

Caracterización de lípidos en aceite de hígados de tiburones costeros de Cuba (Characterization of liver oil lipids of coastal sharks of Cuba)

García Elisa: Centro de Investigaciones Pesqueras, La Habana, Cuba, e-mail: elisagr04@cibnor.mx | Gutiérrez Sarah: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, La Habana, Cuba | Nolasco Héctor: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz BCS México.

Resumen.

En los últimos años, se ha dedicado gran interés al estudio de los lípidos de origen marino debido a su composición y muy especialmente por su contenido de ácidos grasos polinsaturados omega-3 (Calder, 2003) ya que forman parte de las estructuras celulares básicas e intervienen en los procesos metabólicos en mamíferos (Pawlosky et al., 2003). Se analizaron las clases de lípidos y la composición de ácidos grasos en las fracciones neutra y polar de una mezcla de aceites obtenida a partir de hígados de *Ginglimostoma cirratun*, *Carcharhinus longimanus* y *C. falciformes* aplicando las técnicas de TLC-Iatroscan y cromatografía de gases. Los triglicéridos fueron la clase predominante representando el 96% del contenido total de lípidos, los lípidos polares constituyeron el 0.31%. Fueron identificados 21 ácidos grasos en la fracción neutra del aceite de hígado de tiburón y 18 en la fracción polar, de ellos los insaturados formaron el 69.3% y 53.9% respectivamente y los omega-3 representaron el 7% del total de ácidos grasos, pudiendo ser considerado este aceite como fuente alternativa de dichos compuestos.

Palabras claves: caracterización lípidos, characterization lipids | ácidos grasos polinsaturados, polyunsaturated fatty acids | aceite hígado tiburón, shark liver oil.

Abstract.

During the last few years, there has been great interest in the study of marine lipids because of their composition, and especially because of their omega-3 polyunsaturated fatty acids (Calder, 2003) as they form part of the basic cellular structures and intervene in metabolic processes in mammals (Pawlosky et al., 2003). Types of lipids were analyzed as well as oils obtained from livers of *Ginglimostoma cirratun*, *Carcharhinus longimanus* and *C. falciformes* applying

TLC-Iatroscan and gas chromatography techniques. Triglycerides were the predominant type, representing 96% of the total lipid content, polar lipids constituted 0.31%. Twenty fatty acids were identified in the neutral fraction of shark liver oil and eighteen in the polar fraction; from these lipids, unsaturated fatty acids formed 69.3% and 53.9% respectively, and omega-3 represented 7% of the total fatty acids, considering this type of oil as an alternative source of the compounds already mentioned.

Introducción

En los últimos años, se atribuyó gran importancia en la nutrición a los ácidos grasos polisaturados de cadena larga y particularmente, a los omega-3 (Nettleton, 1995, Stone, 1996, De Caterina et al., 2003, Calder, 2003) ya que forman parte de las estructuras celulares básicas e intervienen en los procesos metabólicos en mamíferos (Pawlosky et al., 2003). Numerosos estudios han demostrado que el consumo permanente de ácidos grasos omega-3 en cantidades adecuadas, estimula las funciones inmunológicas (Side et al., 1998) y son requeridos para el desarrollo del cerebro (Haag, 2003) y la visión (Connor, 1990). Varios efectos de estos ácidos grasos se derivan de su acción sobre la fluidez de las membranas, mientras que otros se producen a través de modificar el patrón de lipoproteínas del plasma o las propiedades funcionales del endotelio vascular, de ahí sus potenciales aplicaciones en diversas patologías.

Además de ser una fuente de energías, las familias n-3 y n-6 se incorporan a las células, donde son precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos) (Crawford et al., 1989, Carlson et al. 1992), que intervienen en numerosos procesos fisiológicos tales como la coagulación de la sangre o las respuestas inflamatorias. El consumo de ácidos grasos n-6 y n-3 determina los tipos y cantidades de eicosanoides en el organismo, lo cual influye potencialmente en todos los procesos en los que intervienen. Los ácidos grasos del grupo omega-3 están presentes principalmente en los productos de origen marino, siendo los peces y sus derivados industriales como las harinas y los aceites las fuentes más importantes (Oomen, 2000, Hu, 2002).

Navarro et al. (1991, 2000) evaluaron la composición del aceite obtenido a partir de diferentes especies de tiburones de las costas cubanas, sin embargo el manejo de las capturas durante las pesquerías, limita la selección de los hígados por especies, por lo que en este estudio se caracterizó el aceite obtenido a partir de una mezcla de hígados de diferentes especies.

