

Estudio del metabolismo de ácidos grasos en peces marinos. Comparación del perfil de ácidos grasos del músculo de tres especies de hábitos alimenticios diferentes.

Study of the metabolism of fatty acids in marine fish. A comparison of flesh fatty acid profiles from three species of different eating habits.



Trabajo de Fin de Grado

RAQUEL HERNÁNDEZ GARCÍA

Tutorizado por Covadonga Rodríguez González y Roberto Dorta Guerra.

Grado en Biología. Septiembre 2017

El presente trabajo forma parte del Proyecto Nacional: PROPUFA W3; “Caracterización y modulación de la biosíntesis de w3 LC-PUFA en peces: una cuestión de sostenibilidad para la futura diversificación de la acuicultura”.

Financiación: AGL2015-70994-R. Ministerio de Economía y Competitividad, España.



**SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN
TRABAJO FIN DE GRADO
Curso Académico: 2016/2017**

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte: 78644669-X | Nombre y Apellidos: RAQUEL HERNÁNDEZ GARCÍA

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Estudio del metabolismo de ácidos grasos en peces marinos. Comparación del perfil de ácidos grasos del músculo de tres especies de hábitos alimenticios diferentes.

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Covadonga Rodríguez González

Profesor/a del Departamento de Biología Animal y Edafología y Geología

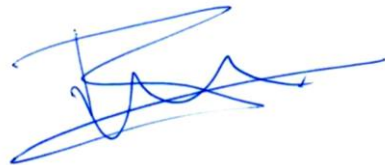
y D./Dña. Roberto Dorta Guerra

Profesor/a del Departamento de Estadística e Investigación Operativa

autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado



Fdo.: Covadonga Rodríguez. Glez.



Fdo.: Roberto Dorta Guerra

La Laguna, a 30 de Julio de 2017

Firma del interesado/a



ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Situación actual de la acuicultura.....	1
1.2.- Ácidos grasos poliinsaturados, importancia y funciones fisiológicas.....	3
1.3.- Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados.....	5
1.4.- La dieta como herramienta para adquirir lípidos funcionales y mantener la salud	7
1.5.- Especies objeto de estudio	8
<i>Chelon labrasus</i> (lisa barbuda):.....	8
<i>Sarpa salpa</i> (salema):.....	9
<i>Pegusa lascaris</i> (lenguado de arena):.....	9
2.- OBJETIVOS	10
2.1- Objetivo general:.....	10
2.2- Objetivos específicos:	10
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1.- Obtención de los ejemplares:	11
3.2.- Extracción de lípidos y humedad:	11
3.3.- Transmetilación y purificación de ácidos grasos:	12
3.4.- Cromatografía de gases:.....	13
3.5.- Determinación de proteína por el método Kjeldahl:	14
3.6.- Índices de calidad lipídica:.....	14
3.7.- Análisis estadísticos	15
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	16
4.1 Perfil de ácidos grasos	16
4.2.- Análisis de Componentes principales	21
4.3 Valor nutricional.....	23
4.4 Índices de calidad lipídica	24
5. CONCLUSIONES.....	26
6. AGRADECIMIENTOS.....	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28

RESUMEN:

La acuicultura proporciona a la población una importante fuente de proteína de calidad y de ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3 (n-3 HUFA; eicosapentaenoico o EPA; 20:5n-3 y docosahexaenoico o DHA; 22:6n-3), fisiológicamente esenciales para el correcto desarrollo y la preservación de la salud humana. El n-6 HUFA, ácido araquidónico o ARA; 20:4n-6, y su precursor, el ácido linoleico; 18:2n-6, es muy abundante hoy en día, en el alimento de origen terrestre, siendo muy importante para la salud que la relación dietaria n-3/n-6 esté equilibrada, de modo que las relaciones de DHA/EPA/ARA en el organismo sean las adecuadas. La gran variabilidad demostrada recientemente por ciertas especies de peces en la biosíntesis de EPA y DHA indica que el estudio de los perfiles de estos ácidos grasos y su biosíntesis en nuevas especies, es esencial para la futura diversificación de la acuicultura. Ello facilitaría la selección de especies cuya alimentación sea más ecosostenible, permitiendo minimizar la necesidad de pescado de pesca extractiva en su alimentación, y garantizando su valor nutricional. En el presente estudio se comparan los perfiles de ácidos grasos del músculo de tres especies de peces marinos; el mugílido omnívoro, *Chelon labrosus*, el espárido herbívoro, *Sarpa salpa*, y el soleido carnívoro *Pegusa lascaris*. Es posible distinguir los ejemplares de cada especie a través del conjunto de ácidos grasos de su músculo, presentando las tres especies perfiles nutricionales muy diferentes de DHA, EPA y ARA.

Palabras claves: ácidos grasos, w3-HUFA, araquidónico, peces marinos.

ABSTRACT

Aquaculture provides world population with an important source of quality protein and the amount of highly unsaturated fatty acids of the n-3 series (n-3 HUFA, eicosapentaenoic or EPA; 20:5n-3 and docosahexaenoic or DHA, 22: 6n-3), essential for the correct human development and health. N-6 HUFA, arachidonic acid or ARA; 20: 4n-6, and its precursor linoleic acid; 18: 2n-6, is very abundant nowadays in terrestrial food, being very important for health that the dietary relationship n-3/n-6 is balanced, so that the body ratios of DHA/EPA/ARA are right. The large variability recently demonstrated by species of fish in terms of EPA and DHA biosynthesis indicates that the study of the profiles of these fatty acids and their biosynthesis in new species is essential for the future diversification of aquaculture. This would facilitate the selection of species whose food is more eco-sustainable, that is, to minimize the need for extractive fish in their diet. The main objective of the present study was to compare the muscle fatty acid profiles of three marine fish species; the *Chelon labrosus* an omnivorous mugilid, the *Sarpa salpa* an herbivorous sparid, and *Pegusa lascaris* a carnivorous sole. It is possible to distinguish the specimens of each species through their muscle fatty acid profiles, all three species having very different nutritional profiles of DHA, EPA and ARA

Key words: fatty acids, w3-HUFA, arachidonic, marine fish.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Situación actual de la acuicultura

La creciente explotación de la acuicultura surge del declive de la pesca extractiva y de la gran demanda a la que se enfrenta la humanidad para alimentar a los 9600 millones de personas que habitarán la tierra en el año 2050 (FAO 2014). La acuicultura es considerada una alternativa sostenible porque contribuye a la utilización eficaz de los recursos naturales, a la seguridad alimentaria y al desarrollo económico, con un limitado y controlable impacto sobre el medio ambiente, si bien, aspectos como la eficacia en la alimentación de especies carnívoras, requiere aún de una importante inversión en investigación.

El sector acuícola produce actualmente mayor cantidad de peces y crustáceos para el consumo humano que la pesca extractiva (FAO 2014). China es el líder en producción acuícola mundial y con gran diferencia sobre el segundo país en producción Indonesia. Esto es así debido a la enorme población del país, a la destacada cultura de consumo de productos acuáticos y a los miles de años de la práctica de una acuicultura de subsistencia (Apromar 2016). En España, existen establecimientos de acuicultura en ambientes dulceacuícolas y marinos. Es el miembro de la Unión Europea con un mayor volumen de producción en acuicultura, seguido del Reino Unido y Francia. El mejillón es el principal recurso acuático vivo, seguido de la lubina y de la trucha arcoíris. La comunidad valenciana es la región española con mayor producción (Apromar 2016).

En comparación con la pesca extractiva, la acuicultura es una alternativa, que ha ido en aumento exponencial durante los últimos años (FAO, 2016), con el objetivo de suplir las grandes demandas de pescado por parte de la población, ya que éste es fuente importante de proteína de origen animal, altamente digerible, proporcionando aproximadamente el 30% de la proteína dietaria, y constituyendo la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 de cadena larga o LC-PUFAs en la dieta humana (Hixson, 2014). Los LC-PUFAs, también llamados ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), como los omega 3 (n-3); ácido eicosapentenoico (20:5n-3, EPA), ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA), y el omega 6 (n-6); ácido araquidónico (20:4n-6, ARA), son nutrientes esenciales, fisiológicamente activos que desempeñan una amplia variedad de funciones estructurales, funcionales y de señalización. Son componentes fundamentales de las membranas biológicas, particularmente del tejido nervioso y células inmunes (Bell y Tocher, 1989; Gil et al., 2003; Koletzko et al., 2008), estando implicados en una amplia variedad de rutas metabólicas y procesos

inmunológicos, bien vía activación directa de la transcripción de múltiples genes, actuando como segundos mensajeros, o como potentes moléculas bioactivas y precursores de eicosanoides y docosanoides, con propiedades pro-o antiinflamatorias. Es por ello que los LC-PUFAs son tan importantes en el desarrollo y salud de los individuos. (Gil et al., 2003; Koletzko et al., 2008; Riediger et al., 2009).

Durante las cuatro últimas décadas la acuicultura se ha desarrollado, se ha diversificado y ha registrado notables adelantos tanto tecnológicos como científicos (FAO 2014). El éxito de la acuicultura moderna se basa en la adecuada gestión de la biología de las especies cultivadas, en la introducción de innovaciones tecnológicas, en el desarrollo de alimentos específicos y en la organización empresarial, siendo algunos de sus grandes retos la diversificación acuícola y la sostenibilidad ambiental. La diversificación acuícola trata de ampliar el número de especies cultivables, con dietas adecuadas y específicas para cada especie, además de hacerlo de manera sostenible económicamente. La sostenibilidad ambiental es crucial para el sector, ya que la demanda alimentaria estipulada para el año 2030 según la FAO será de más de 40 millones de toneladas para mantener los actuales niveles de consumo, por lo que es vital satisfacer las necesidades de las generaciones del presente sin comprometer las necesidades de generaciones futuras.

Los grandes problemas a los que se enfrenta la acuicultura están relacionados principalmente con la contaminación y el impacto ambiental (Tacón et al., 2009), siendo la alimentación de las especies carnívoras uno de los aspectos que requiere un mayor esfuerzo investigador, debido a que actualmente dependen del uso de harinas y aceites de pescados provenientes de las pesquerías de pequeños pelágicos, lo que implica un índice FIFO (del inglés, fish in fish out) demasiado elevado, contribuyendo a la pérdida de la diversidad de especies de peces, siendo necesario reducir este índice de cara a garantizar la sostenibilidad ambiental y económica de la alimentación de peces cultivados (Sargent y Tacón, 1999). Es evidente que el posible beneficio y aceptación social de la acuicultura, va a depender de la garantía de una práctica correcta y sostenible del medioambiente (Naylor et al., 2000).

