

## Comparación de la Composición Lipídica de las Semillas de Girasol, Maní y Ajonjolí Usando Técnicas Multivariadas

J. Méndez<sup>1</sup>, A. Malavé<sup>2</sup>, H. D'Armas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomía, Escuela de Ingeniería Agronómica, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias, Unidad de Estudios Básicos, Núcleo de Monagas, Universidad de Oriente, Avenida Universidad, Campus Los Guaritos, Maturín, Monagas 6201, Venezuela y <sup>3</sup>Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Avenida Universidad, Cumaná, Sucre 6101, Venezuela. E-mail: jmendezn@cantv.net

### Resumen

*El objetivo de este trabajo fue comparar mediante técnicas multivariadas tres cultivares de tres cultivos oleaginosos de importancia en Venezuela. Se utilizaron los cultivares experimentales de girasol, B-5, B-9 y B-16 y ajonjolí AB-1, AB-2 y AB-3 y los cultivares de maní Rojo, Rosado y Americano Chico. Los lípidos se extrajeron con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v). Para los análisis de cromatografía de capa fina con detector de ionización en llama (TLC/FID) se utilizaron chromads SIII. La cromatografía de gas-líquido se empleó para determinar la composición de ácidos grasos. Los ésteres metílicos correspondientes a cada muestra se analizaron en un cromatógrafo Varian serie 3300, equipado con una columna capilar de 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno. Se usó nitrógeno como gas de arrastre a un flujo de 38 ml/min. La separación se realizó en las siguientes condiciones: Temperatura del inyector y temperatura del detector: 300 °C y temperatura de la columna: 200 °C. Se determinaron el porcentaje de lípidos totales, la composición lipídica, viz, triacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfolípidos y la composición de ácidos grasos, viz, palmítico, araquídico, oleico, linoleico, behénico, linoléico y eicosenoico. Se realizaron los análisis de componentes principales y de agrupamiento (UPGMA con distancia euclideana y método de Ward). Para el análisis de componentes principales los dos primeros componentes explicaron el 43,92 y 39,79%, respectivamente para un total de 83,71%. Los tres cultivares de cada cultivo estuvieron más relacionados entre sí, los caracteres más importantes para definir estos grupos fueron el ácido palmítico y el ácido oleico., mientras que los caracteres menos importantes fueron el ácido  $\alpha$ -linoléico y los fosfolípidos. Resultados algo diferentes mostraron los análisis de agrupamiento. Se formaron cinco grupos, el primero compuesto por dos cultivares de maní Rojo y Rosado; el segundo por los tres cultivares de ajonjolí; el tercero por los cultivares de girasol B-5 y B-16, el cuarto por B-9 y el último por Americano Chico. En conclusión, las técnicas multivariadas y en especial la de componentes principales pueden ser usadas para estudiar las relaciones entre lípidos totales, composición lipídica y ácidos grasos de manera de identificar grupos similares en cuanto a estas características.*

**Palabras Clave:** Cultivos oleaginosos, análisis cromatográfico, análisis multivariado.

### Abstract

*The objective of this work was to compare by means of multivariate methodologies three cultivars of three oilseed crops of importance in Venezuela. The experimental cultivars of sunflower were B-5, B-9 and B-16; sesame cultivars were AB-1, AB-2 and AB-3 and peanut ones were Rojo, Rosado y Americano Chico. The lipids were extracted with a chloroform-methanol mixture (2:1 v/v). For the analyses of chromatography of fine layer with detecting of ionization in flame (TLC/FID) chromads SIII were used. The chromatography of gas-liquid was used to determine the composition of fatty acids. The methylic esters corresponding to each sample were analyzed in a chromatograph Varian series 3300, equipped with a capillary column of 30 m long and 0.25 mm of internal diameter. Nitrogen was used as sweeping gas in a flow of 38 ml/min. Separation was carried out under the following conditions: Temperature of the injector and temperature of the detector: 300 °C and temperature of the column: 200 °C. The characters determined were: percentage of total lipids, lipid composition, viz, triacilglycerols, diacilglycerols, phospolipids and the composition of fatty acids, viz, palmitic, araquidic, oleic, linoleic, behenic, linolenic and eicosenoic acids. The principal components analysis and cluster analysis were carried out (UPGMA with Euclidean distance and method of Ward). For the analysis of principal components the first two components explained the 43.92 and 39.79%, respectively for a total of 83.71%. The three cultivars of each crop were more related to each other, the most important characters to define these groups were palmitic acid and oleic acid, while the less important characters were  $\alpha$ -linolenic acid and phospholipids. Slight results were obtained for cluster analysis. Five groups were formed, the first group was formed by Rojo and Rosado peanut cultivars; the second one was formed by the three sesame cultivars; the third cluster was formed by sunflower cultivars B-5 y B-16,*

