

## Revisiones

- » **Tratamiento de la neutropenia febril: filgrastim y pegfilgrastim.**  
Franco-Trigo L, Calleja-Hernández MA, García-Corpas JP.
- » **Actualización en terapéutica de anticuerpos monoclonales.**  
Pellicer-Corbí M, García-Ramos SE, García-Poza P, Ramos-Díaz F, Matoses-Asensio SM.

## Originales

- » **Evaluación y establecimiento de las especificaciones de calidad del pool de aceite de hígado de tiburón.**  
García Caridad M, Fernández M, Castiñeira M, Rodríguez M, Romero J, Márquez T.
- » **Design and evaluation of cedrela gum based microparticles of theophylline.**  
Odeniyi MA, Takeuchi H.
- » **Efectos de un programa de atención farmacéutica para pacientes con esclerosis múltiple sobre la adherencia al tratamiento inmunomodulador.**  
Sánchez Casanueva T, Tenías Burillo JM, Martínez-Martínez F, Valenzuela Gámez JC, Navarro Maestre E, Calleja Hernández MA.

## Originales Breves

- » **Actividad de albendazol y los aceites esenciales de menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente *Anisakis* tipo I.**  
Romero López MC, Navarro Moll MC, Martín Sánchez J, Valero López A.

## Artículos Especiales

- » **Importancia de la polietilenimina en biomedicina y sus aplicaciones en terapia génica.**  
López-Viota Gallardo M, Megías Iglesias R, Ruiz Martínez MA, Arias Mediano LJ.

## Evaluación y establecimiento de las especificaciones de calidad del pool de aceite de hígado de tiburón.

Margarita García Caridad<sup>1</sup>, Mirna Fernández<sup>2</sup>, Mirta Castiñeira<sup>2</sup>, Jorge Rodríguez<sup>1</sup>, Jacqueline Romero<sup>1</sup>, Tania Márquez<sup>3</sup>

1. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana (Cuba)

2. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Universidad de la Habana. (Cuba)

3. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). La Habana (Cuba).

### Original Paper Artículo Original

#### Correspondence/Correspondencia:

Dra C. Mirna Fernández Cervera  
Dpto. Tecnología y Control de los Medicamentos  
Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL),  
Universidad de la Habana.  
Calle 23 No. 21425 e/ 214 y 222,  
La Habana. Cuba.  
Telf.: 271-4075, 271-9534  
Email: mirnafc@ifal.uh.cu;  
mirnafc@yahoo.com

#### Competing interest / Conflicto de intereses:

Not declared

#### Fundings / Financiación:

Not declared

Received: 06.11.2013

Accepted: 28.12.2013

### RESUMEN

**Objetivo:** Calcular experimentalmente los límites de especificación de calidad para el pool de aceite de hígado de tiburones costeros de Cuba, a través del método de la K tabulada.

**Materiales y métodos:** Se realizó el análisis, a diez lotes consecutivos, de los parámetros peso específico, índice de refracción, acidez, saponificación, peróxido, materia insaponificable y contenido de vitamina A y ácido palmítico. Se evaluó la distribución y la aleatoriedad de los datos y posteriormente se calcularon los límites de especificación de calidad por el método de la K tabulada, para un 95% de confianza.

**Resultados:** Los valores obtenidos en la evaluación de los parámetros físico - químicos demostraron la calidad del aceite, cumpliendo la distribución normal y aleatoriedad de los datos, con valores de probabilidad superiores a 0,05.

**Conclusiones:** Empleando el método de la K tabulada se establecieron límites de especificación unilaterales para el índice de acidez, contenido de vitamina A y ácido palmítico, mientras que para el peso específico, índices de refracción, saponificación, peróxido y materia insaponificable fueron bilaterales. Los lotes del pool de aceite hígado de tiburón poseen adecuada calidad, considerando los resultados de los parámetros evaluados. Se demostró que existe un alto grado de conformidad en las propiedades entre los lotes evaluados.

**PALABRAS CLAVE:** Ácido palmítico, Especificaciones de calidad, Método de K tabulada, Pool de Aceite de hígado de tiburón, Vitamina A.