Para resolver el mayor problema al que se enfrenta la acuicultura en cuanto a la alimentación de peces marinos con aceites y harinas de pescado de origen animal, se han estudiado algunas alternativas de mayor sostenibilidad tales como; alimentación con la utilización de materias primas de origen terrestre (Bell et al., 2001, 2002; Regost et al., 2003), o alimentación con la

utilización de materias primas procedentes de plantas transgénicas. La primera alternativa tiene consecuencias negativas con respecto a la composición de los órganos y tejidos de los peces, que se vuelven más grasos y presentan menor cantidad de los ácidos grasos n³-HUFA, altamente beneficiosos para la salud humana (Izquierdo et al., 2003; Torstensen et al., 2004; Bell y Waagbø, 2008). Además la relación omega-6/omega-3 es más elevada (Naylor et al., 2000), con mayor proporción de 18:2n-6 y otros omega-6, existiendo estudios científicos que confirman que esta descompensada relación, que favorece a los omega-6 frente a los omega-3, se relaciona con una mayor incidencia de enfermedades que afectan sobre todo al mundo occidental, incluyendo trastornos vasculares, neurodegenerativos, algunos tipos de cáncer y un sinnúmero de enfermedades relacionadas con la inflamación (Riediger et al., 2009; Rodríguez et al., 2012; Simopoulos, 2016). La segunda alternativa deja cabos sueltos en cuanto a la producción de HUFA, especialmente el DHA, por lo que necesita de más estudios y avances tecnológicos para poder considerarla una opción viable (Lee et al., 2016), además de la cuestionable aceptación social de pescado alimentado con productos de origen transgénico. Por todo ello, es esencial ampliar el análisis de los n-3 HUFA a nuevas especies de peces y entender y conocer en profundidad sus funciones, y las capacidades de síntesis de HUFA en los peces, así como su regulación a través de la dieta y factores ambientales como la salinidad o la temperatura, de cara a seleccionar especies de cultivo sostenibles y/o desarrollar sustituciones dietarias con aceites vegetales más adecuadas a cada especie, minimizando el impacto sobre la calidad nutricional del pescado (Zheng et al., 2004).

1.2.- Ácidos grasos poliinsaturados, importancia y funciones fisiológicas

El pescado además de ser fuente de proteínas digeribles, presenta un bajo contenido en grasas saturadas, es rico en ácidos grasos omega-3, EPA y DHA, y vitaminas A, D, E B6 y B12 (Tacon y Metian, 2013). Por lo que es un elemento dietario, de vital importancia en la dieta humana por sus grandes propiedades nutricionales.

Todos los vertebrados tienen la necesidad de incorporar en su dieta algunos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) necesarios para el correcto funcionamiento celular, que el organismo no puede sintetizar por sí solo. Éstos ácidos grasos son denominados como ácidos grasos esenciales (AGE), e incluyen miembros de la serie n-6 y n-3 como los precursores de los HUFA, el ácido linoleico (18:2n-6; LA) y el ácido linoléico (18:3n-3; LNA), a partir de los cuales mediante reacciones sucesivas de elongación y desaturación, por acción de enzimas elongasas y desaturasas darán lugar a ARA, EPA y DHA (Sargent et al., 1995), que como se

señaló anteriormente, son considerados los LC-PUFA o HUFA biológicamente más activos (Bell y Tocher, 2009).

Los medios marinos y dulceacuícolas son más ricos en omega-3 HUFA que el medio terrestre, siendo el pescado el principal aporte de estos ácidos grasos para el ser humano (Sargent y Tacon, 1999; Tocher, 2003, Bell y Tocher, 2009). Por ello es muy importante estudiar en profundidad su síntesis (Sargent et al., 2002; Monroig et al., 2011; Tocher, 2015), ya que su ingesta se ha relacionado con la prevención y modulación de enfermedades cada vez más comunes, en las civilizaciones occidentales (Riediger et al., 2009; Tocher, 2015). Se trata también de elementos esenciales para los organismos de cultivo, jugando papeles fundamentales a nivel metabólico, en el suministro de energía en forma de ATP por medio de su β -oxidación, y estructural, además de ser precursores de eicosanoides, jugando un papel relevante en el crecimiento, la reproducción y la natación de los peces (Tocher, 2003).

ARA, EPA y DHA son componentes estructurales básicos de las membranas biológicas de todos los vertebrados, al formar parte de los fosfolípidos que las componen. Sin embargo, en los peces esta función está cubierta principalmente por EPA y DHA, con lo que en general, los tejidos de los peces presentan mayores concentraciones de estos dos ácidos grasos que de ARA. EPA y el DHA son esenciales para mantener la integridad de la membrana celular en los peces (Sargent et al., 1999), jugando un papel muy importante ante los cambios de temperatura. La capacidad de modificación de las longitudes de cadena y del número de insaturaciones de los mismos les permite modificar la fluidez y otras propiedades fisiológicas de la membrana, hecho esencial para adaptarse a los cambios de salinidad, temperatura y presión en el ambiente en el que habitan (Rodríguez et al., 2012). Concretamente el DHA, cumple una función estructural esencial en el tejido cardíaco y en el sistema nervioso central, tanto en los fotorreceptores de la retina, como en los eventos de fusión de membranas que tienen lugar en las sinapsis neuronales o incluso en la fusión del óvulo y el espermatozoide. Su ingesta se ha relacionado favorablemente con un correcto desarrollo del cerebro y de la agudeza visual en los bebés, así como una buena salud cardiovascular (Ward y Singh, 2005). Su importancia en el cerebro es tal, que incluso se ha relacionado la expansión de la materia gris en la corteza cerebral y la aparición de la inteligencia en *Homo sapiens*, con el momento en que el hombre primitivo incorporó a la dieta productos de origen marino o dulceacuícola, y por tanto, con el consumo de DHA (Bradbury, 2011). El ARA es el principal ácido graso de la

serie n-6 presente en el cerebro, con lo que, junto con el DHA, es necesario para el correcto desarrollo del mismo (Ward y Singh, 2005).

También, los ácidos grasos poliinsaturados de 20 y 22 átomos de carbono, actúan como precursores de eicosanoides y docosanoides, siendo los más conocidos las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos y de más reciente descubrimiento, otros mediadores lipídicos resolvinas, protectinas y maresinas, generados, todos ellos, mediante las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas (Riediger et al., 2009). Tanto ARA como EPA son importantes precursores de estos compuestos, aunque los derivados del ARA son biológicamente más activos, produciendo principalmente compuestos proinflamatorios y proagregantes, mientras que los del EPA producen más compuestos antiinflamatorios (Sargent et al., 1999; Lee et al., 2016). Ambos ácidos grasos compiten por las mismas enzimas en la síntesis de eicosanoides (Riediger et al., 2009), por lo que el EPA va a ser un importante modulador en la formación de estos compuestos a partir del ARA (Sargent et al., 1999). La acción de los eicosanoides va a venir determinada por la relación ARA/EPA en las células, lo cual a su vez estará condicionado por la ingesta de n6 y n3 (Tocher, 2003). De hecho, se ha relacionado la aparición de condiciones patológicas con la ingesta excesiva de 18:2n-6, mientras que el alto contenido en ácidos grasos n3 HUFA en la dieta ha sido relacionado con una menor incidencia de determinados tipos de cáncer y otras enfermedades (Riediger et al., 2009; Rodríguez et al., 2012; Simopoulos, 2016; Zárate et al., 2017).

1.3.- Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados

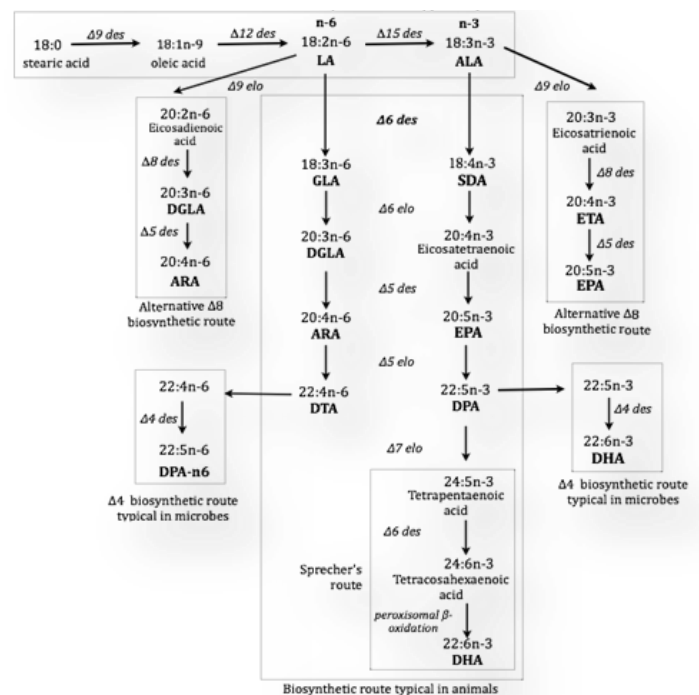
La capacidad de los vertebrados para producir LC-PUFA, a partir de sus precursores de 18C varía ampliamente entre las distintas especies, dependiendo de los genes que codifican para las desaturasas (*fads*) y elongasas (*elovl*), de su expresión génica y de la actividad enzimática, además del tipo de alimentación de la especie y del ambiente en el que habitan. Las desaturasas se encargan de añadir un doble enlace a un ácido graso preformado, mientras que las elongasas catalizan una reacción de condensación para ampliar en dos carbonos una cadena de un ácido graso (Ward y Singh, 2005).