Recibido: Junio, 2009

Aceptado: Agosto, 2009

*sunflower B-9 belonged to the fourth cluster and Americano Chico was in the fifth cluster. In conclusion, the multivariate methods and especially principal component analysis can be used to study the relationships among total lipids, lipid composition and fatty acids in order to identifying similar groups for oilseed characteristics.*

**Key words:** *Oil crops, chromatographic analysis, multivariate analysis.*

## 1. Introducción

Para el año 2007, la superficie cosechada de los principales cultivos oleaginosos fue: ajonjolí 40.549 ha, seguido de la soya con 37,060 ha, palma aceitera con 26.713 ha, coco con 17.498 ha, algodón con 14.491 ha, girasol 12.517 ha y maní con 350 ha, pero esto difiere en cuanto al volumen de producción, ocupando el primer lugar la palma aceitera con 327.750 tm, seguido del coco con 190.668 tm, soya 60.181 tm, algodón 17,982 tm, ajonjolí con 17,020, girasol 15,514 y maní con 1094 tm [1]. Esto indica que los principales cultivos oleaginosos son del tipo perenne (palma aceitera y coco) cuyos aceites son de inferior calidad desde el punto de vista nutricional.

La importancia de datos de composición de alimentos ha sido reconocida por la comunidad científica internacional. Una vida saludable depende de los nutrimentos esenciales que generalmente son aportados por ellos. Este es el caso de los ácidos grasos esenciales, que por su naturaleza deben provenir de fuente exógena. Conocer el perfil de ácidos grasos de los lípidos de uso común es una necesidad particularmente cuando se trata de estudios epidemiológicos [2].

La composición lipídica y de los ácidos grasos es muy variada, es decir, se determinan muchas características que algunas veces dificultan el análisis de los datos. Las técnicas multivariadas permiten reducir el número de variables a estudiar. Según Urbina [3] el objetivo del análisis de componentes principales es reducir el número de variables (columnas) en una matriz de datos, para realizar esto, nuevas variables son generadas de las variables originales, las nuevas variables se denominan puntuaciones y ellas se estiman junto con un grupo de vectores llamadas cargas, las cargas miden la relación entre las puntuaciones y las variables originales, las puntuaciones se calculan sucesivamente para retener la mayor fracción de la varianza posible de las observaciones con cada nueva puntuación explicando menos varianza que la puntuación previa, por lo tanto, la última puntuación usualmente explica una fracción insignificante de la varianza, la cual es usualmente asumida como ruido u otras perturbaciones en el proceso de recolección de los datos y la primera puntuación retiene la mayor proporción de la varianza. Esto hace posible ignorar las últimas puntuaciones cuando se realizan los cálculos.

Por otra parte, Urbina [3] indicó que en contraste con el análisis de los componentes principales, el objetivo del análisis de agrupamiento

jerárquico es reducir el número de hileras en una matriz de datos, mediante el agrupamiento de las observaciones similares en racimos. El adjetivo "jerárquico" significa que el proceso de agrupamiento trabaja secuencialmente, comenzando con todas las observaciones clasificadas como racimos individuales y terminando cuando todas las observaciones son agrupadas en el mismo racimo. No hay una forma estándar para determinar el nivel de agrupamiento. El científico tiene que decidir cual nivel de agrupamiento se adapta mejor para la aplicación, manteniendo en mente las características naturales y el conocimiento previo acerca de los datos, para comenzar con un análisis de agrupamiento jerárquico, una nueva matriz se genera a partir de los datos originales, la nueva matriz se llama matriz de disimilaridad, esta matriz mide las diferencias entre las observaciones en términos de las variables.

