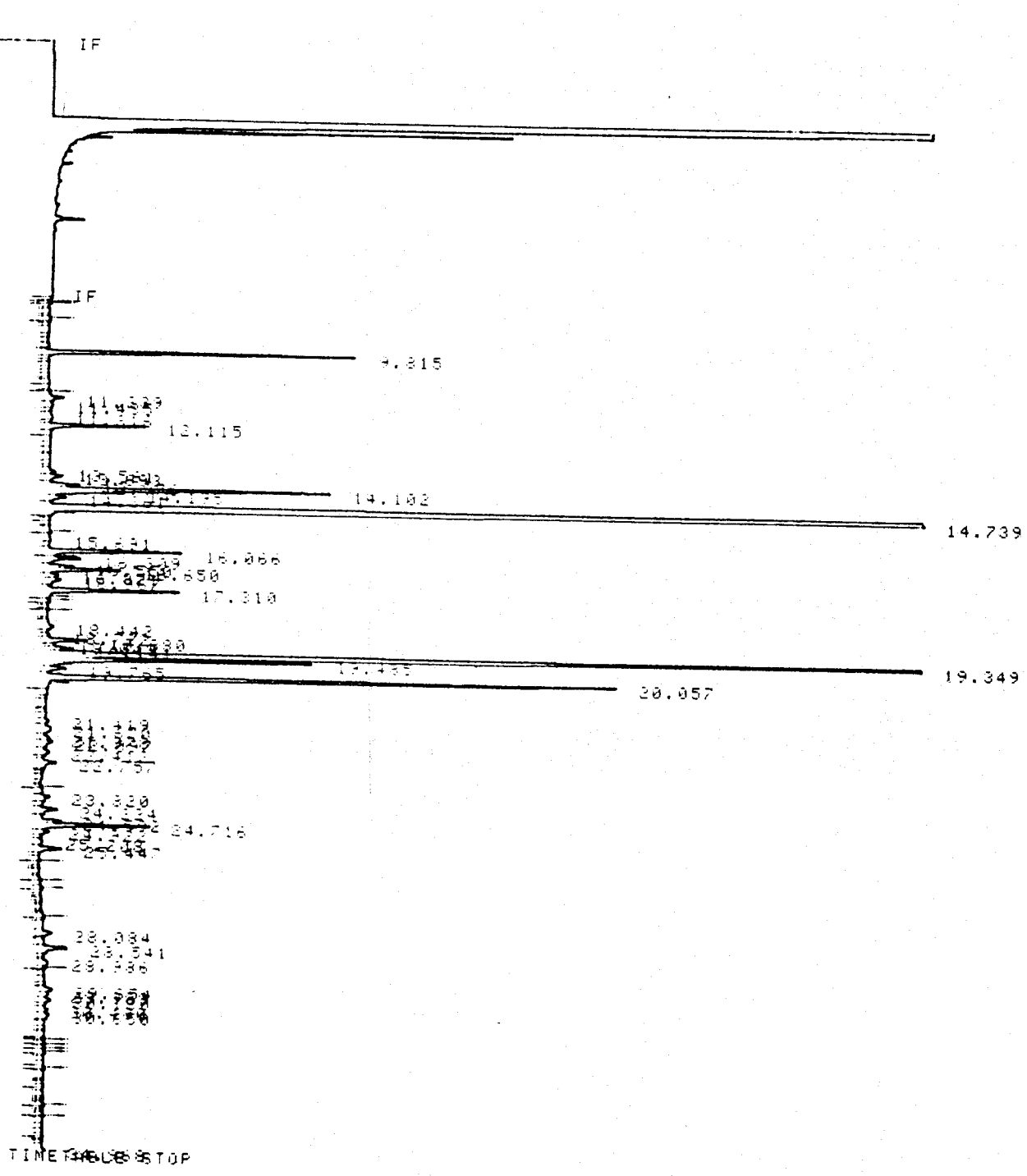


CROMATOGRAMA 13 : ALCOHOLES GRASOS DE CERAS DE ZONA MUSCULAR DORSAL.