Materiales y Métodos.

1. Obtención del aceite de hígado de tiburón

1.1 Recolección de los hígados

Como materia prima se utilizaron hígados de las especies de tiburones *Ginglimostoma cirratum*, *Carcharhinus longimanus* y *C. falciformes*, obtenidos en las pesquerías de la zona nororiental de Cuba durante el mes de febrero. Los animales fueron eviscerados y los hígados se colocaron en bolsas de polietileno identificados con la fecha de captura, posteriormente fueron mantenidos en hielo (0-5°C) durante 48 horas mientras duró la pesquería, pasado este tiempo fueron congelados a -18°C, conservándose a esta temperatura hasta el momento de su utilización.

1.2 Obtención del aceite crudo.

García, Elisa; Gutierrez, Sara; Nolasco, Hector; .Caracterización de lípidos en aceite de hígados de tiburones² costeros de Cuba - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 08, Agosto /2005. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España.

Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080505.html>

Para la obtención del aceite, 30 Kg de hígados de cada especie fueron descongelados y molidos, sometiéndose la masa homogénea a un proceso de cocción durante 10 minutos a 70°C. La extracción del aceite se realizó por centrifugación a 10 000 rpm durante 30 minutos, separando el aceite de los sólidos sedimentados (Kinsella, 1987).

2. Análisis de lípidos.

Para el análisis de los lípidos se tomó una muestra de aceite a la que se le añadió una solución de cloroformo-metanol 2:1, utilizando como antioxidante BHT (butilato de hidroxitolueno) y 23:0 como estándar, la cual se almacenó a -20°C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo la muestra fue sonicada y evaporada hasta aproximadamente 0.5 mL, posteriormente se realizó la separación de los lípidos neutros y polares en una microcolumna empacada con sílica-gel.

Los ácidos grasos de ambas fracciones fueron derivatizados con BF₃ - metanol. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard G 1800B equipado con una columna capilar polar OmegaWAX (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm de espesor de película), detector MS, helio como gas acarreador y un gradiente de temperatura de 110 - 220°C a 3°C min⁻¹. La identificación de los ácidos grasos fue por comparación de los tiempos de retención con estándares (Supelco, Bellefonte, USA).

El análisis de los lípidos totales se realizó con un Iatroscan TLC/ FID MK-5, utilizando chromarods S-III, los cuales fueron previamente llevados a humedad constante (Ackman y Heras, 1997). Un microlitro de muestra fue colocado en un chromarod utilizando una fase móvil de hexano-acetato de etilo-dietil eter-ácido fórmico en la siguiente proporción: 91:6:3:1, se realizó la separación en un tiempo de 30 min. (Ackman y Heras, 1997, Palacios et al. 2004). Los lípidos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con estándares (Sigma, St. Louis, USA) y la concentración fue calculada a partir de las áreas de los picos de cada estándar.

En todos los casos se realizaron tres determinaciones, calculándose la media y la desviación estándar.

Resultados y discusión

La concentración de lípidos en los hígados homogenizados fue de 42.0 ± 3.8% (w/w), estos valores se encuentran entre los rangos de 26.7-51.8% y 26.1-60.1% obtenidos por Navarro et al. (1991) y Jayasinghe et al. (2003) para diferentes especies de tiburones capturados en aguas costeras de Cuba y en el Océano Índico respectivamente. En cuanto a la composición de los lípidos en el aceite, los triglicéridos fueron la clase predominante (Tabla 1) representando el 96.6% del contenido total de lípidos, estos resultados coinciden con los obtenidos por Nichols et al. (2001) al evaluar aceites obtenidos a partir de *Mustelus antarcticus*, *Galeorhinus galeus* y *Squalus*

acanthias, capturados en aguas templadas de Australia y con Jayasinghe et al. (2003) en hígados de tiburones de aguas costeras en la India. Høllmer (1989) define los

García, Elisa; Gutiérrez, Sara; Nolasco, Hector; .Caracterización de lípidos en aceite de hígados de tiburones³ costeros de Cuba - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 08, Agosto /2005. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org/)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org/)® - Veterinaria Organización S.L.® España.

Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080505.html>

aceites de pescado como una fuente de triglicéridos y los evalúa de buena calidad si estos lípidos se encuentran en niveles entre 90 y 95 %.