Todos los organismos son capaces de generar el ácido esteárico (18:0), a partir del cual pueden producir un doble enlace con la desaturasa $\Delta 9$ y generar el ácido oleico (18:1n-9), base de todos los LC-PUFA (Tocher, 2015). Sin embargo, ningún vertebrado puede producir el ácido linoléico (18:2n-6; LA) ni linolénico (18:3n-3; LNA) debido a que tienen bloqueadas

las desaturasas $\Delta 12$ y $\Delta 15$, respectivamente (Bell y Tocher, 2009; Tocher, 2015). Estos dos ácidos grasos son, por lo tanto, esenciales (AGE) para todos los vertebrados, por lo que tienen que ser ingeridos mediante la dieta. Se convierten en LC-PUFAs debido a sucesivas desaturaciones y elongaciones que forman ARA, EPA y DHA, entre otros ácidos grasos (Tocher 2015). La síntesis de ARA se realiza por la $\Delta 6$ a partir del 18:2n-6 produciendo 18:3n-6, a partir del cual se forma el 20:3n-6 por una elongación y una desaturación por la acción de la $\Delta 5$ (Sprecher, 2000; Cook y McMaster, 2004). La síntesis de EPA se produce a partir del 18:3n-3 y requiere las mismas enzimas y vía de síntesis que para el ARA, lo que justifica la importancia del equilibrio dietario de los precursores, para asegurar el balance final de los n-3 y n-6 LC-PUFA. La síntesis de DHA requiere dos elongaciones más, una desaturación por la $\Delta 6$ y un acortamiento final de cadena vía β oxidación peroxisomal. Recientemente se ha encontrado una ruta alternativa para la síntesis de DHA mediante una $\Delta 4$ presente en primates, en algunos vertebrados marinos y eucariotas primitivos. Esta ruta sería una vía directa de desaturación a partir del 22:5n-3, formándose DHA (Lee et al., 2016) (Figura 1), y ha sido descrita recientemente en algunas especies de origen marino como el herbívoro *Siganus canaliculatus*, el lenguado carnívoro *Solea senegalensis* y el aterínido *Chirostoma estor* (Li et al., 2010; Morais et al., 2012; Fonseca-Madrigal et al., 2014).

En los últimos años se ha descubierto también una nueva ruta consistente en una elongación del 18:3n-3 y 18:2n-6 seguido de una desaturación llevada a cabo por la $\Delta 8$, formando 20:4n-3 y 20:3n-6, respectivamente. Esta ruta fue descrita por primera vez en mamíferos, al observar que la enzima $\Delta 6$ también presentaba actividad $\Delta 8$, y actuaría de forma alternativa a la descrita anteriormente de la $\Delta 6$ (Park et al., 2009) (Figura 1).

Figura 1. Vía de síntesis de PUFA desde 18:0 a compuestos de 22 átomos de carbono (Zárate et al., 2017)



Pudiéndose concluir en base a los estudios científicos realizados hasta el momento, que en general las especies dulceacuícolas estudiadas hasta el momento tienen capacidad para elongar y desaturar PUFA de 18C como el LA y LNA a LC-PUFA, considerando que salvo ciertas excepciones, estos dos ácidos grasos pueden satisfacer los requerimientos de AGE en éstas especies. Mientras que las especies marinas no son capaces de satisfacer estas necesidades y tienen como LC-PUFA esenciales a ARA, EPA y DHA (Sargent et al., 1995, 2002; Buzzi et al., 1996; Tocher, 2010), por su incapacidad de sintetizarlos a partir de sus homólogos de 18 átomos de carbono. Por otro lado cabe destacar que especies carnívoras, que se alimentan de pequeños pelágicos, obtienen directamente de su dieta los biológicamente activos LC-PUFA, por lo tanto tendrían una menor capacidad para desaturar y elongar los ácidos grasos precursores de 18C, mientras que los herbívoros poseen niveles comparativamente mayores de 18C y más bajos de LC-PUFA, debido a que su alimentación basada en algas y plantas, es más rica en los primeros, convirtiendo, no obstante, los 18C PUFA a LC-PUFA con más facilidad que los carnívoros marinos (Sargent et al., 1999).

Por todo ello, salvo excepciones encontradas recientemente (Li et al., 2010; Morais et al., 2012; Fonseca-Madrugal et al., 2014), en la mayoría de los estudios realizados hasta el momento, parece ser que el ambiente es también un factor determinante en la capacidad de elongación y desaturación de los ácidos grasos, probablemente debido a una adaptación a la disponibilidad de los mismos en los distintos ambientes. El fitoplancton y las plantas de agua dulce se caracteriza por presentar mayor cantidad de 18:2n-6 y 18:3n-3, y es bastante pobre en EPA y DHA, suponiendo una presión evolutiva que favorece que los peces de este medio mantengan cierta capacidad de producirlos, al contrario que en el medio marino donde esta presión evolutiva no tiene lugar y por tanto no existe esa mayor capacidad de síntesis (Sargent et al., 1995; Tocher, 2010).

1.4.- La dieta como herramienta para adquirir lípidos funcionales y mantener la salud

La alimentación es parte de nuestra actividad y de vital importancia para el mantenimiento de la vida. Como se ha mencionado anteriormente necesitamos incorporar ácidos grasos esenciales en nuestra dieta, en particular los omega-3 (EPA y DHA) y también un aporte de omega-6 (ARA), y un balance correcto entre éstos. Hoy se sabe que en la dieta de los primeros seres humanos, la proporción entre ambos grupos de ácidos grasos se mantuvo cerca de 1:1. Sin embargo, en las dietas occidentales actuales, que se caracterizan por un alto consumo de cereales y de carne de herbívoros ricos en omega 6, esta proporción ha

aumentado a 20:1 aproximadamente, muy lejos del balance recomendado, asociándose este desequilibrio a procesos proinflamatorios y protromboticos, favoreciendo la obesidad y multitud de enfermedades que cursan con inflamación. Las recomendaciones de consumo y/o suplementación de estos ácidos grasos omega 3 son específicos para determinados grupos de edad y estado fisiológico (Zárate et al., 2017). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) conjuntamente con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomiendan consumir al menos 450mg de EPA+DHA, mientras que la mayoría de los organismos y agencias gubernamentales que velan por la salud, recomiendan consumir entre 250 y 1000 miligramos de EPA+DHA por día, en un individuo adulto (Intake 2015).

La finalidad principal del presente trabajo es analizar el perfil y el balance de ácidos grasos que existe en el músculo de tres especies marinas estrictas diferentes, cuya alimentación y biología general difiere sustancialmente, haciendo mayor hincapié en los ácidos grasos omega 3 y omega-6 HUFA, y sus precursores, por su gran importancia tanto en la dieta humana como en el desarrollo y bienestar y salud de los peces. Las especies a estudiar son el omnívoro *Chelon labrosus*, el herbívoro *Sarpa salpa* y el carnívoro *Pegusa lascaris*.

1.5.- Especies objeto de estudio

***Chelon labrasus* (lisa barbuda):** omnívoro de la familia Mugilidae, de cuerpo alargado y fusiforme de hasta 60 cm de longitud. Desde pelágico a epibentónico, vive en aguas costeras y estuarias del atlántico oriental, generalmente a menos de 20 metros de profundidad (Pajuelo y Lorenzo, 2008). Al igual que muchas especies que pertenecen a la familia Mugilidae, es objetivo para la acuicultura no sólo debido a su carne, sino también a sus gónadas nutritivas y valiosas. Los adultos se alimentan principalmente de diatomeas bentónicas, algas epífitas, pequeños invertebrados y detritus, los juveniles sólo se alimentan naturalmente del zooplancton (Brito et al., 2002).



***Sarpa salpa* (salema):** herbívoro de la familia Sparidae, habita en fondos rocosos, con densa vegetación (0-70 m) o en praderas de *Cymodocea nodosa* (Brito et al., 2002) y se distribuye por el Mediterráneo y Atlántico oriental, incluyendo las Islas Canarias (Jadot et al., 2006). De cuerpo ovalado y alargado, es epibentónico, de unos 45 cm de longitud aproximadamente y hermafroditas. Los individuos jóvenes son carnívoros y se alimentan de pequeños crustáceos, en cambio los adultos son herbívoros. Los alevines crecen extremadamente rápido debido a la diversidad de alimentos que existe en playas rocosas, a finales de verano emprenden un viaje hacia aguas más profundas para escapar de las bajas temperaturas en invierno. Su similitud biológica con otras especies de espáridos de interés acuícola como la dorada, el besugo o el pargo y su condición herbívora le catalogan como una especie de interés para una práctica acuícola más sostenible.



***Pegusa lascaris* (lenguado de arena):** especie carnívora bentónica, perteneciente a la familia Soleidae, que habita entre 5-90 metros de profundidad en fondos arenosos, fangosos y de conchuela, alimentándose de poliquetos, crustáceos y bivalvos (Brito et al., 2002). Se distribuye por el Atlántico oriental, incluyendo las Islas Canarias. Presenta una carne de calidad, lo que hace que tenga un elevado valor comercial (Pajuelo y Lorenzo, 2008). Tiene gran similitud biológica con el *Solea senegalensis*, que ha adquirido en las últimas décadas una gran importancia en la acuicultura, ya que además de comercializarse en cantidades significativas para su consumo, se sabe que tiene activa la enzima $\Delta 4$, con actividad desaturasa, para dar lugar a LC-PUFAs como el DHA.



2.- OBJETIVOS

2.1- Objetivo general:

Analizar el valor nutricional, incluyendo el perfil de ácidos grasos, de tres especies de peces marinas seleccionadas por sus diferentes hábitos alimenticios y su potencial para la acuicultura: *Chelon labrosus*, *Sarpa salpa* y *Pegusa lascaris*. Para ello, se llevó a cabo la comparación de la composición proximal y el perfil de ácidos grasos del músculo de las tres especies, deduciendo hasta qué punto el tipo de alimentación (omnívora, herbívora y carnívora, respectivamente) influye en sus perfiles de ácidos grasos y posible capacidad de síntesis de LC-PUFA a partir de sus precursores. Finalmente, teniendo en cuenta que los LC-PUFAs, cumplen numerosas funciones esenciales en el desarrollo y prevención de ciertas enfermedades, se analiza la relación existente entre los omega 3 y omega 6, y otros índices indicadores de su valor nutricional, pudiendo extraer datos interesantes en relación a las recomendaciones de ingesta de EPA+DHA que establece la OMS.