START

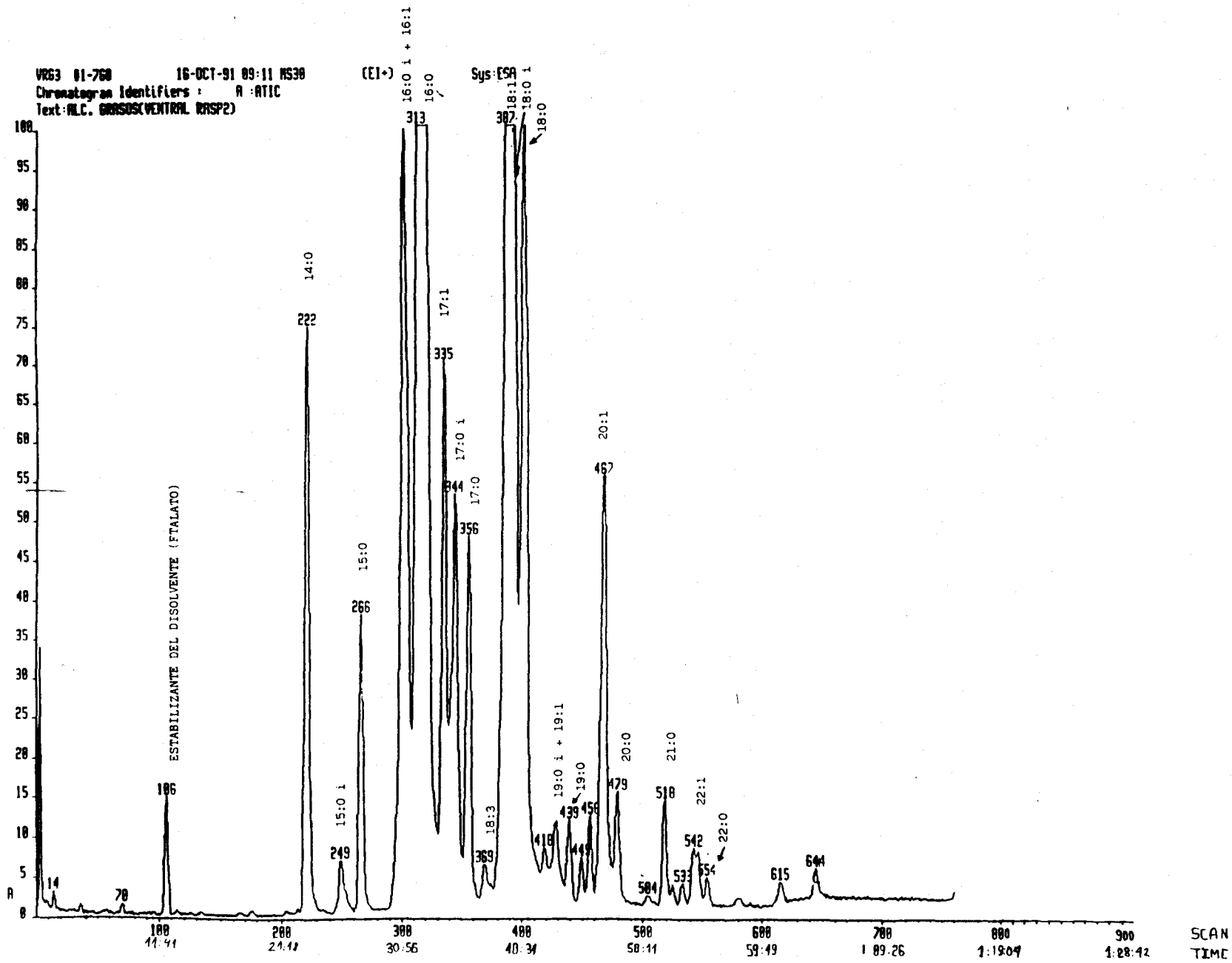


CROMATOGRAMA 14 : ALCOHOLES GRASOS DE CERAS DE ZONA MUSCULAR VENTRAL:



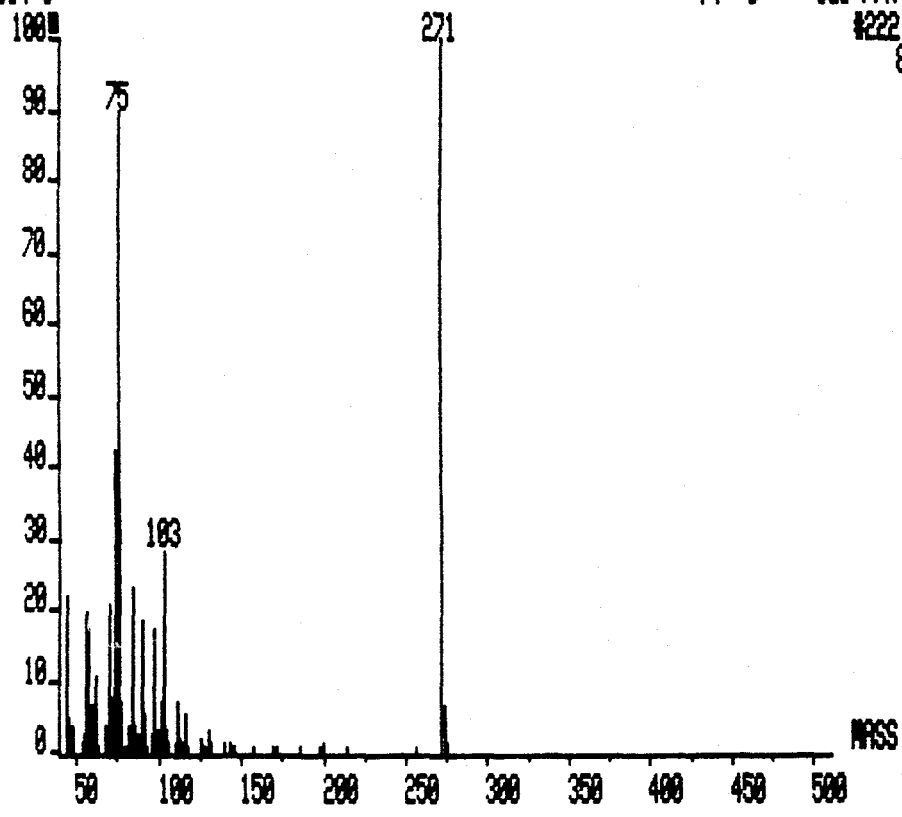
CROMATOGRAMA 15 : ALCOHOLES GRASOS DE CERAS DE ZONA PERIOSTEA.

VR63 01-760 16-OCT-91 09:11 NS30
Chromatogram Identifiers: R: RTIC
Text: ALC. GRASOS (VENTRAL RASP2)



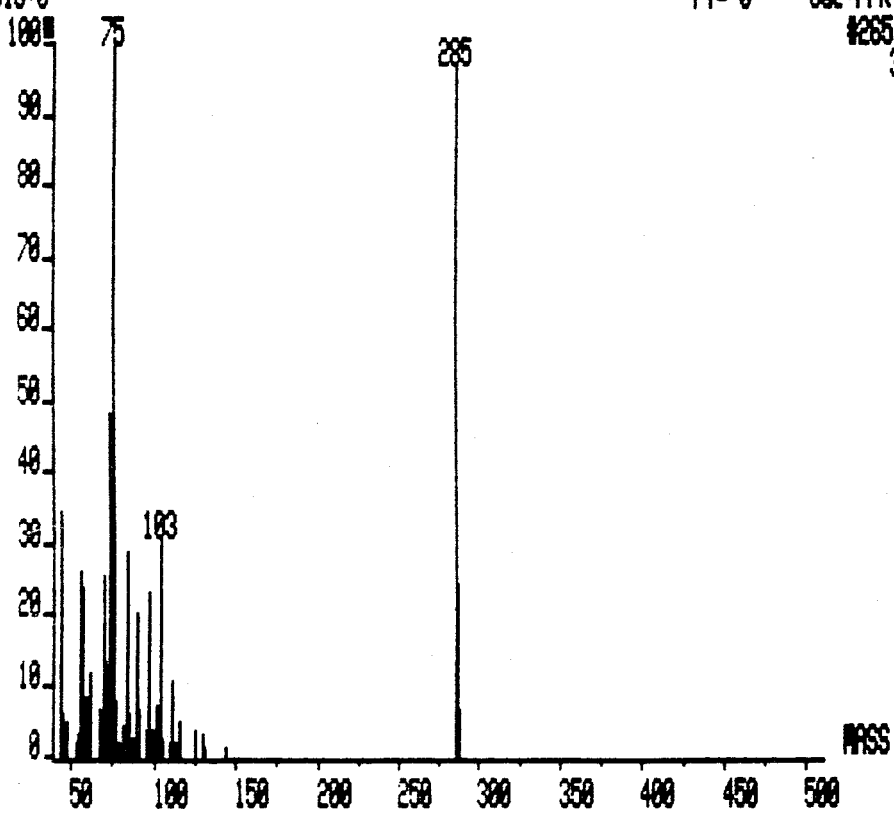
ESPECTRO 6 : ALCOHOLES GRASOS DE CERAS DE ZONA MUSCULAR VENTRAL.