El objetivo de este trabajo fue comparar mediante técnicas multivariadas (análisis de componentes principales y análisis de agrupamiento) cultivares de tres cultivos oleaginosos de importancia en Venezuela de acuerdo al porcentaje de lípidos totales, composición lipídica y perfil de ácidos grasos.

## 2. Materiales y Métodos

Las semillas estudiadas en el presente trabajo fueron colectadas en la Estación Experimental de Sabana de la UDO, Jusepín-Monagas. Se utilizaron los cultivares experimentales de girasol, B-5, B-9 y B-16 y ajonjolí AB-1, AB-2 y AB-3 y los cultivares de maní Rojo, Rosado y Americano.

Para llevar a cabo la extracción de los lípidos, las muestras se trataron con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) siguiendo el método reportado por Overturf y Dryer [4]. Se tomaron porciones aproximadas de dos gramos por cada 20 ml de mezcla de solventes. La muestra con la mezcla se sometió a agitación magnética por espacio de media hora, se filtró y el residuo fue lavado con 10 ml más de mezcla.

El filtrado que contenía los lípidos totales, se pasó a un embudo separador y se le agregaron ocho ml de solución de NaCl 0,05 N, se agitó varias veces y se guardó bajo refrigeración durante doce horas. A continuación se separó la capa orgánica y se evaporó la mezcla de solventes en un rotaevaporador (temperatura de evaporación de 38 °C para el baño de María y una presión aproximada de 11 mbar generada por la bomba de vacío), luego a la fracción lipídica obtenida se le burbujeó nitrógeno para evitar la

oxidación y se pesó para determinar la cantidad de lípidos totales y finalmente se refrigeró. Para los análisis de cromatografía de capa fina con detector de ionización en llama (TLC/FID) se utilizó un analizador Iatroscan MK-5, operando junto un integrador Hewlett Packard 3390A. El detector de ionización en llama se operó a una velocidad de flujo de hidrógeno de 160 ml/min y a una velocidad de flujo de aire de 2000 ml/min. La velocidad de análisis se fijó a 60 s/varilla. La identificación de los diferentes lípidos se hizo en base a los tiempos de retención de patrones comerciales y se expresaron como un porcentaje del total de los lípidos. La cromatografía de gas-líquido se empleó para determinar la composición de ácidos grasos. Para ello cada extracto lipídico fue previamente saponificado, seguido por la metilación de los ácidos grasos utilizando el método de Brockerhoff [5]. Los ésteres metílicos correspondientes a cada muestra se analizaron en un cromatógrafo Varian serie 3300, equipado con una columna capilar de 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno. Se usó nitrógeno como gas de arrastre a un flujo de 38 ml/min.

La separación se realizó en las siguientes condiciones: Temperatura del inyector y temperatura del detector: 300 °C y temperatura de la columna: 200 °C. El área de los picos se determinó con un integrador Hewlett Packard, modelo 3390A y la identificación de los ácidos grasos mediante comparación de los tiempos de retención de patrones comerciales de ésteres metílicos.

Se determinaron el porcentaje de lípidos totales, la composición lipídica, *viz*, triacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfolípidos y la composición de ácidos grasos, *viz*, palmítico, araquídico, oleico, linoleico, linolénico y eicosenoico.

Se realizaron los análisis de componentes principales y de agrupamiento, en el primero se utilizó la matriz de correlación entre los caracteres anteriores y para el segundo se utilizaron los métodos UPGMA y Ward. El análisis multivariado se realizó con el programa PAST V. 1.34 [6].