### ABSTRACT

**Aims:** The objective was to experimentally determine the quality specification limits for the pool of shark-liver oil from Cuban coastal sharks, by using the tabulated K method.

**Materials and methods:** Using ten consecutive lots, an analysis was carried out of parameters such as specific weight, refractive indexes, acidity, saponification, peroxide, unsaponifiable matter, and vitamin A and palmitic acid content. The distribution and randomness of the data was assessed. Then, the quality specification limits were calculated, for a 95% degree of confidence.

**Results:** The values obtained in the assessment of physical and chemical parameters demonstrated the quality of the oil, by adhering to the normal distribution and randomness of data, with probability values above 0,05.

**Conclusions:** Using the tabulated K method were established unilateral quality specification limits to index of acidity and vitamin A and palmitic acid content, while to specific weight, refractive indexes, saponification, peroxide and unsaponifiable matter were bilateral. The assessed lots of pool shark-liver oil have adequate quality, considering the results of the evaluated parameters. The properties of the assessed lots showed a high degree of compliance.

**KEY WORDS:** Method of K tabulated, Palmitic acid, Quality specifications, Shark liver oil pool, Vitamin A

## INTRODUCCIÓN

El control de calidad es una parte de la gestión de la calidad orientada al cumplimiento de los requisitos de la calidad. El concepto central de tal actividad es la especificación, que se define como el conjunto de requisitos con los cuales los productos o materiales empleados deben estar conformes sirviendo como base para la evaluación de su calidad<sup>1</sup>.

Las especificaciones de farmacopea son las más conocidas y aceptadas en los medicamentos. Según la propiedad que se evalúa, existen las especificaciones por atributo o por variable. En estas últimas se asigna un valor numérico al realizar una determinación experimental aplicando un ensayo. Las especificaciones por variable se clasifican en unilaterales o bilaterales.

Una especificación debe ser consistente con el objetivo primario del producto y debe garantizar la consistencia de la fabricación sin entorpecerla por ser innecesariamente estricta<sup>2</sup>.

El método más empleado para el cálculo experimental de las especificaciones de calidad por variable es el propuesto por Bowker. Para ello se requieren como mínimo 10 lotes industriales consecutivos lo cual impide que se aplique en las etapas de desarrollo de nuevos productos<sup>3,4</sup>. Teniendo en cuenta las limitaciones y desventajas del método de Bowker, se aplica también el método de la K tabulada<sup>5</sup>. El método de Montgomery, se trata en esencia del mismo método, simplificando el engorroso trabajo matemático que implica el método de Bowker.

Para los aceites de pescado existen los requerimientos relacionados con las especies que dan origen al producto como peso específico, índices de yodo, refracción, saponificación, porcentaje de materia insaponificable y densidad. También existen los asociados con las afectaciones que el proceso de obtención pueda causar sobre el aceite como los índices de acidez y peróxido<sup>6</sup>. Además, se incluye la cuantificación de vitaminas y ácidos grasos.

En la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 35, 2012)<sup>6</sup> aparecen las monografías del aceite de hígado de bacalao y de aceites de pescado con omega -3. Estas incluyen los límites de especificación de calidad (LEC) vigentes para la liberación de los lotes.

El aceite de hígado de tiburón se considera un estimulante del sistema inmune en humanos con trastornos autoinmunes, alergias, cáncer y VIH, es empleado para combatir infecciones virales y como antiséptico<sup>7,8</sup>. El hígado de los tiburones es rico en aceite<sup>9</sup>, siendo los ácidos poliinsaturados beneficiosos en la prevención de enfermedades cardíacas<sup>10-12</sup>. También son fuente de

vitaminas liposolubles como A, D y E<sup>13</sup>. Estudios previos han demostrado la presencia de las vitaminas A, D y E en el pool de aceite de tiburones costeros de Cuba, resultando la vitamina A su componente mayoritario<sup>14-16</sup>, así como diferentes ácidos grasos<sup>17-19</sup>.

El hecho de que el aceite de hígado de tiburón se considere una materia prima de origen natural que no se incluye en farmacopea alguna, y que podría incorporarse en formulaciones farmacéuticas, justifica la necesidad de calcular y establecer sus índices de calidad.