VRG31222* x1 Bgd=216 16-OCT-91 09:14:23:25 MS30 EI+
BpM=0 I=1.3v Hm=0 TIC=48644000 Acnt: IG-CSIC Sys: ESR
C14:0 PT= 0° Cal: PFK
#222 1.0
8677000



ESPECTRO 7 : ALCOHOL GRASO 14:0.

VRG31265 x1 Bgd=260 16-OCT-91 09:1+0:27:33 MS30 EI+
Bp#=# I=485uv H#=# TIC=21344000 Acnt:IG-CSIC Sys:ESR
C15:0 PT= 0° Cal:PFK #265 1.0
3181000



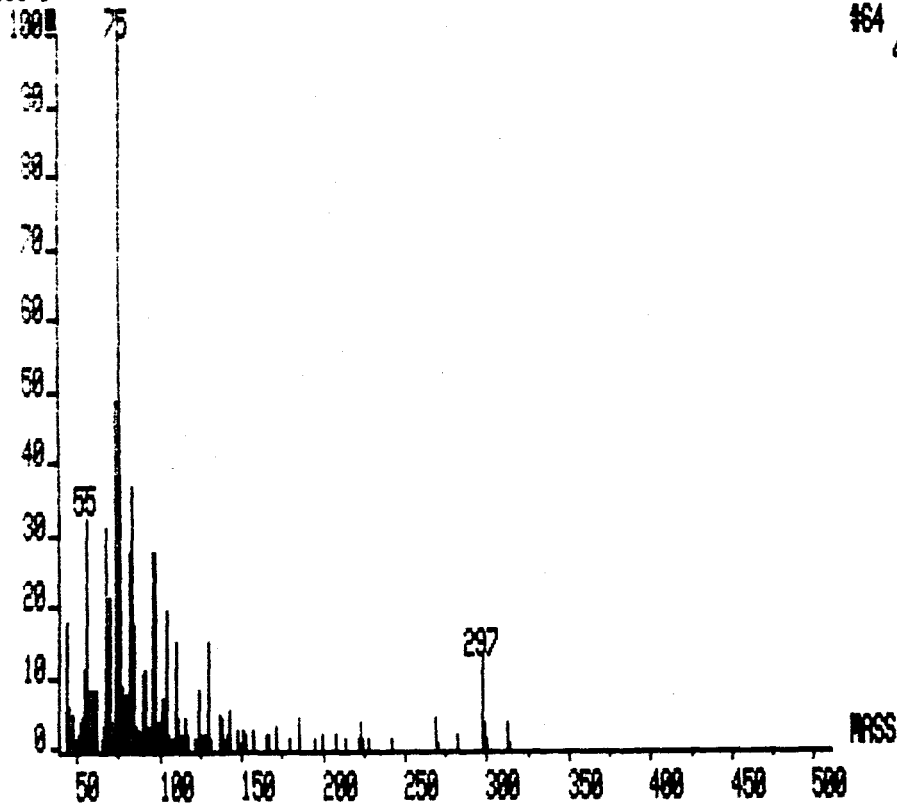
ESPECTRO 8 : ALCOHOL GRASO 15:0.

VR03464
Bp#0
016.1

x1 Bgd=55 31-OCT-91 14:40:08:07
I=669uv Ha=0 TIC=33446000

MS30 EI+
Acnt:IG-CSIC Sys:ESR
PT=0° Cal:PFK

#64 1.0
4385000



ESPECTRO 9 : ALCOHOL GRASO 16:1.