### 3. Resultados y Discusión

Para el análisis de componentes principales los dos primeros componentes explicaron el 43,92 y 39,79 %, respectivamente para un total de 83,71 % (cuadro 1)

Los tres cultivares de cada cultivo estuvieron más relacionados entre sí (Figura 1). Los caracteres más importantes para definir estos grupos fueron el ácido palmítico y el ácido oleico, mientras que los caracteres menos importantes fueron el ácido  $\alpha$ -linolénico y los fosfolípidos (Figura 2). Resultados algo diferentes mostraron los análisis de agrupamiento (Figura 3 y 4). Se formaron cinco grupos, el primero compuesto por dos cultivares de maní Rojo y Rosado;

el segundo por los tres cultivares de ajonjolí; el tercero por los cultivares de girasol B-5 y B-16, el cuarto por B-9 y el último por Americano Chico. Lo que indicó que el análisis de conglomerados fue menos efectivo a la hora de agrupar todos los cultivares de una misma especie en un solo grupo que el análisis de componentes principales, pero si fue efectivo al no reunir en un mismo grupo cultivares de diferentes especies.

Cuadro 1. Eigenvalores, porcentaje de variación y porcentaje de variación acumulado para el análisis de los componentes principales en tres cultivares de tres cultivos oleaginosos en Venezuela para porcentaje de lípidos totales, composición lipídica y perfil de ácidos grasos.

Número	Eigenvalores	Porcentaje de Variación	Porcentaje de variación acumulado
1	4,66	43,92	43,92
2	4,22	39,79	83,71
3	1,13	10,67	94,38
4	0,42	3,99	98,37
5	0,10	0,98	99,35
6	0,05	0,48	99,83
7	0,01	0,09	99,92
8	0,01	0,07	99,99

Mannina *et al.* [7] realizaron una investigación con el objetivo de encontrar si existía evidencia directa que relacionara la composición de ácidos grasos de los aceites de oliva para cultivares específicos cultivados dentro de una región limitada geográficamente y analizaron mediante resonancia magnética nuclear de alto campo (NMR) y cromatografía de gas, sesenta muestras de aceite de oliva extra virgen de la misma región Italiana (sureste de Sicilia) obtenidas de cuatro cultivares monovarietales. El espectro de la resonancia magnética nuclear suministró información acerca de los triésteres de glicerol de los aceites de oliva, *i. e.*, acerca de la composición de acil de los principales componentes y acerca de la distribución posicional de los ácidos grasos. La cromatografía de gases dio el perfil completo de ácidos grasos de las muestras de aceite de oliva. La selección de los picos de la resonancia magnética nuclear y de la cromatografía de gases sobre la base de su sensibilidad a los diferentes cultivares se realizó mediante el uso de análisis de varianza multivariado (MANOVA) y luego se realizaron los análisis de componentes principales, análisis de agrupamiento de árboles, escala multidimensional (MDS) y análisis discriminante lineal sobre los picos seleccionados por el análisis de

varianza multivariado. Los autores encontraron que las técnicas de resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases combinadas con el procedimiento estadístico multivariado concuerdan y proveen la utilidad del análisis de ácidos grasos para agrupar los aceites de oliva monovarietales pertenecientes a los mismos cultivares. Resultados

similares se encontraron en este trabajo pero para la asociación de cultivares de una misma especie dentro de un mismo grupo. El agrupamiento de los aceites de oliva de acuerdo con sus cultivares se produce para todas las resonancias  $C^{13}$ , todas pertenecientes a las cadenas de ácidos grasos en la posición 1,3 de la fracción de glicerol.