El presente estudio tiene como objetivo calcular experimentalmente los límites de especificación de calidad para el pool de aceite de hígado de tiburones costeros de Cuba, a través del método de la K tabulada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Productos químicos y reactivos*

El pool de aceite fue obtenido por el Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP, Cuba). La sustancia de referencia química de vitamina A acetato fue suministrada por el Grupo de Sustancias de referencias del CIDEM, Cuba.

### *Determinación de los parámetros físico – químicos*

La determinación de los parámetros físico –químicos se realizó como se describe en la USP 35, métodos generales para grasas y aceites fijos<sup>6</sup>. Todos los resultados se expresaron sobre la base de tres réplicas.

### *Características organolépticas*

A partir de la inspección visual a todas las muestras de aceite se les evaluó el color y olor.

### *Peso específico*

El peso específico de la muestra fue determinando a través del método del picnómetro.

### *Índice de refracción*

Para el análisis de las muestras en el refractómetro (Carl Zeiss Jena, Alemania) se depositó una gota sobre la superficie del prisma de medición, evitando la formación de burbujas.

### *Índices de acidez, saponificación y peróxido*

Fueron determinados según lo establecido en la USP 35, métodos generales para grasas y aceites fijos<sup>6</sup>. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### *Materia insaponificable*

Es la determinación de aquellas sustancias que no son saponificables por medio de hidróxidos alcalinos, pero que

son solubles en disolventes de grasas ordinarios, y de los productos de saponificación que son solubles en dichos disolventes.

#### *Determinación del contenido de vitamina A por cromatografía líquida de alta resolución*

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron<sup>15</sup>: columna Lichrosorb RP-18 (5 µm) 250 - 4 mm (Merck, Alemania), fase móvil metanol - agua (90:10) v/v, velocidad de flujo de 1,0 mL/min y longitud de onda de 325 nm. El procedimiento fue realizado en un cromatógrafo líquido de alta resolución (Merck, Alemania); integrador Shimadzu modelo CRD 8AV; detector UV KANUER y bomba KANUER K-1001.

La preparación de la sustancia de referencia se realizó pesando con exactitud 15,1 mg de patrón de vitamina A acetato, disolviéndose en 10 mL de solución de hidróxido de potasio metanólico (KOH met) 0,5 N en un frasco volumétrico de 25 mL. La disolución resultante se enrasó con solución de KOH met.

Se pesó un 1 g del pool aceite de hígado de tiburón, se le adicionaron 35 mL de etanol absoluto, 10 mL de KOH al 50 % y 25 mg de hidroquinona, los que se calentaron a reflujo 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 40 mL de agua destilada y 50 mL de una mezcla de éter dietílico - n hexano (1:1). A la fase acuosa se le realizaron cinco extracciones, tomándose únicamente la fase orgánica, lavando cuatro veces con 50 mL de agua acidulada. Se adicionaron 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, concentrando a sequedad en un rotoevaporador Buchi 461 RE 101 (Suiza). Se redisolvió en 25 mL de solución de KOH Met 0,5 N, inyectándose 20 µL.

#### *Determinación del contenido de ácido palmítico por cromatografía gaseosa*

Se empleó un cromatógrafo de gases (CHROMPACK CP 9002, Holanda), una columna CHROMPACK (sílica 25 M x 0.32 MMID) CP - WAX 57 CB DF: 1.2, integrador (SHIMADZU C - R8A, Japón) y generador de gas 9150 (Packard, Holanda). Las condiciones cromatográficas fueron<sup>19</sup>: temperatura del inyector y detector: 210°C, temperatura del horno: 185 °C y volumen de inyección 1µL.