VR05#142

x1

Bgd=111

31-OCT-91 11:0+0:15:42

MS30

EI+

Bp#=#0

I=2.0v

H#=#0

TIC=136594000

Acnt:IG-CSIC

Sys:ESA

C18:1

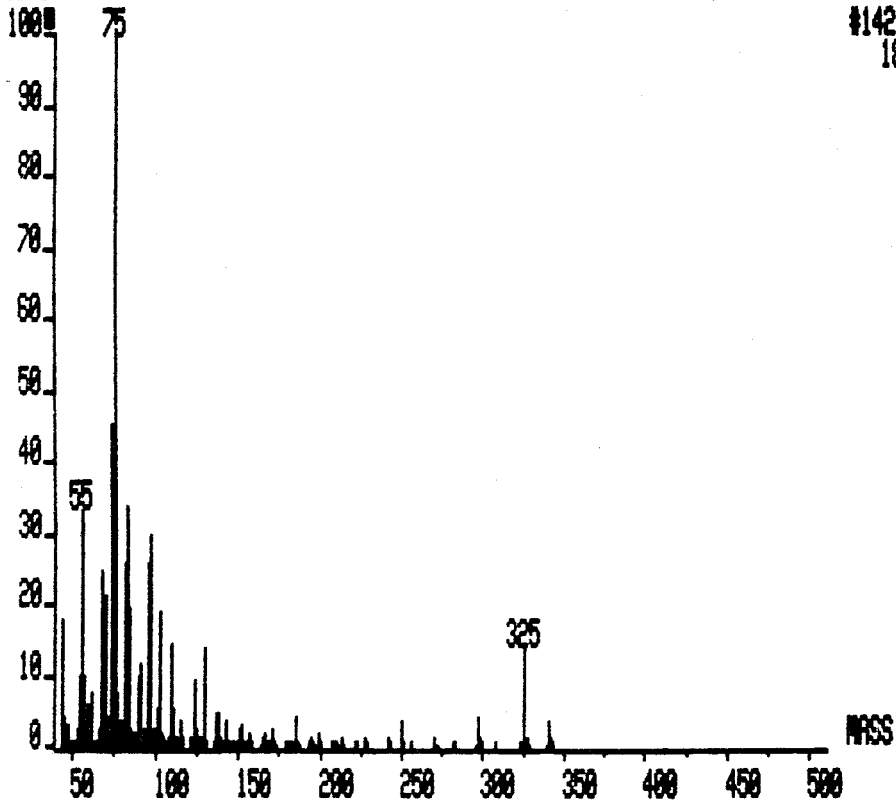
PT= 0°

Cal:PFK

#142

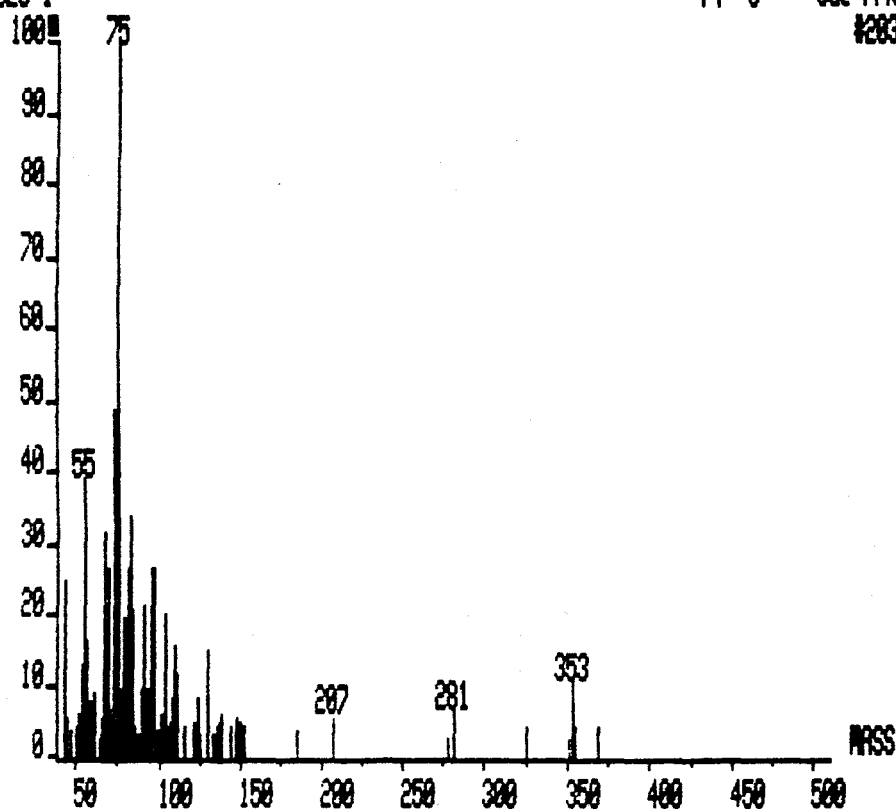
1.0

18619000



ESPECTRO 10 : ALCOHOL GRASO 18:1.

VR054283 x1 Bgd=195 31-OCT-91 11:00:21:34 MS38 EI+
Bp#-0 I=234uv Hm=0 TIC=13453000 Acnt: 10-CSIC Sys: ESR
C20:1 PT= 0° Cal: PFK
#283 1.0
1534000



ESPECTRO 11 : ALCOHOL GRASO 20:1.

V. DISCUSIÓN

1) Los porcentajes de lípidos totales de las distintas zonas musculares de *Ruvettus pretiosus* hallados en nuestro trabajo fueron menores que los resultados de Mori et al (1966,a), y mayores que los de Sato (1969). Así, en la zona muscular dorsal, encontramos un porcentaje de 16,70% frente al 23,10% de Mori y 16,45% de Sato; en zona muscular ventral, 16,17% frente a 18,50% y 13,63%. La carne blanca, subcutánea y periosteal fue estudiada también por Sato, con unos valores de 14,72%, 17,93% y 20-22% respectivamente, ligeramente diferentes a los resultados obtenidos en nuestro estudio: 15,43%, 21,40% y 16,19%.

Encontramos bibliografía más reciente de un pez perteneciente también a la familia *Gempylidae*, *Lepidocybium flavobrunneum*, que en algunos trabajos, como el de Mori et al (1966,a) era estudiado a la vez que *Ruvettus pretiosus*, dando como resultado un 19% de lípidos totales en zona muscular dorsal y 19,04% en ventral. Kinumaki et al (1977) y Berman et al (1981) sólo investigaron el contenido en lípidos totales del pez, sin especificar la zona estudiada, siendo éstos 20,6% y 23% respectivamente, levemente superiores a los de *Ruvettus pretiosus*. Kawai et al (1985) y Ukishima (1987) obtuvieron un 20% de lípidos totales en el músculo.

La cola sólo había sido estudiada por Mori (1966,a), con un porcentaje de lípidos totales en *Ruvettus pretiosus* de 13,80%, (casi igual al 13,55% que se encontró en nuestro trabajo), y de 18,5% en *Lepidocybium flavobrunneum*.

La única víscera de *Ruvettus pretiosus* cuyo porcentaje de grasa había sido estudiado era el hígado. Según Sato (1969), contenía 19,10% de lípidos, y según Nevenzel et al (1965), 26,10%. En nuestro estudio se obtuvo un valor intermedio, 22,66%. En el hígado de *Lepidocybium flavobrunneum*, Kawai et al (1985) encontraron un 13% de lípidos totales.