Tabla 1. Clases de lípidos en aceite de hígado de tiburón

Lípidos	(%)
Triglicéridos	96.69 ± (0.07)
Diglicéridos	1.69 ± (0.03)
Monoglicéridos	0.76 ± (0.01)
Fosfolípidos	0.31 ± (0.01)

Se presentan las medias y la desviación estándar entre paréntesis (n=3)

Los triglicéridos son el mayor componente de los lípidos de depósito en las células de los animales. En el pescado, los triglicéridos son movilizados a partir de los lípidos de depósito hacia el hígado en dependencia de las necesidades de energías del organismo (Navarro et al., 2000).

Los lípidos polares (fosfolípidos) en el aceite de hígado de tiburón resultaron sólo el 0.31% del total obtenido. Se han realizado diversos trabajos acerca de la composición y distribución posicional de los ácidos grasos en los fosfolípidos. Shuster et al. (1964) analizaron por cromatografía de gases, los ácidos grasos presentes en la fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina del músculo de dos especies de tiburidos, encontrándose cantidades significativas de ácidos grasos insaturados 20:5 y 22:6.

En este estudio fueron identificados veintiún ácidos grasos en la fracción neutra del aceite y dieciocho en la fracción polar (Tabla 2). Los resultados muestran que el ácido palmítico (16:0) y el esteárico (18:0) son los ácidos grasos saturados predominantes en ambas fracciones. Semejante comportamiento fue observado por Saglik et al. (2001) para el bonito y la macarela del Atlántico y por Saify et al. (2003) en aceites de hígados de *Eusphyra blochii* y *Carcharhinus bleekeri*. La composición porcentual de los ácidos grasos saturados, con respecto al total en el aceite elaborado durante este trabajo, fue de 30.6% en los lípidos neutros y 46% en los polares.

Los ácidos grasos insaturados resultaron los más abundantes en ambas fracciones, principalmente los monoenoos, cuya concentración estuvo entre 40-42%. Bakes et al. (1996) reportaron para dos especies de tiburones de aguas profundas (*Centroscymnus crepidater* y *Etmopterus granulosus*) niveles de los ácidos grasos monoinsaturados (16:1, 18:1, 20:1, 22:1) entre 72 - 74.9% del total de los ácidos grasos analizados, por otro lado Navarro et al. (2000) determinaron que los ácidos grasos monoinsaturados en especímenes de *C. falciiformes* capturados en el Golfo de California, estaban en concentraciones del 19%, muy inferiores a los alcanzados en este estudio, sin embargo este mismo autor evaluó los niveles de monoenoos en

Galeocerdo cuvieri procedente de las costas de Cuba encontrando valores (42.9%) semejantes a los obtenidos en esta investigación.

Table 2. Ácidos grasos (%) metil esterificados (FAME) de las fracciones neutra y polar del aceite de hígado de tiburón.

FAME	Fracción Neutra (%)	Fracción Polar (%)
4:0	3.14 ± (0.06)	4.05± (0.17)
16:0	21.95 ± (0.04)	33.35± (0.01)
16:1(n-9)	0.68 ± (0.010)	0.83± (0.08)
16:1(n-7)	7.30 ± (0.29)	8.66± (0.09)
16:1(n-5)	14.19 ±(0.08)	0.06± (0.05)
18:0	5.54± (0.03)	8.65± (0.03)
18:1(n-9)	14.18± (0.26)	20.66± (0.74)
18:1(n-7)	4.57± (0.01)	6.72± (0.05)
18:2(n-6)	14.58± (0.01)	-
18:3(n-6)	0.53± (0.08)	-
18:3(n-3)	0.47± (0.21)	-
18:4(n-3)	0.188± (0.37)	0.35± (0.23)
20:1(n-11)	0.66± (0.55)	1.21± (0.40)
20:1(n-9)	0.91± (0.08)	1.95± (0.29)
20:1(n-7)	0.22± (0.03)	0.39± (1.21)
20:2(n-6)	0.64± (0.12)	0.73± (0.85)
20:3(n-6)	0.27± (0.46)	0.05± (0.06)
20:4(n-6)	4.46± (0.02)	5.07± (0.32)
20:5(n-3)	1.57± (0.21)	1.80± (0.12)
22:1(n-9)	0.10± (0.07)	0.15± (0.08)
22:6(n-3)	4.87± (0.42)	5.31± (0.29)

Se presentan las medias y la desviación estándar entre paréntesis (n=3)

Un comportamiento inverso se aprecia con relación a los ácidos grasos polinsaturados, que en esta evaluación representaron el 26.5% de los lípidos neutros y 13.3% de los polares. Para el aceite obtenido a partir de *G. cuvieri* por Navarro et al (2000) los ácidos grasos polinsaturados representaban el 14.4 % y en el caso de *C. falciformes* el porcentaje fue superior (37.6%).