Para la preparación de la mezcla metilante se mezclaron 150 mL de metanol con 70 mL de tolueno. Se adicionó lentamente y con agitación suave 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Para la preparación de la muestra de ensayo se pesaron exactamente 50 mg. En un balón de 50 mL se adicionaron 10 mL de mezcla metilante y se calentó a reflujo durante 2 h a 80 °C. Se dejó enfriar y se trasvasó a un embudo separador con ayuda de dos porciones de 2 mL de mezcla

metilante. Se lavó con 10 mL de solución saturada de NaCl transvasando hacia el embudo separador. Se adicionaron 15 mL de éter dietílico agitando 1 min. Se separó la fase acuosa y la orgánica se vertió en un erlenmeyer de 100 mL. Se extrajo nuevamente la fase acuosa con dos porciones de 15 mL de éter dietílico. Los extractos etéreos unificados se lavaron con porciones de 10 mL de solución saturada de NaCl hasta que el pH del residuo acuoso fuera de 7. Al extracto etéreo lavado se le adicionó 1 g de sulfato de sodio anhidro, se agitó brevemente y se trasvasó cuantitativamente a un frasco de corazón. Se hicieron lavados con porciones de 2 mL de éter, se incorporaron al extracto etéreo y se evaporó en un rotoevaporador. El residuo se reconstituyó en 2 mL de n-hexano y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

#### *Cálculo de los límites de especificación de calidad del pool de aceite de hígado de tiburón*

Para el cálculo de los LEC se utilizaron los resultados de los parámetros físico-químicos, para 10 lotes. Los lotes cumplieron el requisito de ser producidos de forma consecutiva durante Octubre de 2006 a Octubre de 2009.

Se aplicó la Prueba de Anderson - Darling con ayuda del programa MINITAB Release 14 Statistical Software, para comprobar la normalidad y aleatoriedad de los datos. Verificado que los datos cumplieron la prueba de distribución normal, se realizó el cálculo de los límites para el peso específico, índices de refracción, acidez, saponificación, peróxido, materia insaponificable, contenido de vitamina A y ácido palmítico, según la expresión<sup>3</sup>:

$$LEC = X \pm KS$$

Donde: X es el promedio de las determinaciones, K es el valor tabulado teniendo en cuenta el tamaño del lote y el nivel de confianza, S es la desviación típica estimada y LEC es el límite de especificación de calidad. Se utilizó un valor de K = 2.537 y un nivel de confianza del 95 %.

## RESULTADOS

El análisis organoléptico de los lotes de pool de aceite demostró que las muestras presentaron un color amarillo intenso con ligero olor a pescado, característica que se corresponde con la de otros aceites de pescado<sup>12</sup>.

Los resultados del análisis de los parámetros físico-químicos se muestran en la Tabla 1 y en la Tabla 2 los contenidos de vitamina A y ácido palmítico de cada lote analizado.

En la Tabla 3 se presenta el resumen estadístico del ajuste a la distribución normal y aleatoriedad de los resultados, mientras que los LEC calculados a través del método de Bowker se resumen en la Tabla 4.

Tabla 1. Parámetros físico-químicos del pool de aceite de hígado de tiburón.

Lote	Índice de refracción	Índice de acidez (mg KOH/g muestra)	Índice de saponificación (mg KOH/g muestra)	Índice de peróxido (meq oxígeno/g muestra)	Materia insaponificable (%)	Peso específico (g/mL)
1	1,4601±0,0001	0,23±0,01	166,31±0,06	4,86±0,07	2,48±0,04	1,0910±0,0001
2	1,4656±0,0000	0,20±0,05	186,07±0,08	4,89±0,05	2,49±0,02	0,9138±0,0002
3	1,4645±0,0002	0,82±0,04	186,99±0,07	5,80±0,02	2,90±0,07	1,0542±0,0005
4	1,4640±0,0001	0,21±0,08	180,07±0,03	3,14±0,04	2,60±0,05	1,0237±0,0003
5	1,4610±0,0004	1,03±0,02	166,31±0,06	4,80±0,06	2,72±0,03	0,9984±0,0002
6	1,4673±0,0000	1,14±0,05	169,27±0,07	4,40±0,08	3,95±0,08	0,9513±0,0008
7	1,4597±0,0001	0,65±0,03	150,67±0,06	3,97±0,09	3,21±0,05	0,9641±0,0004
8	1,4699±0,0002	0,85±0,06	140,59±0,09	5,57±0,07	2,26±0,04	1,0287±0,0002
9	1,4681±0,0001	0,45±0,07	190,56±0,05	5,67±0,03	2,89±0,07	0,9765±0,0005
10	1,4627±0,0001	0,52±0,08	187,38±0,08	4,59±0,04	3,58±0,06	1,0387±0,0003

Tabla 2. Contenido de vitamina A y ácido palmítico en el pool de aceite de hígado de tiburón.