2.2- Objetivos específicos:

- Acercamiento a un trabajo de investigación en equipo, con el fin de comparar, en el músculo de las 3 especies objeto de estudio, los resultados de los contenidos de humedad, proteínas y lípidos totales, y los contenidos y relaciones entre ácidos grasos fisiológicamente importantes, para posteriormente extraer conclusiones sobre su valor nutricional, y su metabolismo lipídico en relación a sus hábitos alimenticios.
- Aprendizaje de las técnicas de laboratorio necesarias para este tipo de estudio; extracción lipídica, obtención y aislamiento de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) mediante transmetilación y cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography), y determinación y cuantificación de FAME por medio de cromatografía de gases.
- Elaboración de complejas matrices de datos en Microsoft Excel, en las que se introducen y analizan los resultados de la cromatografía de gases en porcentaje de área, para posteriormente calcular medias y desviaciones tanto en área como en valor absoluto, aplicando fórmulas para la transformación de los datos relativos en valores absolutos.
- Manejo de datos e interpretación de análisis estadísticos, mediante el uso del IBM SPSS Statistics 21.0, elaborando diversos test y manejando distintas técnicas tales

como; test de normalidad, test de homocedasticidad, Anovas, test comparaciones múltiples y componentes principales.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Obtención de los ejemplares:

Para este estudio se analizaron 5 ejemplares de *Chelon labrosus* (lisa barbuda), que fueron pescados mediante pandorga artesanal en la playa las Teresitas (Tenerife); 5 ejemplares de *Sarpa salpa* (salema), que fueron recogidos de noche, mediante el uso de una linterna y de una pandorga artesanal, en la costa de Radazul (Tenerife); y 7 ejemplares de *Pegusa lascaris* (lenguado de arena); que fueron pescados con trasmallo en Isla Cristina (Huelva). Los ejemplares de lisa y salema, fueron trasladados en tanques provistos de aireadores al laboratorio del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de la Laguna. De forma similar, los ejemplares de *Pegusa lascaris* se trasladaron vivos a las dependencias del Departamento de Química de la Universidad de Huelva. Todos ellos fueron sacrificados siguiendo protocolos humanitarios aprobados por el Comité de Ética de ambas universidades, mediante la técnica del “shock térmico”, introduciendo los ejemplares en un recipiente con agua y hielo, a muy baja temperatura que produce en cuestión de segundos su muerte. Posteriormente, tras la sección de la médula a nivel de la cabeza con la ayuda de un bisturí, se fue seccionando una porción del músculo de cada uno de los ejemplares objeto de estudio, guardando las muestras en viales plásticos debidamente marcados, que iban directamente al ultracongelador (-80°C) para conservar las muestras y minimizar así el riesgo de degradación proteica y oxidación de los ácidos grasos insaturados. Todos los análisis se desarrollaron en el laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología (U.D Fisiología Animal) de la Universidad de La Laguna.

3.2.- Extracción de lípidos y humedad:

La extracción de lípidos se realizó siguiendo el método descrito por Folch *et al.* (1957). Las muestras de músculo ya pesadas, fueron homogenizadas sobre hielo con cloroformo/metanol (2:1, v/v) para evitar la actividad de las lipasas. Después de varios lavados y filtrados se pasan a otro tubo de ensayo, quedándonos con una disolución que contiene los lípidos y demás compuestos liposolubles procedentes de la homogenización. Se añadió KCL (0,88 % w/v) a esta fracción, se agitó enérgicamente en el vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 r.p.m. A continuación se extrajo la fase orgánica (fase inferior) en la que se encuentran los

lípidos disueltos, de manera que el solvente es evaporado bajo un flujo de nitrógeno, trasvasando los lípidos una vez disueltos de nuevo en una pequeña cantidad de cloroformo/metanol 2:1, a un bote pequeño previamente pesado, asegurándonos de no dejar lípido detrás. Se evapora el solvente de nuevo, quedando únicamente los lípidos que son desecados bajo vacío, obteniendo el contenido de lípido total por gravimetría. Los lípidos se redisuelven finalmente a una concentración de 10 mg/ml, con cloroformo/metanol con BHT (butilhidroxitolueno), como antioxidante, y bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los ácidos grasos y se guardan en congelador a -20°C, en viales cerrados hasta que se realiza el siguiente procedimiento, que es la transmetilación y obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés, FAME). Para el cálculo del contenido en lípido total de las muestras se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Lípido peso seco} = (\% \text{ lípido en peso fresco} \times 100 / 100 - \% \text{ Humedad}) \times 100$$

$$\% \text{ Lípido peso fresco} = (\text{masa lípido (mg)} / \text{masa peso fresco muestra}) \times 100$$

A la vez que se selecciona y se pesa la cantidad de músculo para realizar la extracción de lípidos, también se selecciona una cantidad conocida de tejido de cada uno de los ejemplares para calcular el porcentaje de humedad. Esta técnica consiste en introducir la porción del tejido (Pf) en una estufa cuya temperatura oscila en torno a los 110°C, durante 16 horas aproximadamente, que se deseca por el calor, perdiendo el agua y quedando como resultado la cantidad de peso en seco (Ps) de la muestra, lo que nos permite luego calcular la humedad mediante la fórmula: $\% \text{ H} = (Pf - Ps) / Pf \times 100$.

3.3.- Transmetilación y purificación de ácidos grasos:

La transmetilación es el procedimiento que se utiliza tanto para romper el enlace éster que une los ácidos grasos a los esqueletos hidrocarbonados de las moléculas que los contienen, como para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos o FAMEs (del inglés *fatty acid methyl esters*). Para ello se tomó una cantidad conocida del extracto de lípidos (1mg) y se le añadió el 5% del ácido graso 19:0, utilizado como estándar interno, además de tolueno y sulfúrico en metanol. La reacción se llevó a cabo a 50°C en un bloque calefactor durante 16 horas, en atmósfera de nitrógeno y oscuridad. Trascorrido este tiempo, cuando se enfrían los tubos de ensayo, se le añade bicarbonato potásico y hexano éter (1:1) con BHT, se colocan en la centrífuga a 1500 rpm durante 5 minutos, en donde se forman dos fases diferenciadas, debido a la distinta densidad de los solventes. Se extrae la fase superior en la que tendremos el

hexano éter con los ácidos grasos metilados (FAMEs) y resto de esqueletos hidrocarbonados, además del colesterol, y se pone a evaporar con nitrógeno. El aislamiento y purificación de los FAMEs se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography). Para ello se emplearon placas de TLC de gel de sílice, de 20x20cmx25mm (Merck, Darmstadt, Alemania), que se marcaron debidamente y se cargaron en su base, con cada una de las muestras aisladas de las tres especies, para luego introducir las en una cubeta de cristal con una mezcla de hexano/dietil-éter/ácido acético (90:10:1, v/v). Los FAME ya purificados, fueron extraídos de la sílice con una mezcla de hexano/ dietil-éter (1:1, v/v). Por último, se evaporaron en un flujo de nitrógeno y se volvieron a resuspender en hexano con BHT, dejándolos preparados para ser inyectados en el cromatógrafo de gases.

3.4.- Cromatografía de gases:

Los FAMEs se analizaron cualitativa y cuantitativamente por cromatografía de gases, utilizando un TRACE GC Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), equipado con un inyector *on column*, un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de sílice fundida (fase estacionaria), SupelcowaxTM 10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA). El cromatógrafo utiliza el helio como gas portador (fase móvil). Éste no interacciona con las moléculas sino que las transporta a través de la columna. Para identificar los ácidos grasos se usó un multiestándar externo de tipo marino, de composición conocida, consistente en lípido extraído y metilado de huevo de bacalao mezclado a partes iguales con otros dos multiestándares de la casa comercial Biosigma (PUFA-3 y C4-C24).

Los picos de los cromatogramas resultantes de cada una de las muestras fueron integrados y analizados por comparación con los tiempos de retención de este multiestándar conocido, para determinar la cantidad y los tipos de ácido grasos que existían en cada una de las muestras. Algunos picos confusos se identificaron en un espectrómetro de masas conectado a un cromatógrafo de las mismas características descritas (GC-MS chromatography; DSQ II, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA).



3.5.- Determinación de proteína por el método Kjeldahl:

El método o digestión de Kjeldahl, es un proceso de análisis químico que nos permite determinar el contenido de proteínas de una sustancia a partir del contenido de nitrógeno orgánico. Se divide en 3 etapas; digestión, destilación y valoración.

En la *digestión* se produce la descomposición del nitrógeno proveniente de las proteínas de las muestras orgánicas, en ion amonio. Esto se obtiene haciendo hervir la muestra a una temperatura de 400°C aproximadamente, en una solución de ácido sulfúrico concentrado, dando como resultado una solución de sulfato de amonio.

En la *destilación* se adiciona hidróxido de sodio a la solución de amonio obtenida previamente, generándose NH₃ y vapor de agua, que es retenido en una solución de ácido bórico conocida.

En la *valoración* se mide la cantidad de ácido neutralizado por el amoniaco disuelto, lo que indica la cantidad de nitrógeno presente en la muestra inicial, usando un indicador de pH como puede ser el rojo metilo, y midiendo con un pHtrimerio.



3.6.- Índices de calidad lipídica:

A partir del perfil de ácidos grasos se calcularon los siguientes índices:

(i) Índice aterogénico del alimento (IA): capacidad que tienen las grasas para producir obstrucción y lesiones en los vasos sanguíneos, ya que relaciona los ácidos grasos saturados (C:12, C14:0 y C16:0) con respecto a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y PUFA de la serie n-3 (incluyendo EPA y DHA) y n-6 (Abrami *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 2014). Mientras más bajo sea el IA, menor es el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. El IA se determinó con la siguiente fórmula.

$$IA = (12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0) / (\sum MUFA + n-6 PUFA + n-3 PUFA)$$

(ii) Índice de trombogenicidad (IT): La capacidad que puede tener un alimento para inducir trombosis o embolia. Dependerá fundamentalmente del contenido en ácidos grasos

monoinsaturados y poliinsaturados de la serie ω -3 y ω -6 (Ulbrich y Southgate, 1991; Pérez *et al.*, 2014). El IT se determinó con la siguiente fórmula:

$$IT = \frac{(14:0 + 16:0 + 18:0)}{(0.5 \times \sum MUFA) + (3 \times n-3PUFA) + (0.5 \times n-6PUFA) + (n-3/n-6 PUFA/n-6PUFA)}$$

(iii) Calidad de los lípidos del pescado (CLP): es la relación porcentual en la que los principales PUFA n-3 (EPA y DHA) aparecen en el músculo respecto a la totalidad de los lípidos; los alimentos de origen marino, presentan una clara ventaja frente a los de origen terrestre (Abrami *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 2014). La CLP se determinó con la siguiente fórmula.

$$CLP = (EPA + DHA) \times 100 / \text{total de lípidos}$$

3.7.- Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos han sido procesados mediante el programa IBM© SPSS statistics 21.0 (IBM Co., USA). Se ha estudiado la *normalidad* de los datos, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la *homocedasticidad*, mediante el test de Levene (Zar, 1984). Se ha llevado a cabo un análisis de la varianza de un factor (ANOVA de una vía) para determinar si hay efecto del tipo de especie sobre las distintas variables de interés. En el caso de no verificarse la homocedasticidad se utilizaron los test no paramétricos de Welch y de Brown y Forsythe en sustitución del ANOVA. Por otro lado, en el supuesto de violación de la normalidad se llevaron a cabo transformaciones de los datos del tipo raíz cuadrada del arcoseno o logaritmo neperiano. Para las comparaciones a posteriori de las medias de interés, se aplicó el test de Tukey en el caso de que se verificaran las hipótesis sobre el modelo, y el Test de Games-Howell en el caso de incumplimiento del supuesto de homocedasticidad. En general, los resultados se presentan en el formato media \pm desviación estándar. En todos los test el nivel de significación se fijó al 0,05 ($p < 0,05$). Finalmente, se ha realizado un análisis factorial, concretamente un *análisis de componentes principales* (ACP), con la finalidad de saber si era posible distinguir las poblaciones de las tres especies, en base al conjunto de sus ácidos grasos. Es un método de simplificación o reducción de las variables iniciales, que se encuentran correlacionadas entre sí, a dos o tres componentes principales, que expliquen la mayor parte de la información del conjunto original.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1 Perfil de ácidos grasos

Como se puede observar en la tabla 1, en la que se muestra el contenido de los ácidos grasos del músculo de las 3 especies estudiadas, los saturados (SFAs) son más abundantes y significativamente diferentes en *C. labrosus* que en las demás especies. Entre éstos, el ácido graso 16:0, presenta mayores cantidades en las tres especies que el 18:0, siendo significativamente mayor en *C. labrosus* que en *S. salpa* y *P. lascaris*. Sin embargo, las cantidades de 18:0 son más pequeñas siendo significativamente mayores en *P. lascaris*, que en las demás especies.

