

Comparación de la composición lipídica en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) usando técnicas multivariadas

Lipid composition of sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) using multivariate analysis

Auristela Malavé Acuña^{1*} y Jesús Rafael Méndez Natera²

¹Departamento de Ciencias, Unidad de Estudios Básicos y ²Departamento de Agronomía, Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de Oriente, Avenida Universidad, *Campus* Los Guaritos, Maturín, 6201, estado Monagas. E-mail: amalave@monagas.udo.edu.ve y jmendezn@cantv.net * Autor para correspondencia

Recibido: 20/09/2006

Fin de arbitraje: 16/10/2006

Revisión recibida: 06/11/2006

Aceptado: 09/11/2006

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar mediante técnicas multivariadas tres cultivares experimentales de girasol (B-5, B-9 y B-16). Los lípidos se extrajeron con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) para su posterior análisis empleando la cromatografía de capa fina automatizada, con un detector de ionización a la llama (TLC/FID), y la cromatografía de gas-líquido para caracterizar y cuantificar los lípidos totales y los ácidos grasos, respectivamente. 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. Para el análisis de componentes principales el primer componente explicó 79,59 % de la variación y el segundo 20,41 % (total 100,00 %), los cultivares B-5 y B-16 estuvieron más relacionadas entre sí, mientras los caracteres más importantes fueron el los fosfolípidos y triacilgliceroles, indicando una mayor variabilidad entre cultivares para estos caracteres, los caracteres menos importantes fueron el ácido linolénico (C18:3) y el ácido eicosenoico (C20:1). El análisis de agrupamiento indicó resultados similares a aquellos de los componentes principales. En conclusión, 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 para diferentes cultivares de girasol.

Palabras clave: Girasol, análisis cromatográfico, análisis multivariado.

ABSTRACT

The objective of this work was to compare by multivariate techniques three experimental cultivars of sunflower (B-5, B-9 y B-16). Seed lipids were extracted with a chloroform-methanol mixture (2:1 v/v). For their subsequent analyses by automated thin layer chromatography, with flame ionization detector (TLC/FID), and gas-liquid chromatography to characterize and quantify the total lipids and fatty acids, respectively. Percentage of total lipids, lipid composition, *viz*, triacylglycerol, diacylglycerol, phospholipids and fatty acids composition, *viz*, palmitic, araquidic, oleic, linoleic, linolenic and eicosenoic acids were determined. Principal component analyses and cluster analyses were carried out. For the principal component, the first component explained 79.52 % of the variation and the second one explained 20.41 % (total 100,00 %), cultivars B-5 y B-16 were more related to each other, while the most important characters were phospholipids and triacylglycerol indicating a bigger variability among cultivars for these characters, while the less important ones were linolenic acid (C18:3) and eicosenoic acid (C20:1). Cluster analysis indicated similar results to those of principal components. Principal component and cluster analysis should be used to study the relationships among total lipids, lipid composition and fatty acids in order to identifying similar groups for these characters for different sunflower cultivars.

Kew words: Sunflower, chromatography analyses, multivariate analyses

INTRODUCCIÓN

El girasol fue uno de los principales cultivos oleaginosos en Venezuela durante el inicio de la década de los 90's con producciones cercanas a las 25.000 t., cifra que posteriormente disminuyó considerablemente hasta el punto que para el año

2005 la producción sólo alcanzó las 439 t., con el menor rendimiento alcanzado en los últimos catorce años con 614 kg/ha (FEDEAGRO, 2006).

El aceite de girasol es de muy buena calidad. Las grasas animales y los aceites tropicales, los cuales son altos en ácido mirístico y bajos en ácido linoleico,

incrementan los niveles del colesterol, los aceites altos en ácido linoleico tales como aceite de semilla de uva, aceite de girasol y aceite de cártamo pueden jugar un papel significativo en la reducción de los niveles de colesterol en la sangre cuando se consumen regularmente como parte de la dieta (Zamora, 2005). En un estudio se mostró que individuos experimentaron una disminución significativa del colesterol lipoproteico de baja densidad (LDL) y colesterol total en una dieta de aceite de girasol NuSun™ comparado con una dieta Estadounidense promedio, pero no experimentó una disminución significativa del colesterol en la dieta de aceite de oliva (NSA, 2006).

