

# COMPOSICION LIPIDICA DEL MUSCULO DE LA COLA DEL CANGREJO DE RIO *AUSTROPOTAMOBIVS* *PALLIPES* EN EPOCA DE REPRODUCCION

Por V. Díez (1)  
J.M. Zumalacárregui (1)  
C. Martínez (1)

## INTRODUCCION

Son muy pocos los datos existentes en la literatura científica sobre la composición química de los cangrejos de agua dulce, a diferencia de lo que ocurre con los de origen marino. En el caso concreto de *A. pallipes*, Rodhes y Holdich<sup>12</sup> han sido los primeros en estudiar la composición química de la porción comestible de esta especie. La carencia de datos es aún más evidente en lo que se refiere al estudio de la fracción lipídica, siendo el trabajo de Cossins<sup>3</sup>, que ha estudiado la influencia de la temperatura sobre los cambios en la composición lipídica, el único existente.

En este trabajo se estudia el contenido en diversas fracciones lipídicas y la composición en ácidos grasos de las mismas en el músculo de la cola del cangrejo de río *A. pallipes*, tanto en machos como en hembras durante la época de la reproducción.

## MATERIAL Y METODOS

Los cangrejos utilizados en el presente estudio (39 hembras y 33 machos) procedían del río Orbigo (Veguellina de Orbigo, León). La recogida se realizó durante la segunda quincena del mes de abril de 1977 con la autorización del ICONA. La longitud del caparazón estaba entre 6,5 y 8 cm. Todos los análisis se llevaron a cabo sobre el músculo flexor del abdomen.

La extracción y purificación de los lípidos se llevó a cabo siguiendo la técnica de Folch y col.<sup>6</sup> a partir de 47 y 50 gr. de tejido muscular procedentes de la totalidad de los machos y de las hembras, respectivamente, utilizados en el presente estudio.

El extracto lipídico se conservó hasta los posteriores análisis a -35°C.

(1) Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos y Toxicología.



## RESULTADOS

El contenido en lípidos totales en el músculo de la cola de los cangrejos de la especie *A. pallipes* fue de un 1,24% en las hembras y un 1,51% en los machos.

En la tabla I figura el contenido en lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos, expresados en términos de porcentaje sobre el extracto lipídico total.

### Lípidos neutros

Los lípidos neutros (eluidos de la columna de ácido silícico/ celita con cloroformo) fueron separados por cromatografía en lámina fina según se describe en material y métodos, apareciendo en las cromatoplasmas 7 manchas, tanto en las hembras como en los machos, enumeradas de la 1 a la 7. Las manchas 1, 3 y 5 se caracterizaron como glicéridos parciales (mono y diglicéridos), ácidos grasos libres y triglicéridos respectivamente, en base a su R<sub>f</sub>, a la cromatografía con patrones y por la fluorescencia emitida bajo la lámpara de luz UV después de rociar la lámina con rodamina 6G.

La mancha número 2 mostró un color rojo intenso frente al reactivo del ácido sulfúrico, extraída de las láminas y cromatografiada en las condiciones descritas en material y métodos, mostró un solo pico con un tiempo de retención idéntico al de un patrón de colesterol. Fue identificada como colesterol libre.

La mancha número 4 adquirió un color intenso con el reactivo de leuco azul de metileno y tuvo un R<sub>f</sub> similar al de un patrón de ubiquinona. Fue tentativamente identificada como ubiquinona.

Las manchas número 6 y 7 fueron imposibles de separar por lámina fina, por lo que se sometieron conjuntamente a diversos análisis posteriores. Mostró frente al reactivo del ácido sulfúrico una coloración rojiza demostrándose la presencia de ésteres de colesterol. Saponificada la muestra y cromatografiada en columna de alúmina se detectó la presencia de hidrocarburos, por lo que se consideró que dichas manchas estaban constituidas por una mezcla de ésteres de colesterol e hidrocarburos.

En la tabla II se recoge el contenido en estos lípidos neutros.

### Fosfolípidos

Muestras de los fosfolípidos eluidos con metanol en la columna de ácido silícico/celita, fueron cromatografiados en lámina fina, según se describe en material y métodos, junto con patrones de lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, cardiolipina, esfingomielina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol.

Para la caracterización de los distintos componentes se tuvo en cuenta, además, de los R<sub>f</sub> el comportamiento frente a los siguientes reactivos: azul de molibdeno, yodo-ioduro potásico y ninhidrina.