Entre los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), cabe destacar que la especie que mayor contenido posee es *C. labrosus* con diferencias significativas con respecto a *P. lascaris*. El ácido graso más abundante en las especies es el 18:1n-9, seguido del 16:1n-7 y del 18:1n-7. En cuanto al ácido graso 18:1n-9 las diferencias son significativamente mayores para *S. salpa*, siendo menores en *P. lascaris* e intermedias para *C. labrosus*.

A pesar de que el perfil dietético de los ácidos grasos difiere por el tipo de alimentación del pez, los resultados obtenidos en cuanto a la composición de SFAs y MUFAs concuerdan con los estudios realizados por otros autores, donde los ácidos grasos saturados quedarían representados mayoritariamente por el 16:0 y el 18:0, y los monoinsaturados por el 18:1n-9 (Rodríguez et al., 2004). Siendo ambos grupos de ácidos grasos particularmente abundantes en sus dietas por ser altamente energéticos a través de la beta oxidación (Rodríguez et al., 1997; Cejas et al., 2003), e importantes a nivel estructural ya que permiten regular el grado de fluidez en la membrana en ambientes cambiantes de temperatura (Sargent et al., 1999; Pérez et al., 2014).

Entre los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 (n-6 PUFAs), la especie que tiene mayor contenido es *S. salpa*, seguida de *C. labrosus* y por último *P. lascaris* cuya cantidad es la mitad con respecto a la segunda especie. El ácido graso más abundante es el 18:2n-6 (LA), destacado por su elevado contenido en la especie omnívora, siendo la mitad en la herbívora y aproximadamente la sexta parte en la carnívora, con claras diferencias significativas para las tres especies. El siguiente ácido graso más abundante es el 20:4n-6 (ARA), destacando sus diferencias significativas en la especie herbívora por su mayor contenido frente a las especies omnívora y carnívora. Cabe destacar la cantidad de dos ácidos grasos poliinsaturados que

actúan como intermediarios metabólicos en la producción de ARA a partir del LA; el 20:3n-6, y el 18:3n-6. El primero es mayor en la especie herbívora, con diferencias significativas respecto a las otras dos especies, que presentan contenidos bajos en el caso de la omnívora y no detectados en el caso de la carnívora. El segundo tiene contenidos bajos, pero similares en las especies omnívora y herbívora, en cambio en la carnívora son prácticamente inexistentes. Sin embargo el 22:5n-6, producto terminal del metabolismo de los n-6, se presenta en contenidos similares para las especies *C. labrosus* y *P. lascaris*, siendo aproximadamente la mitad en *S. salpa*.

Resulta interesante destacar, en cuanto a los resultados obtenidos de la familia de ácidos grasos n-6, que es la especie herbívora la que presenta mayor contenido de los mismos, debido a la presencia del 18:2n-6 (LA) y del 20:4n-6 (ARA) en la ingesta de una dieta rica en algas (Rodríguez et al., 1997; Cejas et al., 2003), como se explica con más detalle posteriormente en la tabla 2, no descartándose cierta conversión del primero en el segundo, como indicaría la presencia de los intermediarios metabólicos ya señalados.

Estudios muy recientes confirman las capacidades de elongación y desaturación que presentan *S. salpa* y *P. lascaris*, y han sido objeto de un Trabajo Fin de Máster (TFM) defendido en junio de 2017, como parte de los resultados obtenidos en el proyecto AGL2015-70994-R, en el que se integra también el presente estudio. Aunque son datos sin publicar, los resultados comentados en cuanto a los posibles productos metabólicos concuerdan con las actividades elongasas y desaturasas descritas en este estudio, si bien no podemos descartar a través del análisis de la composición del músculo que su contenido en ácidos grasos no sea de origen exclusivamente alimentario (Galindo, 2017).

Entre los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (n-3 PUFAs), la especie con mayor contenido es *P. lascaris*, seguida de *S. salpa*, y *C. labrosus* que contiene aproximadamente el cincuenta por ciento menos de cantidad que la primera. El ácido graso más abundante de este grupo es el 22:6n-3 (DHA), particularmente en *P. lascaris*, con diferencias significativas con respecto a *C. labrosus* cuyo contenido es casi tres veces menor, y *S. salpa* cuyo contenido se corresponde con la octava parte. El segundo ácido graso más abundante es el 20:5 n-3 (EPA). En éste, las diferencias son significativamente superiores para la especie herbívora, con respecto a la omnívora y la carnívora. El tercer ácido graso más abundante es el 22:5n-3, con diferencias significativas para la especie omnívora, que tiene menos de la mitad de cantidad

que las otras dos especies. El ácido graso 18:3n-3, es casi el doble en la especie omnívora, con respecto a la herbívora, y la carnívora contiene una novena parte de la primera.

Una vez más los resultados concuerdan en gran medida con la bibliografía, en el sentido de que los niveles de DHA más elevados suelen estar ligados con la condición de carnivoría, que es el caso de *P. lascaris*, ya que ésta se alimenta de crustáceos moluscos e invertebrados bentónicos ricos en omega 3 particularmente en DHA (Rodríguez et al., 2004). El alto contenido de EPA en la salema se puede justificar como se verá posteriormente por la ingesta de algas ricas en este ácido graso, mientras que se evidencia la pobreza de DHA en las algas que ingiere esta especie. *C. labrosus* está a caballo entre las otras dos especies, ya que su alimentación es más variada debido a su omnivoría (M. J. Pérez et al., 2007). En cuanto a los precursores 18:3n-3 y 18:2n-6 son ácidos grasos abundantes en las plantas dulceacuícolas y terrestres, siendo ambos menos habituales en el medio marino (Sargent et al., 1995), por lo que se llega a pensar que existe algún tipo de variación en la alimentación de la lisa, más ligada a ambientes costeros con influencia antropogénica, y que posiblemente incluye la ingesta de algas verdes del tipo *Ulva rígida*, cuya composición lipídica contiene altas cantidades de éstos ácidos grasos (Banaimoon 1992), o debido a la ingesta de fangos o algún componente de desecho que contenga papel u otros elementos con componentes vegetales de origen terrestre que puedan aportar cierta cantidad de estos ácidos grasos.

Cabe destacar el contenido significativo de intermediarios metabólicos en la formación del EPA y DHA, como el 18:4n-3, 20:4n-3 y 22:5n-3. Del primero, la especie que presenta mayor contenido es *C. labrosus* con diferencias significativas con respecto a *P. lascaris* y *S. salpa*. El segundo tiene mayor presencia en *S. salpa*, con diferencias significativas con respecto a las otras dos especies, y el tercero presenta contenidos muy similares para las especies herbívora y carnívora en comparación con la omnívora, que tiene aproximadamente la mitad. De manera similar a lo descrito para los metabolitos intermediarios de la serie n-6, los ácidos grasos encontrados concuerdan con las actividades de elongación y desaturación descritas recientemente para *S. salpa* y *P. lascaris*.

En cuanto a las relaciones de DHA/EPA, la especie carnívora destacaría por su elevado valor ($4,79 \pm 0,68$) en el músculo, respecto a la omnívora ($1,50 \pm 0,59$), cuyo valor es tres veces más pequeño y la herbívora ($0,22 \pm 0,03$) con valores aún más bajos. La relación entre estos dos ácidos grasos es importante, debido a que van a competir por las mismas enzimas

responsables de la esterificación de los ácidos grasos en los fosfolípidos de las membranas, lo que tiene implicaciones importantes desde el punto de vista de la alimentación humana (Sargent et al., 1999). Sin embargo, si observamos las relaciones de ARA/EPA no existen diferencias significativas, es decir, las tres especies presentan valores muy similares entre ellas, lo que indica el equilibrio existente entre ambos ácidos grasos de 20 átomos de carbono y por lo tanto, una tendencia a presentar una relación que podría favorecer el equilibrio en la síntesis de eicosanoides, incluyendo prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, entre otros (Sargent et al., 2002), derivados de estos ácidos grasos tanto en las células de los peces, como consecuencia de su ingesta, en el ser humano.

En cuanto a las relaciones de los ácidos grasos de la familia omega 3 y los ácidos grasos de la familia omega 6, hay que destacar que existen diferencias significativas para *P. lascaris* con un contenido tres veces y media superior en comparación con *S. salpa* y *C. labrosus*. Por todo ello, el contenido total de ácidos grasos de la familia omega 3 es significativamente distinto en las 3 especies, siendo mayor en la especie carnívora y la mitad en la especie omnívora.

En términos generales, se puede concluir que el ejemplar omnívoro es más rico en ácidos grasos saturados y monoinsaturados, mientras que la especie herbívora es más rica en ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-6, y la carnívora es más rica en ácidos grasos poliinsaturados y altamente insaturados pertenecientes a la familia n-3. Éstos resultados concuerdan con lo descrito para el musculo de especies salvajes en función del tipo de alimentación propia de las especies descritas (Pérez *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2004).



Tabla 1. Principales ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del músculo de *Chelon labrosus*, *Sarpa salpa* y *Pegusa lascaris*.