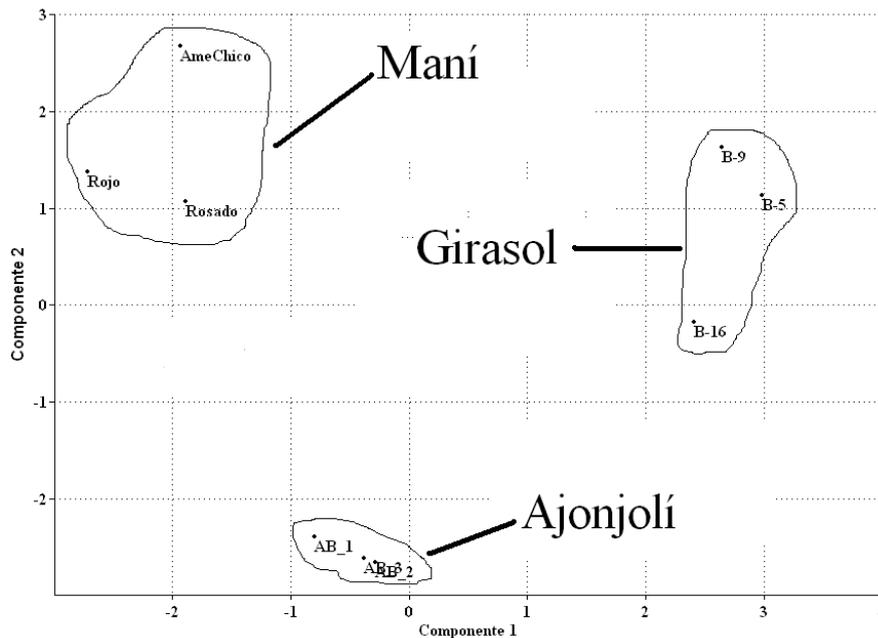


Figura 1. Análisis de componentes principales de tres cultivares para tres cultivos oleaginosos (maní, girasol y ajonjolí) de importancia en Venezuela.

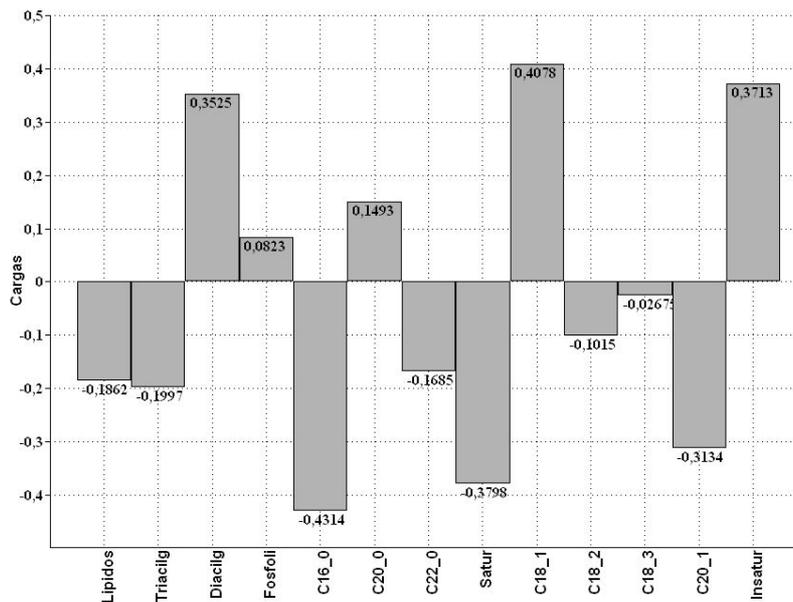


Figura 2. Cargas máximas de los componentes principales de tres cultivares para tres cultivos oleaginosos (maní, girasol y ajonjolí) de importancia en Venezuela.