Lote	Vitamina A (µg/g aceite)	Ácido palmítico (%)
1	245,58±0,25	31,52±0,20
2	202,78±0,30	29,77±0,11
3	305,26±0,09	39,56±0,21
4	399,78±0,12	21,54±0,04
5	354,62±0,40	32,79±0,09
6	143,17±0,30	28,46±0,37
7	215,46±0,10	40,56±0,23
8	135,68±0,09	20,15±0,40
9	364,48±0,25	20,89±0,10
10	287,65±0,30	27,56±0,09

Tabla 4. Límites de especificación de calidad para el pool de aceite de hígado de tiburón.

Propiedad	LEC
Peso específico (g/mL)	0,8688 - 1,1392
Índice de refracción	1,4557 - 1,4729
Índice de acidez (mg KOH/g muestra)	No más de 1,48
Índice de saponificación (mg KOH/g muestra)	129,47 - 215,37
Índice de peróxido (meq oxígeno/g muestra)	2,69 - 6,84
Materia insaponificable (%)	1,56 - 4,25
Vitamina A (µg/g)	No menos de 31,49 equivalente a 104 UI/g
Ácido palmítico (%)	No menos de 10,99

Tabla 3. Análisis de la normalidad y aleatoriedad.

Parámetros físicos-químicos	Prueba de normalidad p-valor	Prueba de aleatoriedad p-valor			
		agrupaciones	mezclas	tendencias	oscilaciones
Peso específico	0,963	0,749	0,251	0,391	0,608
Índice de refracción	0,886	0,748	0,251	0,391	0,608
Índice de acidez	0,529	0,251	0,749	0,916	0,083
Índice de saponificación	0,205	0,090	0,910	0,391	0,609
Índice de peróxido	0,546	0,089	0,910	0,391	0,608
Materia insaponificable	0,347	0,500	0,500	0,134	0,866
Vitamina A	0,814	0,089	0,910	0,709	0,290
Ácido palmítico	0,514	0,500	0,500	0,916	0,083

## DISCUSIÓN

Los valores de peso específico, índices de acidez, peróxido y saponificación no muestran diferencias con respecto a los reportados por Adeniyi y Bawa<sup>20</sup>, para otras especies de pescado. Estos autores establecieron que la densidad específica debía ser superior a 0,907; el índice de refracción superior a 1,42; la acidez inferior a 5; peróxido inferior a 10 y el de saponificación entre 165 y 195. Al comparar los resultados obtenidos para el índice de acidez y de materia insaponificable, con las especificaciones establecidas por la UPS 35<sup>6</sup>, se puede observar que fueron inferiores a 3 y

superiores a 1,5 %, respectivamente, sin embargo para el peróxido no todos los lotes resultaron superiores a 5.

En cuanto al contenido de vitamina A, considerando que 1 mg de vitamina A equivale a 3333 UI de vitamina A<sup>6</sup>, los resultados obtenidos están entre 450 y 1350 UI. Estos valores se corresponden con los reportados para otras muestras de igual aceite<sup>14,15</sup>. Por lo tanto, existe conformidad con lo establecido oficialmente<sup>6</sup> para aceites de pescado. No obstante, la comparación de los resultados

se hace difícil, más aún, cuando se trabajan diferentes fuentes de obtención del aceite, entiéndase tipo de especie y localización geográfica, y diversos también son los procedimientos para su evaluación.

Los ácidos grasos presentes en el hígado de los tiburones pueden variar en dependencia de la localización geográfica del tiburón, y posiblemente también de la dieta y período del año<sup>13,21</sup>.

Los porcentajes de ácido palmítico, sobre el total de ácidos grasos, estuvieron entre un 20 y 40 %, siendo este ácido graso el predominante<sup>17-19</sup>.