	<i>Chelon labrosus</i>	<i>Sarpa salpa</i>	<i>Pegusa lascaris</i>
<i>Total SFA</i> ¹	32,77±2,24 ^a	27,07±0,69 ^b	28,84±1,01 ^b
16:0	23,14±1,75 ^a	18,64±0,53 ^b	18,23±1,02 ^b
18:0	5,76±1,02 ^b	6,36±0,30 ^b	7,42±0,38 ^a
<i>Total MUFA</i> ¹	24,00±3,19 ^a	20,88±2,42 ^{ab}	17,93±1,91 ^b
16:1n-7	5,57±1,14 ^a	1,94±0,26 ^b	1,99±0,94 ^b
18:1n-9	13,17±2,99 ^{ab}	13,59±2,00 ^a	10,60±0,41 ^b
18:1n-7	3,38±0,37 ^a	3,44±0,29 ^a	2,97±0,40 ^a
<i>Total n-6 PUFA</i> ¹	16,84±1,06 ^b	19,11±0,56 ^a	8,20±1,04 ^c
18:2n-6	10,48±1,87 ^a	5,44±1,69 ^b	1,44±0,26 ^c
18:3n-6	0,42±0,12 ^a	0,38±0,05 ^a	0,08±0,19 ^b
20:2n-6	0,44±0,05 ^a	0,35±0,10 ^a	0,40±0,08 ^a
20:3n-6	0,17±0,16 ^b	0,84±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b
20:4n-6	3,92±0,69 ^b	10,70±1,01 ^a	4,29±0,72 ^b
22:5n-6	1,03±0,26 ^a	0,50±0,22 ^b	1,31±0,18 ^a
<i>Total n-3 PUFA</i> ¹	22,99±3,26 ^c	28,44±2,34 ^b	41,20±2,27 ^a
18:3n-3	1,85±0,50 ^a	1,09±0,17 ^b	0,16±0,18 ^c
18:4n-3	1,11±0,12 ^a	0,49±0,05 ^c	0,64±0,84 ^b
20:4n-3	0,36±0,06 ^b	0,58±0,06 ^a	0,05±0,12 ^c
20:5n-3	7,05±1,25 ^b	16,91±1,66 ^a	5,97±0,37 ^b
22:5n-3	2,12±0,38 ^b	5,51±0,61 ^a	5,88±0,58 ^a
22:6n-3	10,44±3,13 ^b	3,65±0,37 ^c	28,71±2,86 ^a
DHA/EPA	1,50±0,59 ^b	0,22±0,03 ^c	4,79±0,68 ^a
ARA/EPA	0,55±0,09 ^a	0,63±0,04 ^a	0,69±0,16 ^a
<i>n-3/n-6</i> ¹	1,37±1,74 ^b	1,49±0,93 ^b	5,03±2,36 ^a
<i>Total n-3 HUFA</i> ¹	20,04±2,96 ^c	26,85±2,27 ^b	40,60±2,43 ^a
<i>Total Ac.grasos (mg/100 g)</i>	557,39±103,08 ^a	348,30±85,66 ^b	356,88±121,40 ^b

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (*C.labrosus* n=5; *S. salpa*: n=5; *P. lascaris*: n=7). Diferentes letras en superíndice dentro de la misma fila representan diferencias significativas entre todos los ácidos grasos (p < 0,05). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados (≥C20 y ≥3 dobles enlaces).¹ Pueden contener componentes minoritarios no mostrados en la tabla.

Para corroborar los resultados anteriormente descritos en el presente trabajo y extraer conclusiones más certeras para la especie herbívora *S. salpa*, nos apoyamos en los recientes estudios realizados por Ana Galindo Giménez en su TFM, donde se estudia el perfil de ácidos grasos del contenido intestinal de esta especie, que reveló estar compuesto por la mezcla de

algas que se relacionan en la tabla 2 (supervisado por la doctora Marta Sansón; Universidad de la Laguna), y que indica la presencia de macroalgas pertenecientes a todos los grandes grupos taxonómicos (Clorophyta, Rhodophyta y Phaeophyceae), en estado de semidigestión.

Tabla 2. Composición algal en el contenido intestinal de *Sarpa salpa* determinada mediante observación a través de lupa.

Composición algal	Clasificación
<i>Ulva clathrata</i> (Agardh, 1811)	Clorophyta
<i>Ulva rigida</i> (Agardh, 1823)	Clorophyta
<i>Cladophora</i> sp.	Clorophyta
<i>Centroceras clavulatum</i> (Montagne 1846)	Rhodophyta
<i>Gelidium pusillum</i> (Le Jolis, 1963)	Rhodophyta
<i>Jania adhaerens</i> (Lamouroux, 1816)	Rhodophyta
<i>Hypnea</i> sp.	Rhodophyta
<i>Sphacelaria</i> sp.	Phaeophyceae

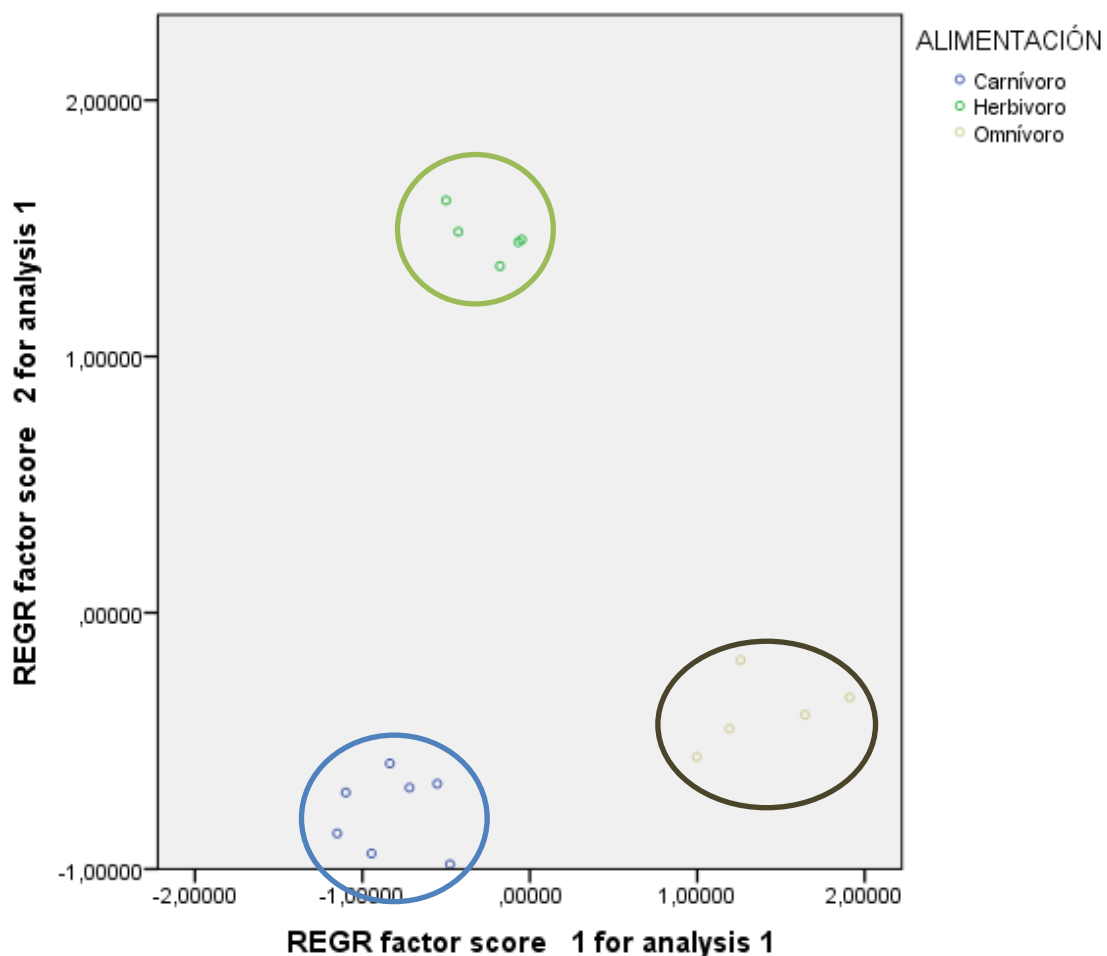
El perfil de ácidos grasos de esta más intestinal, mostró un alto porcentaje de ácidos grasos saturados (56,5%), principalmente 16:0 (41,3 %), y de MUFAs (21,6%), representados eminentemente por 16:1 y 18:1 (11,2 y 10,1%, respectivamente), destacando dentro de los PUFAs de la serie n-6 y n-3 el alto porcentaje de 20:4n-6 y 20:5n-3 (3,4 y 7,1%, respectivamente). Aunque no se puede saber con exactitud qué contribución tiene cada una de estas algas a estos ácidos grasos, los altos contenidos obtenidos de ARA $10,70 \pm 1,01$ y EPA $16,91 \pm 1,66$, mostrados en la tabla 1 para *S. salpa*, se correlacionan con esta dieta basada en éstas algas marinas ricas en estos dos ácidos grasos (Gerking, 1984), mientras que el menor contenido de DHA $3,65 \pm 0,37$ de la salema, respecto a las otras especies, se justifica también por el bajo contenido de DHA que presentan estas algas que consumen (Sargent, 1995; Sargent *et al.*, 1995, 2002; Ruiz *et al.*, 2008).

4.2.- Análisis de Componentes principales

El análisis de componentes principales (APC) se realizó a partir de la composición de ácidos grasos en el lípido total (LT), existente en cada uno de los ejemplares objeto de estudio. Se seleccionaron dos componentes que explican el 79,00 % de la varianza de los datos. Así la componente 1 (CP1) recoge el 49,17% de la varianza explicada, y se encuentra relacionada positivamente con los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6 (LA), 18:3n-6, 18:3n-3 (LNA), 18:4n-3 y 20:2n-6 y negativamente con el ácido graso 18:0 ; mientras que la

componente 2 (CP2) recoge el 28,826% de la varianza, y se encuentra relacionada positivamente con los ácidos grasos 20:3 n-6, 20:4 n-6 (ARA), 20:4 n-3, 20:5 n-3 (EPA); y negativamente con 22:5n-6, 22:5n-3 y 22:6n-3 (DHA). Se puede concluir diciendo que la primera componente engloba ácidos grasos saturados (SFAs), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados de cadena más corta y la componente 2 está relacionada con los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs). Se ha elegido la matriz de componentes con el método de rotación Quartimax con Kaiser, ya que los datos quedaban repartidos entre ambas componentes de forma más equitativa y organizada, estando relacionados de forma general con la componente 1 aquellos ácidos grasos menores a 20 átomos de carbono, mientras que la componente 2 se relaciona con aquellos ácidos grasos de 20 a más átomos de carbono. En la siguiente tabla se muestran las cargas factoriales para la composición de ácidos grasos del LT.