También analizamos por primera vez en el estudio de *Ruvettus pretiosus* las siguientes muestras: testículos, con 3,77%, vesícula biliar, 1,66% y tuétano, 4,76%.

2) Respecto a la materia insaponificable, Sato (1969) daba unos porcentajes de 41,30%, 44,90% y 24,40% para zona muscular dorsal, ventral y espinas respectivamente. En nuestro trabajo encontramos un resultado algo más alto en dorsal (46,43%) y prácticamente igual en ventral (44,54%), mientras que en la zona periosteal era de 47,22%.

En *Lepidocybium flavobrunneum*, Kinumaki et al (1977) encontraron un porcentaje de fracción insaponificable ligeramente superior (47,1%). Kawai et al (1985) analizaron el músculo, hallando un valor parecido (45,1%).

3) En cuanto a la composición lipídica de las distintas zonas de *Ruvettus pretiosus*, Nevenzel (1965) y Sato (1969) estudiaron el músculo en general, con unos porcentajes de 91,50% y 93,28% de ceras, 3,30% y 3,10% de TG, 3,40% y 1,89% de LP (AGL, alcoholes, MG y DG), y 1,80% y 1,55% de FL. En nuestro trabajo analizamos por separado las zonas musculares dorsal y ventral, con valores para ceras de 91,62% y 90,46%; TG, 4,59% y 4,15%; AGL, 0,87% y 1,19%; DG, 0,37% y 0,60%; y FL 2,67% y 3,61%. En cuanto a la cola, el resultado más significativo era de un 98,65% de ceras. Por tanto, los valores encontrados en FL eran ligeramente más altos, siendo muy parecidos los de ceras y TG.

El hígado fue estudiado sólo por Nevenzel (1965), con porcentajes de 3,90% de ceras, 43,10% de TG, 37,80% de LP y 15% de FL. Sato (1969) estudió las vísceras en general, por lo que los resultados varían bastante: 41,50%, 27,81%, 10,28% y 20,39% respectivamente. Nosotros encontramos valores de 0,95% de EC, 2,57% de ceras, 72,47% de TG, 6,30% de AGL, 1,16% de DG, 2,51%

de COL y 14,04 de FL, apreciándose una gran diferencia en el porcentaje de TG, que resultó ser casi el doble.

La composición lipídica de los testículos fue estudiada por Sato (1969), con los resultados de 22,43% de ceras, 45,10% de TG, 10,72% de LP y 21,83% de FL, mientras que en nuestro trabajo encontramos valores de 2,41% de EC, 24,36% de ceras, 11,71% de TG, 5,53% de AGL, 13,57% de DG, 0,44% de COL y 41,97% de FL, existiendo por tanto una gran diferencia en los porcentajes de TG y FL, y una gran semejanza en el de las ceras.

También estudiamos el tuétano de las espinas (1,69% de EC, 72,85% de ceras, 9,66% de TG, 1,28% de AGL, 1,55% de DG y 12,97% de FL), mientras que Sato (1969) analizó las espinas, encontrando porcentajes de 93,13% de ceras, 3,31% de TG, 1,53% de LP y 2,04% de FL, existiendo una gran desigualdad entre los resultados.

Las composiciones lipídicas de vesícula y sopa han sido analizadas por primera vez en nuestro trabajo, constituyendo una materia novedosa.

Mori et al (1966,a) analizaron también la composición lipídica del aceite de *Lepidocybium flavobrunneum*, con los siguientes resultados: 0,38% de hidrocarburos, 89,44% de ceras, 1,17% de glicéridos y 2,67% de sustancias polares. Kawai et al (1985) estudiaron la composición lipídica del músculo obteniendo valores para las ceras de 94,3%, 1,7% de TG, 2,0% de AGL, 0,3% de COL y por último 1,2% de FL. Ukishima (1987) analizó el músculo, hallando un porcentaje de ceras más parecido al de Mori (88,8%).

En el hígado, Kawai et al encontraron valores de 3,0% de ceras, 7,1% de TG, 83,4% de AGL, 1,2% de COL y 4,3% de FL, haciendo notar estos autores en su trabajo que el alto contenido de AGL encontrado en este órgano era debido a que se formaban aparentemente por hidrólisis de los TG, durante el almacenamiento en congelador. Ukishima (1987) daba como resultado un 88,8% de

ceras en el músculo.

4) Según Mori (1966,a), en la composición de ácidos grasos de las ceras y de los lípidos totales, era el oleico [18:1 (n-9)] el mayoritario, seguido del eicosenoico [20:1(n-11)], con porcentajes de 72,10% y 57,80% de oleico, y 10,90% y 11,50% de eicosenoico respectivamente. El tercer ácido graso en los lípidos totales era según Mori el palmítico (16:0), con 7,9%.

Nevenzel (1965) estudió los ácidos grasos de las ceras de la carne, encontrando valores muy parecidos a los de Mori [76,70% de oleico, 11% de eicosenoico y 3,60% de docosenoico [22:1 (n-11)]. También estudió los ácidos grasos de lípidos totales del hígado, siendo los mayoritarios oleico y palmítico.

Sato (1969) igualmente encontró como mayoritario al ácido oleico (66,70% en zona muscular dorsal, 60,20% en ventral, 68,10% en zona subcutánea y 72,70% en las espinas), seguido del eicosenoico (8,80% en zona muscular dorsal, 11,10% en ventral, 10,30% en zona subcutánea y 8,90% en las espinas). Los mayoritarios en hígado sin embargo eran distintos, pues aunque el de mayor porcentaje era también el oleico, su valor disminuía (39,90%), y además lo seguían el docosahexaenoico [22:6(n-3), 11,40%] y el palmítico (16:0, 11,70%).

En los estudios de Levanidov et al (1979), los mayoritarios eran diferentes: oleico, eicosadienoico [20:2(n-11)] y eicosapentaenoico [20:5(n-3)].