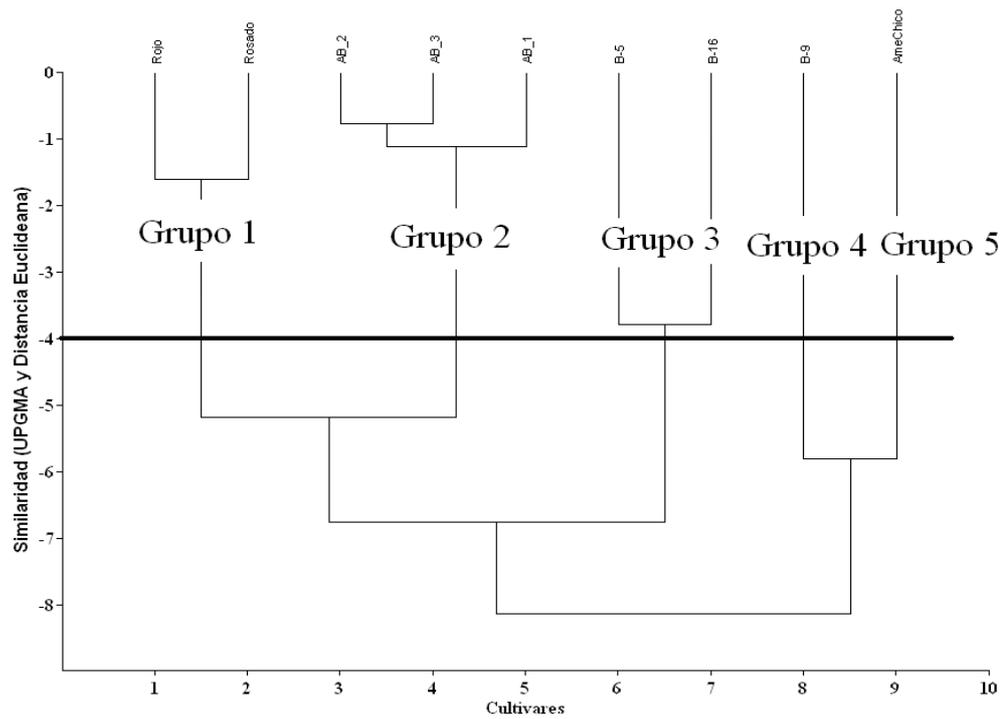


Figura 3. Análisis de agrupamiento método UPGMA de tres cultivares para tres cultivos oleaginosos (maní, girasol y ajonjolí) de importancia en Venezuela.

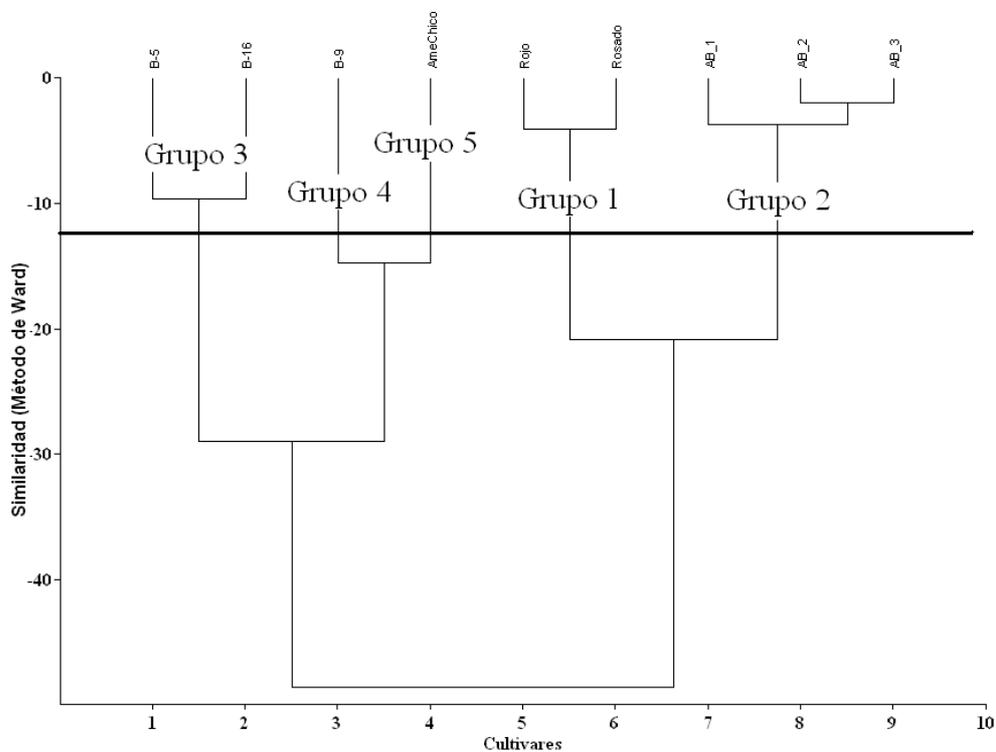


Figura 4. Análisis de agrupamiento método de Ward de tres cultivares para tres cultivos oleaginosos (maní, girasol y ajonjolí) de importancia en Venezuela.