Se ha estudiado por diferentes autores (Ueda et al., 1976, Farkas et al. 1980) la incidencia de las estaciones del año, la temperatura y el tipo de alimentación en la composición de los lípidos y en el perfil de ácidos grasos en las especies marinas. Hardy y Mackie (1969) observaron en aceite de sardina que el contenido de fosfolípidos variaba inversamente al contenido de triglicéridos y que el grado de instauración

disminuía durante el invierno, lo que pudiera explicar esta diferencia en los resultados, ya que en este estudio los animales fueron capturados en ese periodo.

El ácido linoléico (18:2 n6) que es considerado fundamental para el mantenimiento del

García, Elisa; Gutierrez, Sara; Nolasco, Hector; .Caracterización de lípidos en aceite de hígados de tiburones costeros de Cuba - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 08, Agosto /2005. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España.

Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080505.html>

metabolismo celular, las actividades físicas y el crecimiento (Uauy et al., 2002, Laidlaw, 2003) está presente en la fracción neutra en un 13%. Dentro de los polinsaturados, los ácidos grasos n-3 fueron el 7.4%. Los porcentajes de los ácidos eicosanpetaenoico (20:5n3) y docosahexaenoico (22:6n3) (Tabla 2) encontrados, sobrepasaron los reportados por Saify et al. (2003) para aceites de hígados de tiburones de las especies *C. bleeker* y *E. blochii* cuyos valores oscilaron entre 0.16-0.85% y 0.06-2.39% y estuvieron muy similares a los obtenidos por Navarro et al. (2000) para *G. cuvieri*.

Los resultados alcanzados permiten evaluar el aceite obtenido a partir de una mezcla de hígados de tiburones, como una fuente importante de lípidos de reserva, que aporte niveles considerables de ácidos grasos polinsaturados, y que puede ser valorado como una alternativa de utilización de estos subproductos teniendo en cuenta las características de las pesquerías en Cuba.

Agradecimientos

Los autores queremos agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el financiamiento de este proyecto, al grupo de investigadores y técnicos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en México y al personal del laboratorio del Centro de Investigaciones Pesqueras de Cuba por su asistencia técnica y apoyo en la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Ackman, R. G., Heras, H. Recent applications of IATrosScan TCL-FID methodology. In McDonald, R. E., Mossoba, M. M. (Eds.), *New Technology and Applications in Lipids Analysis*. AOCS Press. Champaign, IL 1997; 325-340.
- Bakes, M. J., Nichols, P. D. Lipid fatty acid and squalene composition of liver oil from six species of deep-sea sharks collected in southern Australian waters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1996; 110B:267-275.
- Calder, P. C. New evidence in support of the cardiovascular benefit of long-chain n-3 fatty acids. *Italian Heart Journal*, 2003; vol. 4:427 -29.
- Carlson, S. E., Cooke, R. J., Werkman, S. H. y Tolley, E. A. First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formula. *Lipids*, 1992; 27(11):901-907.
- Connor, W. E. Grasas y aceites en la alimentación humana. Consulta FAO - OMS de expertos. *Alimentación y Nutrición*, 1990;57.
- Crawford, M. A., Doyle, W., Drury, P. J., Lennon, A., Costeloe, K. y Leighfield, M. n-6 and n-3 fatty acids during early human development. *Journal of Internal Medicine*, 1989; 225 suppl. 1:159-169.
- De Caterina, R. Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids: from epidemiology to bedside. *Am. Heart Journal*, 2003; vol. 146:420-30.
- Farkas, T., Csengeri, I., Majoros, F., Olah, J. Metabolism of fatty acids in fish. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and deposition of fatty acids in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus. *Aquaculture*, García, Elisa; Gutiérrez, Sara; Nolasco, Hector; .Caracterización de lípidos en aceite de hígados de tiburones costeros de Cuba - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 08, Agosto /2005. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080505.html>