Todos los compuestos (seis) dieron positivo frente al reactivo de azul de molibdeno. Las manchas 4 y 5 dieron positivo frente al reactivo de ninhidrina (se identificaron como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, respectivamente), las 1, 2 y 3 reaccionaron frente al reactivo de yodo-ioduro potásico (se caracterizaron como lisofosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatidilcolina, respectivamente). La mancha número 6 se caracterizó como cardiolipina.

Los valores alcanzados por los distintos fosfolípidos se recogen en la tabla III.

El contenido en ácidos grasos de diversos lípidos neutros (triglicéridos y ácidos grasos libres) y fosfolípidos (esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina) quedan recogidos en las tablas IV (hembras) y V (machos).

Los lípidos totales se fraccionaron por cromatografía en columna de ácido silícico-celita (1/1). La elución de las distintas fracciones se realizó aplicando sucesivamente: cloroformo (lípidos neutros), acetona (glicolípidos) y metanol (fosfolípidos).

La separación de los lípidos neutros se realizó por cromatografía en lámina fina sobre sílica gel typ 60 y PF 254, utilizando como fase móvil una mezcla de éter de petróleo/éter etílico/ácido acético (80:20:1) (v/v/v). La identificación de los distintos componentes se basó en la comparación del comportamiento cromatográfico (R<sub>f</sub>) de las muestras y de diversos patrones conocidos (triglicéridos, mono y diglicéridos, ácido oléico, colesterol, ésteres del colesterol y ubiquinona) cromatografiados conjuntamente y por los siguientes reactivos específicos: rodamina 6G y leuco azul de metileno. Los lípidos se detectaron con ácido sulfúrico al 50% o con vapores de yodo.

La separación de los fosfolípidos se llevó a cabo sobre sílica gel typ 60, utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo/metanol/agua (65:25:4) (v/v/v). La identificación de los distintos fosfolípidos se basó en la utilización de diversos patrones y en el rociado de las láminas finas con diversos reactivos específicos (ninhidrina, azul de molibdeno y yodo-ioduro potásico). La extracción de los diversos fosfolípidos de la sílica gel se llevó a cabo con metanol.

Para la identificación de los distintos lípidos neutros y fosfolípidos separados se siguieron distintos procedimientos. Los fosfolípidos por su contenido en P determinado por la técnica de Chen y col<sup>2</sup>, el colesterol por el método de Moore y Baumann<sup>11</sup> y los ácidos grasos libres por titulación alcalina teniendo en cuenta el peso molecular del ac. graso promedio resultante de la cromatografía en fase gaseosa. El resto de los componentes se cuantificó por pesada.

Para la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los triglicéridos y de los distintos fosfolípidos se utilizó la técnica de metilación de Sheata y col<sup>15</sup> y para la de los ácidos grasos libres, la de Schelenk y Gellerman<sup>14</sup>.

Para la identificación y posterior cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases «Perkin-Elmer» modelo F-11, equipado con una columna de vidrio rellena con un 10% de DEGS sobre Chromosorb W (80-100 mallas). Se utilizó un programa de temperatura de 100-190°C. (con un incremento de temperatura de 8°C./min.) hasta la aparición del 18:2, manteniéndose después la temperatura constante a 190°C. Los distintos ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención con los de estándares apropiados (Sigma) y cuantificados por triangulación de los picos, teniendo en cuenta el factor respuesta del detector para cada ácido graso.

Para la identificación del colesterol (basada en los tiempos de retención de la fracción esterol libre sometida a cromatografía en fase gaseosa) se utilizaron columnas de vidrio rellenas con SE-30 al 1% sobre Gas Chrom Q (80-100 mallas). La temperatura de la columna fue de 211°C.

TABLA I

Contenido en lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos del músculo de la cola del cangrejo de río *A. pallipes*, expresado en porcentaje del extracto lipídico total.

	L. neutros	Fracción eluida con acetona	Fosfolípidos
Hembras	25,17	2,88	71,93
Machos	18,82	1,32	79,84



DISCUSION

El contenido en lípidos totales en el músculo de la cola, tanto de las hembras como de los machos objeto de este estudio, es ligeramente inferior al observado por Rhodes y Holdich<sup>13</sup> en el *A. pallipes* de procedencia inglesa, similar al observado por Perillo y Gianninoto<sup>12</sup> en el *A. fluviatilis* y unas 2-3 veces superior al observado en el *A. leptodactylus* por Dabrowski y col.<sup>5</sup>.

**TABLA II**

Valores alcanzados por los distintos lípidos neutros en el músculo de la cola del cangrejo *A. pallipes* expresados en términos de mg./100 gr. de músculo y en porcentaje del extracto lipídico total.