Diversidad de trabajos<sup>9,13,17,21-26</sup> han demostrado la dependencia del contenido de vitaminas y ácidos grasos de los aceites de pescado con las especies empleadas en su obtención, además de los métodos y condiciones experimentales en su determinación, por lo que las comparaciones resultan difíciles.

Se demostró que existe un alto grado de conformidad en las propiedades entre los lotes analizados. Los resultados obtenidos en los índices de acidez, saponificación, materia insaponificable e índice de peróxido demuestran que el pool de aceite de hígado de tiburones costeros de Cuba posee adecuada calidad, sin evidencias de posibles procesos degradativos, como influencia del proceso de extracción del aceite.

Teniendo en cuenta que el aceite de hígado de tiburón es una materia prima de origen natural, que no aparece en farmacopea alguna, y que hasta el momento no se han calculado los LEC a partir de resultados experimentales obtenidos a través de procesos productivos, estos fueron determinados experimentalmente a través del método de la K tabulada, con lotes consecutivos obtenidos bajo condiciones similares.

Los valores obtenidos de probabilidad ( $p > 0,05$ ) demostraron la distribución normal de los resultados y su aleatoriedad. Para el índice de acidez, contenido de vitamina A y ácido palmítico se establecieron especificaciones unilaterales, en el primer caso basándose en un límite superior y en los otros como límites inferiores. Para los contenidos de vitamina A y ácido palmítico se aprecia que los límites calculados fueron superados ampliamente, mayores que 31,4 µg/g de vitamina A y 10,99 % de ácido palmítico, lo que evidentemente significará un producto con potencialidades farmacéuticas y cosméticas, considerando su composición en vitaminas y ácidos grasos saturados.

Para el caso del peso específico, índice de refracción, saponificación, peróxido y materia insaponificable se establecieron límites bilaterales. Para el peso específico y el

índice de refracción se obtuvieron los límites más estrechos, lo cual es lógico considerando los métodos empleados en sus determinaciones, siendo indicativos de su pureza.

Se establecieron por vez primera, a partir de datos experimentales, LEC para el pool de aceite de hígado de tiburones costeros de Cuba, aspecto no reportado con anterioridad. Los límites aquí establecidos contribuirán a asegurar, con un alto grado de confianza, que cualquier unidad del producto cumplirá con los criterios correspondientes.

Es importante considerar que al establecerse estos límites, se necesitará evaluar su comportamiento con nuevos lotes, y hacer un seguimiento, lo cual será favorable para analizar la estabilidad de esta materia prima natural.

## CONCLUSIÓN

A través del método de la K tabulada se calcularon experimentalmente los límites de especificación de calidad para el peso específico, índices de refracción, acidez, saponificación, peróxido, materia insaponificable, contenido de vitamina A y ácido palmítico del pool de aceite de hígado de tiburones costeros de Cuba. Los resultados obtenidos demuestran que el pool de aceite de hígado de tiburones costeros de Cuba posee adecuada calidad, teniendo como componentes mayoritarios la vitamina A y el ácido palmítico. Se demostró que existe un alto grado de conformidad en las propiedades entre los lotes evaluados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Regulación No. 16-2006. Directrices de Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. CECMED, Cuba. 2006;195-218.
2. ISP. Propuesta de guía sobre especificaciones de producto terminado (FPT). Instituto de Salud. República de Chile. Departamento Control Nacional. Subdepartamento Registro. 2000.
3. Espinosa JM. Normalización, metrología y control de la calidad. Ed. Félix Varela. La Habana. 2008.
4. Carrillo D, González AF, Rodríguez J, Suárez Y, Fernández M, Veliz J. Evaluation and establishment of new quality specification to immunoglobulin and albumin. *Lat Am J Pharm.* 2011;30(6):1045-50.
5. Montgomery DC. Introduction to statistical quality control. John Wiley & Sons Third ed. 1996.
6. United State Pharmacopeia (USP 35). United States Pharmacopoeia (USP 35/2012 NF 30). US Pharmacopoeia Convention, Inc. Washington DC. 2012.
7. Pugliese PT, Jordan K, Cederberg H, Brohult, J. Some

- biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. *J Altern Complement Med.* 1998;4:87-99.
8. Rabasco Alvarez AM, González Rodríguez ML. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites.* 2000;51:74-96.
  9. Wetherbee BM, Nichols PD. Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from the Chatham Rise, New Zealand. *Comp Biochem Physiol.* 2000;125B:511-521.
  10. al Makdessi S, Sweidan H, Jacob R. N-3 versus n-6 fatty acid incorporation into the phospholipids of rat heart sarcolemma. A comparative study of four different oil diets. *J Am Coll Cardiol.* 1994;26:23-29.
  11. Murphy MG, Wright V, Ackman RG, Horackova M. Diets enriched in menhaden fish oil, seal oil, or shark liver oil has distinct effects on the lipid and fatty-acid composition of guinea pig heart. *Mol Cell Biochem.* 1997;177:257-269.
  12. Nassif-Hadad A, Meriño-Ibarra E. Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado. Lo bueno y lo malo. *Rev Cuba Med.* 2003;42(2):49 - 55.
  13. Nichols PD, Rayner M, Stevens J. In: A pilot investigation on Northern Australian shark liver oils: Characterization and value-adding. FRDC Project Report 99/369, CSIRO Marine Research and Fisheries Research and Development Corporation, Australia. 2001.
  14. Bécquer C, Castiñeira M, Santa Ana D, Sánchez M. Validación de un método cromatográfico (CLAR) para la determinación de vitamina A en aceite de hígado de tiburón. *Revista CENIC. Ciencias Químicas.* 1999;30(3):164 - 167.
  15. García CM, Castiñeira M, Fernández M, Romero JA, Collazo S, Mancebo B, Torres L. Determinación por CLAR de las vitaminas A y D en aceite de hígado de tiburón. *Lat Am J Pharm.* 2008;27(3):419-424.
  16. García CM, Castiñeira M, Fernández M, Romero JA, Collazo S, Arcia A. Determinación por CLAR de la vitamina E en el pool de aceite de hígado de tiburón. *Lat Am J Pharm.* 2008;27(5):771-775.
  17. García E, Gutiérrez S, Nolasco H, Carreón L, Arjona O. Lipid composition of shark liver oil: effects of emulsifying and microencapsulation processes. *Eur Food Res Technol.* 2005:697-701.
  18. Cruz- Nuñez G, Palmadóttir H, Jónsdóttir R, García E. Quality of cuban shark liver oil. Comparison with icelandic cod liver oil. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria.* 2009;10(2):1-10.
  19. García E, Gutiérrez S, Nolasco H. Caracterización de lípidos en aceites de hígados de tiburones costeros de Cuba. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria.* 2005;VI (8):1-8.
  20. Adeniyi OD, Baw AA. Mackerel (*Scomber Scrombrus*) oil extraction and evaluation as raw materials for industrial utilization. *Leonardo J Sci.* 2006;8:33-42.
  21. Nichols PD, Bakes MJ, Elliott NG. Oils rich in docosahexaenoic acid in livers of sharks from temperate Australian waters. *J Mar Freshwater Res.* 1998;49:763-767.
  22. Banjo O. Composition and properties of shark liver oil and liver residue. *J Food Technol.* 1979;14:107- 113.
  23. Peyronel D, Artaud J, Iatrides MC, Rancurel P, Chevalier JL. Fatty acid and squalene compositions of *Centrophorus spp* egg and liver oils in relation to age. *Lipids.* 1984;19:643-648.
  24. Navarro G, Pacheco R, Vallejo B, Ramirez J, Bolaños A. Lipid composition of the liver oil of shark species from the Caribbean and Gulf of California waters. *J Food Compos Anal.* 2000;13:791-798.
  25. Nichols PD, Mooney BD, Elliott NG. Unusually high levels of non-saponifiable lipids in the fishes escolar and rudderfish: Identification by gas and thin-layer chromatography. *J Chromatog.* 2001;936:183-191.
  26. Bruce D, Jeremy C. The liver lipid fatty acid profiles of seven Indian Ocean shark species. *Fish Physiol Biochem.* 2002;26:171-175.