Figura 1. Gráfico de dispersión de componentes principales (componente 1, frente a la componente 2)



Cada vez son más los estudios que señalan que el conjunto de ácidos grasos puede ser un buen bioindicador para la trazabilidad de los organismos y en particular, de los organismos acuáticos, en el sentido de que el conjunto de los ácidos grasos puede diferenciar perfectamente y visualmente a los individuos de poblaciones diferentes, lo cual es muy útil para poder entender que las especies en función del hábitat y/o la dieta presentan perfiles de ácidos grasos que los caracterizan. En la figura número 1 se observa cómo se distinguen perfectamente las tres especies objeto de estudio, debido a las diferencias en el conjunto de sus ácidos grasos representadas a través de las dos componentes seleccionadas. En general, se observa una huella claramente definida por el tipo de alimentación.

4.3 Valor nutricional

En la tabla 4 se presentan los principales elementos de interés en cuanto al valor nutricional de las 3 especies analizadas. El contenido de proteína en peso fresco es similar en las 3 especies, de manera similar a lo que ocurre con el porcentaje de humedad. En cuanto al contenido de lípido, la especie herbívora presenta diferencias significativas, siendo menos grasa, que la carnívora y la omnívora.

Las principales diferencias a nivel nutricional las encontramos en el contenido de ácidos grasos altamente insaturados fisiológicamente esenciales, especialmente al expresar los datos en valor absoluto. La especie que aporta un mayor contenido de DHA en miligramos por cada 100 gramos de filete es el lenguado, seguido de la lisa y con cantidades relativamente bajas en la salema, siendo diferentes significativamente en las tres especies. Llama la atención el elevado contenido de ARA en la salema, que es significativamente superior al de la lisa y lenguado. En cuanto al EPA la especie más rica es *S. salpa* sin diferencias significativas con respecto a *C. labrosus*, siendo ambos contenidos superiores a los de *P. lascaris*.

El alto contenido de araquidónico en *S. salpa*, podría indicarnos que se trata de un pescado menos recomendado para el consumo por tratarse de un ácido graso relacionado con procesos proinflamatorios y por lo tanto, perjudiciales para la salud como se ha citado anteriormente. No obstante, el valor resultante de la relación entre este ácido graso y el EPA, de alguna manera parece compensar ese efecto, aportando una relación equilibrada nutricionalmente.

Desde el punto de vista del valor nutricional la especie que aporta un mayor contenido de EPA y DHA es la carnívora, con diferencias significativas frente a la herbívora, presentando valores intermedios la especie omnívora. Particularmente destacado es el contenido de DHA

que presenta *P. lascaris* lo que lo convierte, junto a su bajo contenido graso, en un pescado especialmente interesante para su consumo en dietas de adelgazamiento, para los ancianos, más susceptibles a desarrollar enfermedades trastornos neurológicos como el Alzheimer o el Parkinson (Pérez et al., 2014; Simopoulos, 2016; Zárate et al., 2017) y para madres gestantes y lactantes, donde el DHA es particularmente importante en el proceso de formación del cerebro y el buen desarrollo de la capacidad cognitiva visual de los bebés (Zárate et al., 2017). Mencionar también que el contenido equilibrado entre DHA y EPA en la lisa, unido a contenidos moderados de ARA, le haría una especie recomendable también para el consumo, si bien el alto contenido de 18:2n-6 mermaría su valor nutricional frente a otras especies (Pérez et al., 2014; Simopoulos., 2016)

Tabla 4. Porcentajes de proteína, lípido y humedad y aporte de HUFAs (mg/100g de músculo) del músculo de *Chelon labrosus*, *Sarpa salpa* y *Pegusa lascaris*.

Especies	<i>C. labrosus</i>	<i>S. salpa</i>	<i>P. lascaris</i>
% Proteína peso fresco (g/100g músculo)	18,99±1,25 ^a	20,01±0,94 ^a	20,26±0,92 ^a
% Lípido (g/100g músculo)	4,92±0,46 ^a	3,06±0,42 ^b	3,59±0,92 ^a
% Humedad (g/100g músculo)	79,46±2,74 ^a	78,49±1,51 ^a	78,45 ±0,87 ^a
ARA (mg/100g)	21,31±8,79 ^b	37,05±8,69 ^a	14,57±4,15 ^c
EPA (mg/100g)	38,48±16,13 ^a	58,89±15,41 ^a	21,25±7,91 ^b
DHA (mg/100g)	57,80±28,14 ^b	12,70±3,43 ^c	101,85±26,52 ^a
ARA/EPA	0,55±0,09 ^a	0,63±0,04 ^a	0,69±0,16 ^a
DHA/EPA	1,50±0,59 ^b	0,22±0,03 ^c	4,79±0,68 ^a
EPA + DHA (mg/100g)	96,28±15,18 ^{ab}	71,58±18,25 ^b	123,10±34,01 ^a

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (*C. labrosus* n=5; *S. salpa*: n=5; *P. lascaris*: n=7). Diferentes letras en superíndice dentro de la misma fila representan diferencias significativas entre todos los ácidos grasos (p b 0,05). ARA, ácido Araquidónico, EPA, ácido eicosapentenoico, DHA ácido docosahexaenocio
¹ Pueden contener componentes minoritarios no mostrados en la tabla.

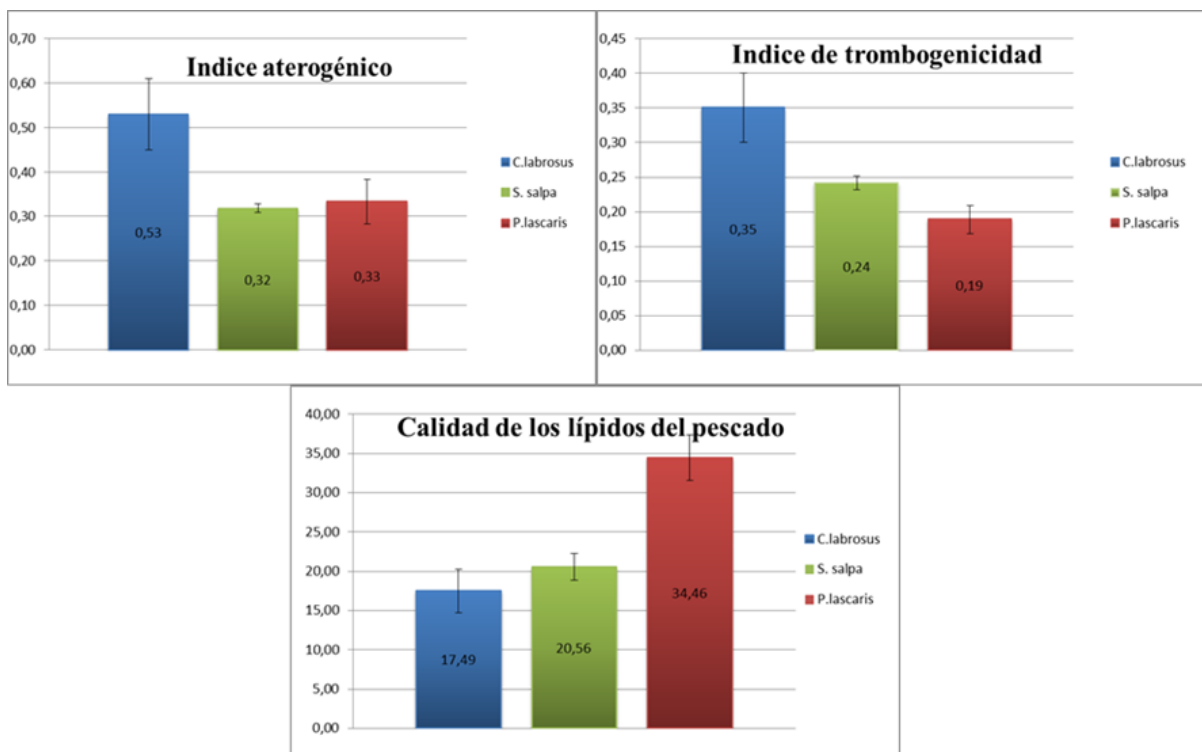
4.4 Índices de calidad lipídica

Finalmente, los análisis de los índices que se muestran en la figura 2, indican que desde el punto de vista aterogénico, que relaciona los principales ácidos saturados con los principales de la serie n-3, la especie menos saludable es *C. labrosus*, al igual que ocurre con el índice de trombogenicidad, parámetro que nos mide el riesgo potencial para producir embolias. Si bien, ambos índices son comparativamente bajos, con respecto a especies dulceacuícolas con

contenidos más bajos de n-3 HUFA y mayores contenidos de grasas saturadas, los resultados indican que entre las tres especies, sería el lenguado, la más saludable en cuanto a IA e IT. Igualmente, respecto al índice de calidad lipídica (figura 4), la especie de mayor valor nutricional, debido a la gran cantidad de ácidos grasos omega-3 es *P. lascaris*, seguida de *C. labrosus* y *S. salpa*.

Los resultados obtenidos en cuanto a los valores de los tres índices de calidad lipídica para la especie *C. labrosus*, concuerdan en cierta medida con estudios anteriores en el músculo de ésta especie, coincidiendo en que la calidad lipídica del pescado no presenta un valor muy alto pero tiene un alto valor nutricional para el consumo humano, debido al contenido de EPA y DHA (Pérez et al., 2014, Rabeh et al., 2015). A su vez los valores obtenidos para el caso de *P. lascaris* coinciden en gran medida con los obtenidos en estudios anteriores para el medregal salvaje, destacando la alta calidad de sus carnes, ricas en EPA y DHA (De Benito; 2016).

Figura 2: Índices de calidad lipídica. Las barras representan la media y las barras de error (± 1) desviación típica.



5. CONCLUSIONES

1. Los perfiles de los ácidos grasos del músculo, muestran una clara distinción entre las especies estudiadas, indicando que las principales diferencias serían debidas al tipo de alimentación, o lo que es lo mismo, a la condición de omnivoría, herbivoría o carnivoría que las caracteriza.

The fatty acid profiles of the muscle show a clear distinction between the species studied, indicating that the main differences would be due to the type of feed, or what is the same, to the condition of omnivoría, herbivoría or carnivoría that the characterizes.