En nuestro análisis de los ácidos grasos de los lípidos totales, los resultados no varían respecto al mayoritario, que sigue siendo el oleico en todas las zonas, pero su valor es menor que en los trabajos anteriores, encontrándose entre un 45,02% y 52,44% en zona muscular dorsal, ventral, zona subcutánea, periosteal y sopa. El segundo ácido graso en porcentaje ya no es el eicosenoico, sino el docosahexaenoico [22:6(n-3)] en zona muscular dorsal (9,64%) y subcutánea (8,55%). En estas dos zonas

va seguido de cerca por el eicosenoico [20:1(n-11)] con 6,40% en dorsal y 6,55% en subcutánea. Sin embargo, el eicosenoico es el segundo ácido graso en porcentaje en la zona muscular ventral (8,37%), zona periosteal (6,35%) y sopa (6,89%), seguido del docosahexaenoico (7,90% en zona muscular ventral, 4,91% en zona periosteal y 5,56% en la sopa). Las composiciones de ácidos grasos de hígado y tuétano se parecen entre sí, con oleico como mayoritario (47,10% y 45,02%), seguido de palmítico (15,77% y 19,82%) y siendo el tercer ácido graso en porcentaje el docosahexaenoico (7,84%) en hígado y eicosenoico (7,15%) en tuétano. La composición de los testículos es distinta a las de los anteriores, ya que sus tres ácidos grasos mayoritarios tienen porcentajes muy parecidos: 22,22% de oleico, 18,79% de palmítico y 18,25% de docosahexaenoico, seguidos de esteárico (18:0), 7,43% y eicosenoico, 6,72%.

En las ceras, los tres ácidos grasos mayoritarios de las zonas musculares estudiadas (dorsal, ventral y periosteal) siguen siendo los mismos que encontramos en los lípidos totales, siendo el de mayor porcentaje el oleico (45,03% en dorsal, 46,71% en ventral y 51,96% en zona periosteal), seguido del docosahexaenoico (10,15%, 7,19% y 6,83%) y el eicosenoico (5,64%, 7% y 6,09%).

Los porcentajes de saturados, monoinsaturados, diinsaturados y poliinsaturados han sido estudiados por primera vez en nuestro trabajo.

En *Lepidocybium flavobrunneum*, Mori et al (1966,a) encontraron los mismos ácidos grasos mayoritarios en ceras y lípidos totales, aunque con diferentes porcentajes: 64,2% y 32,4% de oleico respectivamente, 24,7% y 28,7% de eicosenoico y 6,4% y 18,9% de docosenoico. Berman et al (1981) sólo analizaron los ácidos grasos de las ceras, con el resultado de un 80% de oleico (mayor que el anterior), 15% de eicosenoico (menor que el de Mori), 2% de palmitoleico [16:1 (n-7)] y 2% de docosahexaenoico.

Kawai et al (1985) analizaron por un lado los ácidos grasos de los lípidos totales del músculo, y por otro lado del hígado. En ambos casos el ácido graso mayoritario era el oleico (81% y 53%), seguido a distancia en el músculo por el palmitoleico (5%) y eicosenoico (4%), y en el hígado, por el palmítico (19%) y docasaheptaenoico (75). Al analizar las ceras del músculo, los resultados obtenidos fueron casi iguales a los de los lípidos totales del músculo: 85% de oleico, 4% de palmitoleico y 4% de eicosenoico.

5) En cuanto a los alcoholes grasos, todos los investigadores dan como mayoritario en *Ruvettus pretiosus* al alcohol cetílico (16:0), con un porcentaje de 48,10% según Mori (1966,a) y 57,60% según Nevenzel (1965). Sato (1969) distingue entre zona muscular dorsal (49,40% de cetílico), ventral (39,90%) y espinas (49%). En nuestro estudio se encontraron valores parecidos, aunque algo menores (44,50% en zona muscular dorsal, 46,04% en ventral y 46,41% en periostea).

El segundo alcohol graso en porcentaje es para casi todos los autores el alcohol oleílico (18:1) con valores de 29,50% según Mori, 29% según Nevenzel, y según Sato, 15,90% en zona muscular dorsal, 19,20% en ventral y 16,60% en espinas. En nuestro estudio los valores son intermedios: 24,41% en dorsal, 23,39% en ventral y 24,37% en zona periostea.

El tercer alcohol es distinto según el investigador. Para Mori, Nevenzel y Sato es el alcohol palmitoleílico (16:1) con alrededor del 8%, mientras que para Ukishima (1979), que coincide en el primer y segundo alcohol con los demás investigadores, el tercer alcohol graso es el docosenoílico (22:1). En nuestro trabajo el tercero es el alcohol estearílico (18:0), con valores de alrededor del 9%.

El cuarto alcohol es el estearílico según Mori, Sato y Nevenzel, con valores variables desde 2,90% en Nevenzel, 5,30%

en Mori y alrededor de 7% en Sato. En nuestro trabajo, el cuarto es el alcohol palmitoleílico, con valores alrededor del 4%. Según Ukishima, el cuarto era el alcohol eicosenoílico (20:1). Levanidov et al (1979) coincidieron en el primer alcohol (cetílico), pero como segundo encontraron el octadecílico, y como tercero el alcohol oleílico.

En *Lepidocybium flavobrunneum*, también el alcohol graso mayoritario según todos los autores es el cetílico, con porcentajes variables: 33,7% según Mori et al (1966,a), 43% según Berman et al (1981) y 65% según Kawai et al (1985).

El segundo alcohol graso en porcentaje es el oleílico, con valores de 24,6% según Mori et al y 16% según Berman y Kawai.

El tercer alcohol graso es el eicosenoílico para Mori y Berman (11,2% y 15% respectivamente), y el estearílico según Kawai, con un 7%.

6) Respecto a los fosfolípidos, no habían sido estudiados antes, por lo que no se pueden comparar los resultados obtenidos con los de otros trabajos precedentes.

VI. CONCLUSIONES

1) El mayor porcentaje de grasa en *Ruvettus pretiosus* se encuentra en el hígado, con un 22,66%, seguido de la zona muscular subcutánea, con 21,40%. El resto de las zonas musculares tienen porcentajes muy parecidos (alrededor del 16%), excepto la cola, con un porcentaje un poco más bajo (13,55%). EL tuétano (4,76%), los testículos (3,77%) y la vesícula biliar (1,66%) son la zonas con menor grasa.