Componentes	mg/100 grs de músculo		% del extracto lipídico	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Glicéridos parciales	9,97	11,40	0,80	0,82
Colesterol libre	207,02	169,70	16,60	12,20
Acidos grasos libres	24,19	21,00	1,94	1,51
Ubiquinona y lípidos acompañantes	23,69	19,75	1,90	1,42
Esteres de esteroles e hidrocarburos	27,99	28,79	1,80	2,07
Triglicéridos	26,18	11,12	2,10	0,80

**TABLA III**

Valores alcanzados por los distintos fosfolípidos en el músculo de la cola del cangrejo *A. pallipes* expresados en porcentaje del fósforo lipídico total.

Componentes	% del fósforo lipídico	
	Hembras	Machos
Lisofosfatidilcolina	1,94	2,66
Esfingomielina	8,97	5,03
Fosfatidilcolina	45,66	45,57
Fosfatidilserina	9,20	8,18
Fosfatidiletanolamina	26,29	34,72
Cardiolipina	7,94	3,83

**TABLA IV**

Acidos grasos de distintos componentes de la fracción fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos libres de los cangrejos hembras de la especie *A. pallipes* (valores expresados en porcentaje sobre el total de ácidos grasos).

Acidos grasos	ES	FC	FE	C	Tr	AGL
14:0	1,45	0,45	tr	1,34	2,37	4,64
14:1	0,50	tr	tr	tr	0,59	tr
15:0	1,70	0,40	tr	0,58	1,35	2,47
16:0	28,37	19,77	6,93	11,10	16,40	31,46
16:1	8,20	6,11	3,74	4,71	9,91	6,20
17:0	1,19	1,08	1,38	2,35	1,08	2,47
17:1	1,04	1,11	0,93	2,02	2,29	1,67
18:0	9,30	5,21	2,61	6,68	6,75	15,15
18:1	28,20	27,06	23,56	31,31	36,60	19,90
18:2	4,10	5,32	4,79	4,42	7,81	2,37
18:3	0,34	1,87	1,75	1,38	1,89	0,82
20:1	0,76	1,43	1,54	2,82	1,21	0,61
20:3	0,51	1,15	1,68	3,78	1,29	0,71
20:4	4,10	5,10	8,03	4,63	1,70	2,22
20:5	9,75	21,67	35,29	16,15	4,21	4,90
NI	0,21	0,77	2,24	5,72	3,89	2,50
22:5	tr	0,13	0,66	tr	tr	0,49
22:6	tr	0,68	4,01	tr	tr	tr
Poliins.	19,00	35,92	56,11	30,36	16,90	11,51

**TABLA V**

Acidos grasos de distintos componentes de la fracción fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos libres de los cangrejos machos de la especie *A. pallipes* (valores expresados en porcentaje sobre el total de ácidos grasos).

ES: Esfingomielina; FC: Fosfatidilcolina; FE: Fosfatidiletanolamina; C: Cardiolipina; Tr: Triglicéridos; AGL: Acidos grasos libres; tr: trazas, cantidad inferior a un 0,2%.

Acidos grasos	ES	FC	FE	C	Tr	AGL
14:0	1,31	0,94	tr	2,27	3,06	4,56
14:1	0,38	0,28	tr	0,72	1,47	tr
15:0	1,06	0,40	tr	0,82	0,76	2,27
16:0	20,85	17,74	4,76	13,64	17,30	34,40
16:1	7,14	4,73	1,52	6,69	8,80	7,29
17:0	0,63	0,82	1,10	0,98	0,70	1,30
17:1	1,06	0,60	0,52	1,60	2,53	1,48
18:0	4,78	6,84	3,47	3,35	7,39	13,35
18:1	30,28	24,36	22,82	18,54	37,20	16,82
18:2	4,33	4,23	4,06	11,88	6,16	2,39
18:3	1,48	1,59	0,72	6,71	0,88	0,79
20:1	1,48	0,82	2,25	3,72	0,91	0,74
20:3	1,14	1,11	1,35	10,95	1,05	0,65
20:4	4,73	6,47	10,32	5,42	1,93	3,13
20:5	15,40	26,80	41,20	12,66	4,57	6,26
NI	1,33	1,32	tr	tr	4,43	1,79
22:5	0,27	0,24	0,64	tr	tr	tr
22:6	1,70	0,82	5,16	tr	tr	0,32
Poliins.	29,05	40,46	63,45	47,62	14,59	15,33



Nuestros datos son muy similares a los observados por diversos autores en crustáceos marinos (Krzyzewski y col. <sup>7</sup>; Krzyzewski y Stone <sup>8</sup>; Krzyzewski y col. <sup>9</sup>; Chalmers y col. <sup>1</sup>).