Adamska *et al.* [8] indicaron que la composición de ácidos grasos del aceite de *Brassica napus* L. comercial con cero ácido erúcido es típica para esta especie y es rica en ácido oleico y contiene moderados niveles de ácido linoleico y linolénico, los autores usaron análisis uni y multivariados de varianza para evaluar líneas doble haploides de la colza aceitera de invierno con respecto a cinco ácidos grasos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico y encontraron que en el análisis de varianza multivariado las cinco variables originales (ácidos grasos individuales) fueron reemplazadas por tres "nuevas" variables (la combinación de estos ácidos) y usadas para evaluar las líneas doble haploides con respecto a los requerimientos concernientes al papel nutricional de los ácidos grasos. La primera variable fue el contenido total de los ácidos saturados (palmítico y esteárico), la segunda (uniforme) fue el contenido del ácido monoinsaturado oleico y la tercera variable fue la diferencia entre los ácidos poliinsaturados, es decir, entre el ácido linoleico y el contenido doble del ácido linolénico. Resultados similares se encontraron en este ensayo donde las variables más importantes en la agrupación de los cultivares dentro de cada especie fueron el ácido palmítico y el ácido oleico.

En un estudio preliminar, Malavé Acuña y Méndez Natera [9] encontraron que las variedades de ajonjolí AB-2 y AB-3 estuvieron más relacionadas entre sí, formando un grupo, mientras que AB-1 no formó grupo, por otra parte los caracteres más importantes fueron el porcentaje de lípidos totales, el ácido oleico y el porcentaje de ácidos insaturados, indicando una mayor variabilidad entre variedades para estos caracteres, mientras que los caracteres menos importantes fueron el ácido araquídico, ácido behénico y los contenidos de diacilglicérols. Resultados parcialmente similares se encontraron en este ensayo para el ácido oleico. Los autores concluyeron que los componentes principales y el análisis de agrupamiento pueden ser usados para estudiar las relaciones entre lípidos totales, composición lipídica y ácidos grasos, de manera de identificar grupos similares en cuanto a estas características.

#### 4. Conclusiones

La técnica multivariada de análisis componentes principales permitió agrupar los cultivares en tres grupos formados por las tres especies oleaginosas estudiadas, es decir, cada uno de los tres grupos estuvieron formados por los tres cultivares de cada especie utilizando el porcentaje de lípidos totales, composición lipídica y perfil de ácidos grasos.

#### 5. Referencias

- [1] FEDEAGRO. 2009. Producción agropecuaria. <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>. Última visita 4 de octubre de 2009.
- [2] Hernández Fernández, E.; Quispe, C. y Alencastre, A. 1999. Composición de ácidos grasos en aceites de mayor consumo en el Perú. Ciencia e Investigación Volumen 2 No 9. [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/ciencia/Vol2\\_N1/indexc.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/ciencia/Vol2_N1/indexc.htm). Última visita 12 de octubre de 2005.
- [3] Urbina, N. D. 2001. A multivariate model for identification of bacteria using Pyrolysis GC/MS. Uppsala University. Department of Mathematics. 34 p.
- [4] Overturf, M. and Dryer, R. 1969. Experiment in the biochemistry of animal lipids, En Kerkut, G. (De): Experimental physiology and biochemistry. Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 81-163.
- [5] Litchfield, C. 1972. Analysis of triglycerides. Academic Press. New York. Cap: 1, 2, 6, 11 y 12.
- [6] Hammer, Ö.; Harper, D. A. T. and Ryan, P. D. 2001. PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4 (1): 9 p.
- [7] Mannina, L.; Dugo, G.; Salvo, F.; Cicero, L.; Ansanelli, G.; Calcagni, C. and Segre, A. 2003. Study of the cultivar-composition relationship in Sicilian olive oils by GC, NMR, and statistical methods. Journal of Agric Food Chem. 51 (1): 120-127.
- [8] Adamska, E.; Cegielska-Taras, T.; Kaczmarek, Z. and Szala, L. 2004. Multivariate approach to evaluating the fatty acid composition of seed oil in a doubled haploid population of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). J. Appl. Genet. 45 (4): 419-425.
- [9] Malavé Acuña, A y Méndez Natera, J. R. 2005. Comparación de la composición lipídica en semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) usando técnicas multivariadas. Revista UDO Agrícola 5 (1): 48-53.