2) Los porcentajes de fracciones insaponificables de las zonas musculares estudiadas son muy parecidos: zona muscular dorsal, 46,43%; ventral, 44,54%; periosteal, 47,22%.

3) En las zonas musculares, la fracción mayoritaria está formada por las ceras, con un 91,2% en zona muscular dorsal, 90,46% en ventral, y el mayor porcentaje en la cola (98,65%).

El segundo compuesto en porcentaje son los TG, con 4,59% en dorsal, y 4,15% en ventral, seguidos de los FL (2,67% y 3,61% respectivamente).

En la cola el segundo compuesto son los EC (0,79%), siendo la única zona muscular donde se detectaron, seguidos de los FL (0,56%).

Los AGL y DG alcanzaron valores bastante bajos en dorsal y ventral: 0,87% y 0,37% en dorsal y 1,19% y 0,60% en ventral.

4) En cuanto a los órganos, la fracción mayoritaria en hígado son los TG, con 72,47%, mientras que en testículos son los FL (41,97%) y en vesícula biliar las ceras (75,10%).

El porcentaje de ceras es muy bajo en hígado (2,57%), y algo mayor en testículos (24,36%).

Los FL suman un 14,04% en hígado y 6,10% en vesícula biliar, además de 41,97% en testículos, por lo que se encuentran en bastante mayor proporción en los órganos que en las zonas musculares.

El porcentaje de AGL es mayor en las vísceras (alrededor del 6%), y también los DG, sobre todo en los testículos (13,57%) y vesícula biliar (9,72%).

También se encontró colesterol en los órganos, aunque con porcentajes más bien bajos: 2,51% en hígado, 2,78% en vesícula biliar y 0,44% en testículos.

5) Los FL de *Ruvettus pretiosus* han sido analizados por primera vez en este estudio. El FL en mayor proporción es la fosfatidilcolina, que alcanza en los testículos e hígado un 49,36% y 43,74% respectivamente.

En los testículos, la fosfatidilcolina va seguida de la fosfatidilserina (29,78%) y la fosfatidiletanolamina (12,91%), siendo el minoritario la esfingomielina con un 7,96%.

En el hígado, el segundo FL en porcentaje es la fosfatidiletanolamina (25,87%), seguido de la fosfatidilserina (16,32%) y esfingomielina (10,03%). Por último, en el hígado se detectó también cardiolipina (2,58%) y lisofosfatidilcolina (1,45%).

6) El ácido graso principal en todas las zonas estudiadas es el oleico [18:1(n-9)], con los porcentajes siguientes: 45,21% en zona muscular dorsal, 47,68% en ventral, 45,61% en zona subcutánea, 47,10% en hígado, y descendiendo hasta un 22,22% en testículos.

El docosahexaenoico [22:6(n-3)] es el segundo ácido graso en la zona muscular dorsal (9,64%) y subcutánea (8,55%); el eicosenoico [20:1(n-11)] en la zona muscular ventral (8,37%); y el palmítico (16:0), en hígado (15,77%) y testículos (18,79%).

En nuestro estudio se han descrito por primera vez los porcentajes de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, diinsaturados, poliinsaturados y la relación saturados/poliinsaturados.

En las zonas musculares, los monoinsaturados representan la mayor fracción, alrededor del 65%, seguidos a distancia por los poliinsaturados (alrededor del 25%), mientras que la relación saturados/poliinsaturados se encuentra entre 0,34 en zona periosteal y 0,21 en zona subcutánea.

En el hígado, los monoinsaturados alcanzan un 60,50%, seguidos de los ácidos grasos saturados (21,78%), mientras que en los testículos son los poliinsaturados y monoinsaturados los mayoritarios (37,51% y 34,61%). Respecto a la relación saturados/poliinsaturados, en el hígado es de 1,54, y en los testículos, 0,71.

En el tuétano, los monoinsaturados son los mayoritarios (59,36%), seguidos de los saturados (23,14%). La relación saturados/poliinsaturados es 1,42.

7) En el estudio de las ceras de las distintas zonas musculares, podemos concluir que:

a) los alcoholes grasos son muy similares, se trate de zona muscular dorsal, ventral o periosteal, siendo el mayoritario el alcohol cetílico (16:0), con 44,55%, 46,04% y 46,41% respectivamente, seguido de alcohol oleílico (18:1) con 24,41%, 23,39% y 24,37%, y

b) que la composición de ácidos grasos de las ceras es muy parecida a la de los lípidos totales de las mismas zonas, con 45,03% de ácido oleico en la zona muscular dorsal, 46,71% en ventral y 51,96% en periosteal, seguido de un 10,15% de docosahexaenoico en zona muscular dorsal, 7,19% en ventral y 6,83% en periosteal. Los porcentajes de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, diinsaturados, poliinsaturados y la relación saturados/poliinsaturados son también similares.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Bauchot, M.L. y Pras, A. (1987).- "Guía de los peces de mar de España y de Europa".- Ed. Omega S.A., 2ª edición.
- 2 Becke, Louis (1901).-"By rock and pool on an Austral shore".-London, pp. 63 and 148-158.
- 3 Berman, P., Harley, E.H. and Spark, A.A. (1979).- "Keriorrhea -the passage of oil per rectum- after ingestion of marine wax esters".-S. Afr. Med. J. (Pub. 1981), 59(22), 791-2.
- 4 Capen, R. L. (1967).-"Swimbladder morphology of some mesopelagic fishes in relation to sound scattering".-Report 1447, U. S. Navy Electronics Laboratory, San Diego, California.
- 5 Cox, W.M.Jr. and Reid, E.E. (1932).-"The chemical composition of oil of *Ruvettus pretiosus*, the 'Castor Oil Fish'".-J. Am. Chem. Soc., 54, 220.
- 6 Channon, H.J. (1926).-Biochem. J., 20, 400-408.
- 7 Chevreul, M.E.-Ann. Chim. Phys.-[1] 95:5 (1815); Ibid. [2] 7:155 (1817).
- 8 Folch, J., Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. (1957).-"A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues".-Journal of biological chemistry, 226, 497-509.
- 9 Fukasawa, Y. and Shimizu, G. (1982, Pub. 1983).-"Wax esters in fish. 2. Determination of wax esters".-Yamanashi-Kenritsu Eisei Kogai Kenkyusho Nempo, 26, 15-16.