- 1980; 20(1):17.
- Haag, M. Essential fatty acids the brain. *Can. J. Psychiatry*, 2003; vol.48(3):195-203.
 - Højlmer, G. K. Triglycerides in Robert G Ackman CRC PRESS (eds.) USA. *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils*, 1989; vol I:139-173.
 - Hu, F. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *J. of Am. Medical Association*, 2002; vol.287:1815-1821.
 - Jayasinghe, Ch., Gotoh, N., Tokairin, S., Ehara, H. Wada S. Inter species changes of lipid compositions in liver of shallow-water sharks from the Indian Ocean. *Fisheries Science*, 2003; 69 (3):644.
 - Kinsella, J. E. *Edible Fish Oil Processing and Technology in Food Science and Technology*, Vol 23: *Seafood and Fish Oils in Human Health and Disease*, Marcel Dekker, New York 1987.
 - Laidlaw, M., B., Holub, J.. Effects of supplementation with fish oil-derived n-3 fatty acids and γ -linolenic acid on circulating plasma lipids and fatty acid profiles in women. *Am. J. Clin. Nutr*, 2003; 77:37-42.
 - Navarro, G. G., Pacheco, A. R., Vallejo, C B, Ramirez, J. C., Bolaños, A. Lipid composition of the liver oil of shark species from Caribbean and Gulf of California waters. *J. of Food Composition and Analysis*, 2000; 13:791-798.
 - Navarro, G. G., Mola, L., García, E., Simelane, K., Barrios, E., Lee, M. Composición lipídica y patrón de ácidos grasos en hígados de elasmobranchios (Selachioide). *Ciencia y Tecnología Pesquera (Cuba)*, 1991; 3:18-23.
 - Nettleton, J. A. *Omega-3 fatty acids and health*. New Cork, N Y: Chapman and May, 1995;354.
 - Nichols, P. D., Bakes, M. J., Elliott, N. G. Oil rich in docosahexaenoic acid in livers of sharks from temperate Australian waters. *J. Marine and Freshwater Research*, 2001; 49(7):763-767.
 - Oomen, C. M. Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy and the Netherlands. *Am. J. of Epidemiology*, 2000; vol.151:999-1006.
 - Palacios, E., Bonilla, A., Luna, D., Racotta, I S. Survival, Na^+ / K^+ -ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvar. *Aquaculture*, 2004; 234:497-511.
 - Pawlosky, R. J., Hibbeln, J.R., Lin, Y., Goodson, S., Riggs, P., Sebring, N., Brown, G. y Salem, J. N. Effect of beef and fish based diets on the kinetics of n-3 fatty acid metabolism in human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77:565 - 572.
 - Saglik, S. e Imre, S. ω 3 Fatty acids in some fish species from Turkey. *Journal of Food Science*, 2001; Vol. 66(2).
 - Saify, S, Akhtar, S. A study on the fatty acid composition of fish liver oil from two marine fish, *Eusphyra blochii* y *Carcharhinus bleekeri*. *Turk J. Chem.*, 2003; 27:251-258.
 - Shuster, C. Y., Froines, J. R., Olcott, H. S. Phospholipids of South African pilchard (*Sardina ocellata*). *J.A.O.C.S.*, 1964; 41:619.
 - Sidex, X., Cohen, D., Chen, L. H. Effect of fish oil on cytokines and immune functions of mice with murine AIDS. *J. of lipids Research*, 1998; vol. 39:1677-1687

García, Elisa; Gutierrez, Sara; Nolasco, Hector; .Caracterización de lípidos en aceite de hígados de tiburones⁷ costeros de Cuba - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 08, Agosto /2005. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España.

Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080505.html>

- Stone, J. N. Fish Consumption, fish oil, lipids and coronary heart disease. Circulation, 1996; 94:2337-2340.
- Uauy, R., Olivares, S. Importancia de las grasas y aceites para el crecimiento y desarrollo de los niños 2002. Disponible en URL: <http://www.fao.org/docrep/T4660t/t4660t05.htm>.
- Ueda, T. Changes in the fatty acid composition of mackerel lipid and probably relate factors. Influence the season, body length and lipids content. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, 1976; 42:479.

Trabajo recibido el 28.06.05 nº de referencia 080511_REDVET. Enviado por su autorres, miembros de la [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)®. Publicado en [REDVET](http://www.veterinaria.org)® el 01/08/05.

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - www.veterinaria.org y [REDVET](http://www.veterinaria.org)® www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org)

(Copyright) 1996-2005. [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org)®, ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)®