El contenido lipídico de las hembras es un 21% inferior al de los machos, lo que sugiere que parte de los lípidos musculares son utilizados para la formación del vitelo durante la época de la reproducción.

De los datos expuestos en la tabla I se pone de manifiesto que los lípidos más abundantes en el músculo de ambos sexos son los fosfolípidos, siendo más elevado el contenido de los machos (79%) que el de las hembras (71%). A pesar que no existen datos en la bibliografía consultada sobre lo que representa esta fracción en la totalidad de los lípidos en el *A. pallipes*, Mahrla y Zachar <sup>10</sup> han observado que en el sarcolema y en las membranas sarcotubulares del *A. fluviatilis* los fosfolípidos representan el 57,9 y el 71,8% respectivamente de los lípidos totales. Así mismo Krzyzewski y col. <sup>9</sup> han observado que los fosfolípidos representan aproximadamente un 75% de la grasa muscular de los crustáceos marinos *Cancer borealis*, *Cancer irroratus* y *Geryon quinque-dens*.

En cuanto al contenido en los distintos fosfolípidos, nuestros resultados son muy similares a los observados por Cossins <sup>3</sup> en el músculo abdominal del *A. pallipes*, y por Mahrla y Zachar <sup>10</sup> en las membranas sarcotubulares y en el sarcolema de *A. fluviatilis*. El mayor contenido de cardioplipina en nuestras muestras es la diferencia más apreciable con los resultados de los autores anteriormente citados.

De los distintos componentes que forman parte de la fracción lípidos neutros destaca la importancia del colesterol libre que representa un 12% (machos) y un 16% (hembras) del total de los lípidos y un 65% del total de lípidos neutros. Resultados similares han sido observados por Cossins <sup>3</sup> en el *A. pallipes* y por Zandee <sup>16</sup> en el *A. astacus*. Uno de los aspectos más importantes observados es la baja tasa de triglicéridos tanto en los machos como en las hembras, siendo imposible comparar nuestros resultados con los de otros autores dada la carencia de datos al respecto. Es muy probable que este bajo contenido se deba a la época de recogida de los cangrejos; en este sentido Zandee <sup>16</sup> ha observado que la cifra más baja de ácidos grasos totales se encuentra en el *A. astacus* en el mes de abril, mientras que la más alta se produce en el mes de octubre.

En cuanto a la composición en ácidos grasos de los distintos componentes lipídicos se observa un elevado porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), principalmente en los fosfolípidos más abundantes (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina), lo que confiere a la grasa total un grado de insaturación elevado, ya que dichos fosfolípidos representan más del 55% de la grasa total. Este elevado grado de insaturación es similar al observado por Cossins <sup>3</sup> en el *A. pallipes* y por Krzyzewski y col. <sup>7</sup>; Krzyzewski y Stone <sup>8</sup>; Krzyzewski y col. <sup>9</sup> en diversos crustáceos marinos. Se observa un mayor grado de insaturación en los fosfolípidos de los machos que de las hembras, hecho que podría deberse a la necesidad de las hembras en estos ácidos grasos poliinsaturados para la formación del vitelo.

La composición en ácidos grasos de cada uno de los componentes lipídicos es muy variable. Tres ácidos grasos (20:5, 18:1 y 16:0) representan más del 60% de la totalidad en prácticamente todos los componentes. El 20:5 es mayoritario en la fosfatidiletanolamina de ambos sexos y en la fosfatidilcolina de las hembras, mientras que el 18:1 es el más abundante en el resto de los fosfolípidos y en los triglicéridos. En los ácidos grasos libres predomina el 16:0. La composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina son muy similares a los observados por Cossins <sup>3</sup> en ambos fosfolípidos. Los valores por nosotros obtenidos en el resto de los compo-

mentos lipídicos no pueden ser comparados con los de otros autores por no existir datos al respecto.

En nuestro trabajo no se ha observado la elevada concentración del 22:6 que ha sido descrita por distintos investigadores en la grasa de diversos crustáceos marinos, donde se encuentra en concentraciones superiores al 10%.

## RESUMEN

Se ha estudiado en el músculo de la cola de cangrejos machos y hembras de la especie *A. pallipes* la composición lipídica y el contenido en ácidos grasos de distintas fracciones que los contienen.