- 10 Gudger, E. W. (1925).-"A new purgative, the oil of the 'Castor Oil Fish', *Ruvettus*".-Boston Med. Surg. J., 192, 107-111.
- 11 Halstead, B. (1967).-"Poisonous and venomous marine animals", Vol. II, p. 627.
- 12 Iyengar, R. and Schlenk, H. (1967).-Biochemistry, 6:396.
- 13 Kawai, N. and Nakayama, Y. (1985).-"Lipid composition of various tissues of *Lepidocybium flavo-brunneum*".-Yukagaku, 34(1), 25-31.
- 14 Kimura, K. (1926).-Kogyo Kagaku Zasshi, 29:620.
- 15 Kinumaki, T., Arai, K. and Sugii, K. (1977).-"Nutritive value of fish containing a large amount of alkoxydiglyceride or wax ester in the meat".-Tokai-ku Suisan Kenkyusho Kenkyu Hokoku, 91, 73-91.
- 16 Krämer, Augustin (1901).-"Der Purgierfisch der Gilbertinseln".-Globus, Vol. 79, pp. 181-183.
- 17 Lefort, D., Paquot, C. and Pourchez, A. (1961).-Oleagineux, 16, 253.
- 18 Lester, D. and Bergmann, J. W. (1941).-J. Org. Chem., 6:120.
- 19 Levanidov, I.P. and Bakholdina, L.P. (1979).-"Lipids in the muscle tissue of oilfish".-Rybn. Khoz. (Moskow), (2), 60-2.
- 20 Lovern, J.A. (1935).-Biochem. J., 29:847.
- 21 Lovern, J.A. (1964) in "Oceanography and marine biology; an annual review" Vol. 2, Edited by H. Barnes, Allen and Unwin, London, p. 169.

- 22 Lowe, Richard T. (1841).-"A synopsis of the fishes of Madeira, etc.".-Trans. Zoölogical Society, London, 2, 180-181.
- 23 Mancke, R. (1926-1927).-Z. Physiol. Chem. (Hoppe-Seyler), 162, 244.
- 24 Marshall, N.B. (1960).-Discovery Rept., 31:68.
- 25 Marshall, N.B. (1966).-"The life of fishes".-World Publishing Co., Cleveland and New York, p. 69-71.
- 26 Mori, M., Saito, T., Nakanishi, Y., Miyazawa, K. and Hashimoto, Y. (1966,a).-"Marine biotoxins XI. The composition and toxicity of wax in the flesh of castor oil fishes".- Nippon Suisan Gakkaishi, 32:137.
- 27 Mori, M., Saito, T. and Nakanishi, Y. (1966,b).-"Occurrence and chemical properties of wax in the muscle of an African fish, *Allocyttus verrucosus*".-Nippon Suisan Gakkaishi, 32:668.
- 28 Mori, M. and Saito, T. (1966,c).-"Occurrence and composition of wax in mullet and stockfish roes".-Nippon Suisan Gakkaishi, 32:730.
- 29 Morishima, K. (1957).-"Yakurigaku", Nankodo Co., 443, 465.
- 30 Nevenzel, J.C., Rodegker, W. and Mead, J.F. (1965).-"The lipids of *Ruvettus pretiosus* muscle and liver".- Biochemistry, Vol. 4, No. 8, 1589-1594.
- 31 Nevezel, J.C., Rodegker, W., Mead, J.F. and Gordon, M.S. (1966).-"Lipids of the Living Coelacanth, *Latimeria chalumnae*".-Science, 152:1753.

- 32 Nevenzel, J.C. (1969,a).-"Occurrence,function, and biosynthesis of wax esters in marine organisms".-Lipids, Vol.5(3), 308-318.
- 33 Nevenzel, J.C. et al (1969,b).-"The lipids of some lantern fishes (family *Myctophidae*)".-Comp. Biochem.Physiol., 31, 25-36.
- 34 Nordhoff, C.B. (1928).-Natural History, 28, 40-45.
- 35 Roubal, W.T. (1963).-J. Am. Oil Chemists' Soc., 40, 213.
- 36 Sato, Y. and Tsuchiya, Y. (1969).-"Lipids of *Ruvettus pretiosus*.I. Composition of alcohols and fatty acids".-Tohoku J. Agr. Res., 20 (2), 89-95.
- 37 Sato, Y. and Tsuchiya Y. (1970).-"Lipids of *Ruvettus pretiosus*. II. Composition of the unsaponifiable matters and the purgative action of the oils on mice".-Tohoku J. Agr. Res., 21(3-4), 176-82.
- 38 Stoffel, W. and Ahrens, E. H. Jr. (1960).-J. Lipid. Res., 1, 139-46.
- 39 Tsujimoto, M. and Koyanagi, H. (1937).- *J. Soc. Chem. Ind., Japan (now J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Sect.)*, 40, 867.
- 40 Ukishima, Y. (1984).-"A simple discrimination between slices of sale-prohibited fish (escolar and castor oil fish) and those of edible fish by wax analysis".-Eisei Kagaku, 30(4), 216-21.
- 41 Ukishima, Y. (1987).-"Wax components of escolar (*Lepidocybium flavo-brunneum*) and its applications in medicine and cosmetics".-Yakugaku Zasshi, 107(11), 883-90.

- 42 Weber, Max (1902).-"Siboga expeditie, Monographie I. Introduction et description de l'expedition".-Leiden, pp. 96-97.
- 43 Weber-van Bosse, Frau A. (1905).-"Ein yahr am bord I.M.S. Siboga".-Leipzig, pp. 243-244.