2. La mayor proporción de ácidos grasos intermediarios derivados de los ácidos grasos precursores de 18 átomos de carbono en las especies omnívora y herbívora podría indicar cierta modulación dietaría que favorezca la conversión de los ácidos grasos precursores hacia los altamente insaturados HUFAs en *C. labrosus* y *S. salpa*, que se muestran así, como especies de mayor interés para analizar la sostenibilidad de su alimentación en cautividad, al contener ciertos mecanismos necesarios para sintetizar los ácidos grasos w3 esenciales, y minimizar la necesidad de piensos que contengan pequeños pelágicos y krill.

The higher proportion of intermediate fatty acids derived from the fatty acids precursors of 18 carbon atoms in the omnivorous and herbivorous species could indicate some dietary modulation that favors the conversion of the precursor fatty acids towards the highly unsaturated HUFAs in *C. labrosus* and *S. salpa*, which are shown as being of greater interest to analyze the sustainability of their feeding in captivity, by containing certain mechanisms necessary to synthesize the essential fatty acids w3, and to minimize the need for feed containing small pelagic and krill.

3. Los resultados en cuanto al valor nutricional e índices de calidad lipídica nos llevan a concluir que de las tres especies, *P. lascaris* sería la más recomendable por aportar un bajo contenido graso y elevadas cantidades de DHA, contenidos moderados de EPA y equilibrados de ARA.

The results on nutritional value and lipid quality indexes lead us to conclude that of the three species, *P. lascaris* would be the most recommended because it provides a low fat content and high amounts of DHA, moderate EPA contents and balanced ARA.

6. AGRADECIMIENTOS

Finalmente me gustaría acabar este trabajo de fin de grado, con unas palabras de agradecimiento hacia aquellas personas que me han ayudado y/o acompañado en este arduo camino de aprendizaje y formación profesional, con el que finalizo una etapa importante para mí.

Primeramente a mis padres y familia, por estar siempre ahí, en los momentos buenos y no tan buenos, y por darme el empujón que muchas veces necesitaba para seguir adelante. Sin su ayuda no hubiera sido posible. Además de a mi pareja Daniel, por su preocupación, comprensión y acompañamiento en todos estos años de formación.

A mis dos tutores académicos, la Dra. Covadonga Rodríguez González y el Dr. Roberto Dorta Guerra, por ser mis guías en este proyecto, por depositar su confianza en mí, estar disponibles en cualquier comentario y por todas las horas dedicadas.

A todos los compañeros de la U.D. Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Facultad de Ciencias de la ULL, especialmente a la Dr. Nieves Guadalupe Acosta por enseñarme a aplicar las técnicas de laboratorio pertinentes y por su infinita paciencia y al Dr. Jose. Antonio Pérez por sus grandes consejos y predisposición.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Banaimoon SA. 1992. Fatty acids in marine macroalgae from southern Yemen (Hadramout) including occurrence of eicosatetraenoic (20/4) and eicosapentaenoic (20/5) acids. *Bot. Mar.* 35: 165–168.
- Bell, J. G., y Waagbø, R. (2008). Safe and nutritious aquaculture produce: benefits and risks of alternativesustainable aquafeeds. In *Aquaculture in the Ecosystem* (pp. 185-225). Springer Netherlands.
- Bell, M. V., y Tocher, D. R. (2009). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In *Lipids in aquatic ecosystems* (pp. 211-236). Springer New York.
- Bradbury, J. (2011). Docosahexaenoic acid (DHA): an ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients*, 3(5), 529-554.
- Brito, A., Pascual, P. J., Falcón, J. M., Sancho, A., y González, G. (2002). Peces de las islas Canarias. Catálogo comentado e ilustrado. Francisco Lemus Editor, La Laguna.
- Buzzi, M., Henderson, R. J., y Sargent, J. R. (1996). The desaturation and elongation of linolenic acid and eicosapentaenoic acid by hepatocytes and liver microsomes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1299(2), 235- 244.
- Cejas, J. R., Almansa, E., Villamandos, J. E., Badía, P., Bolaños, A., y Lorenzo, A. (2003). Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture*, 216(1), 299-313.
- Cejas, J. R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Samper, M., y Lorenzo, A. (2004). Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodu sargus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 138(1), 91-102.
- Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. F Frikha, M Kammoun, N Hammami, RA Mchirgui, L Belbahri, Y Gargouri, N Miled, F Ben–Rebah (2004). *Cienc. mar* vol.37 no.2 Enseñada jun. 2011.
- Cook H. W., y McMaster, C. R. (2004) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, (eds D.E. Vance and J.E. Vance). Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp 181–204.
- FAO. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*. Rome, Italy.
- Folch J., Lees, M. y Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biology Chemistry*. 226: 497-509.
- Fonseca-Madriral, J., Navarro, J. C., Hontoria, F., Tocher, D. R., Martínez-Palacios, C. A., y Monroig, Ó. (2014). Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of $\Delta 4$ and $\Delta 6\Delta 5$ desaturases of *Chirostoma estor*. *Journal of Lipid Research*, 55(7), 1408-1419.
- Global Organization for EPA and DHA Omega-3s (2015). Global recommendations for EPA and DHA intake 2015. p. 17
- Gerking, S. D. (1984). Fish as primary consumers: assimilation and maintenance ration of an herbivorous fish, *Sarpa salpa*, feeding on a green alga. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113(3), 378-387.

- Hixson, S. M. (2014). Fish nutrition and current issues in aquaculture: the balance in providing safe and nutritious seafood, in an environmentally sustainable manner. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 5(3), 1.
- Izquierdo, M. S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., y Rosenlund, G. (2003). Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition*, 9(6), 397-407.
- Jadot, C., Donnay, A., Acolas, M. L., Cornet, Y., y Anras, M. B. (2006). Activity patterns, home-range size, and habitat utilization of *Sarpa salpa* (Teleostei: Sparidae) in the Mediterranean Sea. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 63(1), 128-139.
- Lee, J. M., Lee, H., Kang, S., y Park, W. J. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1), 23.
- Li, Y., Monroig, O., Zhang, L., Wang, S., Zheng, X., Dick, J. R., You, C. y Tocher, D. R. (2010). Vertebrate fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39), 16840-16845.
- Monroig, Ó., Li, Y., y Tocher, D. R. (2011a). Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in delta-6 desaturases of marine species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(4), 206-213.
- Monroig, Ó., Webb, K., Ibarra-Castro, L., Holt, G. J., y Tocher, D. R. (2011b). Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. *Aquaculture*, 312(1), 145-153.
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E., Constenla, M., Costas, B., Dias, J., Duncan, N., Engrola, S., Estevez, A., Gisbert, E., Mañanós, E., Valente, L. M. P., Yúfera, M. y Dinis, M. T. (2014). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*.
- Morais, S., Castanheira, F., Martinez-Rubio, L., Conceição, L. E., y Tocher, D. R. (2012). Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(4), 660-671.
- Naylor, R. L., Goldburg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney H., y Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017-1024.
- Pajuelo, J. G., y Lorenzo, J. M. (2008). Reproductive characteristics of the sand sole *Pegusa lascaris* (Soleidae), from the eastern-central Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 88(03), 629- 635.
- Park, W. J., Kothapalli, K. S., Lawrence, P., Tyburczy, C., y Brenna, J. T. (2009). An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product $\Delta 8$ -desaturates 20: 2n-6 and 20: 3n-3. *Journal of Lipid Research*, 50(6), 1195-1202.
- Pérez, J. A., Rodríguez, C., Bolaños, A., Cejas, J. R., y Lorenzo, A. (2014). Beef tallow as an alternative to fish oil in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Effects on fish

performance, tissue fatty acid composition, health and flesh nutritional value. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(5), 571-583.

Pérez, M.J., Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Jerez, S., Lorenzo, A. (2007). Lipid and fatty acid content in wild white seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at different stages of the reproductive cycle; *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 146 (2007) 187–196.

Rabeh, I., Telahigue, K., Boussoufa, D., Besbes, R., El Cafsi, M.H. (2015). Comparative analysis of fatty acids profiles in muscle and liver of Tunisian thick lipped grey mullet *Chelon labrosus* reared in seawater and freshwater; *Journal of the Tunisian Chemical Society*, 17, 95-104

Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M., Moghadasian, M. H. (2009). A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 668-679.

Rodríguez, C., Acosta, C., Badía, P., Cejas, J. R., Santamaría, F. J., Lorenzo, A. (2004). Assessment of lipid and essential fatty acids requirements of black seabream (*Spondylisoma cantharus*) by comparison of lipid composition in muscle and liver of wild and captive adult fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(4), 619-629.

Rodríguez, C., Lorenzo, A. y Martín, V. (2012). Nutrición lipídica. En Sanz F. (coord.), *La nutrición y alimentación en piscicultura* (pp. 151-231). Madrid: Editorial Paraninfo.

Rodríguez, C., Perez, J. A., Diaz, M., Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H., Lorenzo, A. (1997). Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture*, 150(1), 77-89.

Sargent, J. R., Bell, J. G., Bell, M. V., Henderson, R. J., y Tocher, D. R. (1995). Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3-4), 183-198.

Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., y Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177(1), 191-199.

Sargent, J. R., Tacon, A. G. J. (1999). Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(02), 377-383.

Sargent, J.R., Tocher, D.R., y Bell, J.G. (2002). The Lipids, pp. 181 – 257, In J.E. Halver and R.W. Hardy (eds.), *Fish Nutrition*, 3rd edition. Academic Press, San Diego

Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), 128.

Sprecher H. (2000). Metabolism of highly unsaturated n–3 and n–6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486:219–231.

Tacon, A. G., y Metian, M. (2013). Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 22-38.

Tacon, A. G., Metian, M., Turchini, G. M., y De Silva, S. S. (2009). Responsible aquaculture and trophic level implications to global fish supply. *Reviews in fisheries science*, 18(1), 94-105.

Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11(2), 107-184.

- Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41(5), 717-732.
- Tocher, D. R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, 94-107.
- Tocher D.R., Zheng X., Schlechtriem C., Hastings N., Dick J.R. y Teale A.J. (2006) Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish; cloning, functional characterization and nutritional regulation of fatty acid Δ 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* 41, 1003-1016.
- Torstensen, B. E., Frøyland, L., Ørnsrud, R., y Lie, Ø. (2004). Tailoring of a cardioprotective muscle fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed vegetable oils. *Food Chemistry*, 87(4), 567-580.
- Ward, O. P., y Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627-3652.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, p. 619.
- Zárate, R., Jaber-Vasdekis, N., Tejera, N., Pérez, J.A., Rodríguez, C. (2017, accepted). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*.
- Zheng X., Seiliez I., Hastings N., Tocher D.R., Panserat S., Dickson C.A., Bergot P. y Teale A.J. (2004) Characterization and comparison of fatty acyl Δ 6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139B, 269-279.