El contenido lipídico de los machos es un 21% superior al de las hembras, debido principalmente a su mayor riqueza en fosfolípidos. Aunque existen diferencias en la composición en ácidos grasos en cada una de las fracciones, tres ácidos (20:5, 16:10 y 18:1) representan más del 60% de la totalidad de los mismos. El contenido en ácidos grasos poliinsaturados es mayor en los machos que en las hembras.

## LIPID COMPOSITION AND FATTY ACID CONTENT OF CRAYFISH *AUSTROPOTAMOBIVS PALLIPES* TAIL MUSCLE

### SUMMARY

The lipid composition and the fatty acids of pertinent fractions have been studied in the tail muscle of male and female of *A. pallipes* crayfish.

The lipid content of the male muscle is 21% higher than that in female muscle. Three fatty acids (20:5, 18:1 and 16:0) accounted for about 60% of the total fatty acids content. Male phospholipids contain larger amounts of polyunsaturated fatty acids than in female phospholipids.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a D. Aureliano Criado Olmos, inspector regional de ICONA (Valadolid) su autorización y colaboración en su calidad de ingeniero jefe del Servicio de Caza y Pesca de la Jefatura de Montes del ICONA de León, en la época en que la toma de muestras de este estudio se llevó a cabo.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) CHANMUGAN, P., DONOVAN, J., WHEELER, C.J., y HWANG, D.H. (1983). Differences in the lipid composition of fresh-water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and marine shrimp. *J. Food Sci.*, 48, 1.440-1.441.
- 2) CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. y WARNER, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Analyt. Chem.*, 28, 1.756-1.758.
- 3) COSSINS, A.R. (1976). Changes in muscle lipid composition and resistance adaptation to temperature en the freshwater crayfish, *Austropotamobius pallipes*. *Lipids*, 11 (4), 307-316.
- 4) DRABOWSKI, T., KOLAKOWSKI, E., WAWRESZUK, H. y CHOROSZUCHA, C., (1966). Zusammenesetzung und nahrwet des Krebsfleisches von *Astacus leptodactylus*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 129, 337-334.
- 5) DABROWSKI, T., KOLAKOWSKI, E. y BURZUNSKI, J. (1968). Studies on the nitrogen components composition of crayfish (*Astacus astacus*) meat as related to its nutritive value. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 15 145-152.
- 6) FOLCH, J., LEES, M. y SLOANE-STANLEY (1957). A simple procedure for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- 7) KRZECZKOWSKI, R.A., TENNEY, R.E. y KELLEY, C. (1971). Alaska king crab: fatty acid composition, carotenoid index and proximate analysis. *J. Food Sci.*, 36 604-606.
- 8) KRZECZKOWSKI, R.A. y STONE, F.E. (1974). Amino acid, fatty acid and proximate composition of snow crab (*Chionoecetes bairdi*). *J. Food. Sci.*, 47, 386-388.
- 9) KRZYNOWEK, J., WIGGIN, K. y DONNAHUE, P. (1982). Cholesterol and fatty acid content in the three species of crab faund in the Northwest Atlantic. *J. Food Sci.*, 47, 1.025-1.026.
- 10) MARHLA, Z. y ZACHAR, J. (1974). Lipid composition of isolate external and internal skeletal muscle membranes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47B, 493-502.
- 11) MOORE, P.R. y BAUMANN, C.A. (1952). Colorimetric determination of cholesterol and other sterols in skin. *J. Bio. Chem.*, 195, 615-621.
- 12) PERILLO, G. y GIANNINOTO, S.I., (1979). I crostacei d'acqua dolce nell'alimentazione umana. *Industrie Alimentari*, 18, 287-289.
- 13) RHODES, C.P. y HOLDICH, D.M. (1984). Lenght-weingt relationship, muscle production and proximate composition of the fresh water crayfish *Austropotamobius pallipes* (LEREBoullet). *Aquaculture*, 37, 107-123.
- 14) SCHLENK, P.R. y GELLERMAN, J.L. (1960). Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Analyt. Chem.*, 32, 1.412-1.414.
- 15) SHEATA, A.Y., DEMAN, J.M. y ALEXANDER, J.C. (1970). A simple and rapid method for the preparation of methyl esters of fats in miligram amounts for gas chromatography. *Can. Inst. Food. Tech.*, 3, 85-89.
- 16) ZANDEE, D.I. (1966). Metabolism in the crayfish *Astacus astacus* (L). III.-Absence of cholesterol synthesis. *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, 74, 435-441.