Se han utilizado varios métodos para caracterizar a los cultivares de girasol, siendo sus características agronómicas la forma más común de evaluarlos. Méndez-Natera y Cedeño (1996) evaluaron 16 cultivares de girasol en época de norte en San Jaime, estado Monagas, para el rendimiento de aquenios y otros componentes del rendimiento. Soto *et al.* (2005), publicaron el manual para la evaluación de cultivares de girasol sometidos a pruebas regionales en Venezuela, donde se contemplan el rendimiento de aquenios/ha y otros caracteres agronómicos tales como días a 50 % de plantas en floración, altura de planta, peso de 1000 aquenios, ángulo del capítulo etc., así como el registro de enfermedades y plagas comunes en Venezuela.

Se han llevado a cabo otros métodos para estudiar la variabilidad de cultivares de girasol. Aponte *et al.* (2004) evaluaron la reacción a *Alternaria helianthi*, el rendimiento y el contenido de aceite de 16 genotipos de girasol en condiciones de infección en campo en Maracay, Venezuela. Popov *et al.* (2002) examinaron la diversidad genética de 30 líneas endocriadas de girasol utilizando análisis de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e isoenzimas y encontraron una alta efectividad del análisis de RAPD para diferenciar genotipos de las líneas endocriadas de girasol. Liu *et al.* (2003) evaluaron 23 variedades elites confiteras de girasol basados en datos de RAPD y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) e indicaron que una variación considerable entre los 23 cultivares a nivel de ADN genómico es detectable con marcadores AFLP.

Las ventajas de la cromatografía de gas son su extrema sensibilidad, que permite separar mezclas de cantidades muy pequeñas y el hecho de que las

columnas se pueden usar repetidamente. La aplicación de esta técnica utilizando las modernas columnas capilares, ofrecen excelentes separaciones que han mostrado que los lípidos naturales contienen una amplia variedad de ácidos grasos que hasta ahora no se habían detectado (Shanta y Napolitano, 1992).

El análisis de datos multivariantes comprende el estudio estadístico de varias variables medidas en elementos de una población con los siguientes objetivos: 1) resumir los datos mediante un pequeño conjunto de nuevas variables, construidas como transformación de las originales, con la mínima pérdida de información; 2) encontrar grupos en los datos, si existen; 3) clasificar nuevas observaciones en grupos definidos y 4) relacionar dos conjuntos de variables (Peña, 2002).

El objetivo de este trabajo fue comparar mediante técnicas multivariadas (análisis de agrupamiento y de componentes principales) tres cultivares experimentales de girasol (B-5, B-9 y B-16).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas estudiadas fueron colectadas en la Estación Experimental de Sabana de la UDO, Jusepín-Monagas, en tres cultivares de experimentales de girasol. 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 (1969). Se tomaron porciones aproximadas de un gramo 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, luego a la fracción lipídica obtenida se le burbujeó nitrógeno, 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 a la llama (TLC/FID) se utilizó un analizador Iatroscan MK-5, operando junto un integrador Hewlett Packard 3390A. El detector de ionización a la 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 seg/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 (Litchfield, 1972). Los ésteres metílicos correspondientes a cada muestra se analizaron en un cromatógrafo Varian serie 3300, equipado con una columna capilar de 3 m de largo y 0,55 pulgadas de diámetro. 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 determinó 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 las cargas se calcularon mediante los coeficientes de los componentes principales y para el segundo se utilizaron el método UPGMA con la distancia Euclideana y el método de Ward. El análisis multivariado se realizó con el programa PAST V. 1.50 de septiembre 2006 (Hammer *et al.*, 2001)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el análisis de componentes principales el primer componente explicó 79,59 % de la variación y el segundo 20,41 % (total 100,00 %), los cultivares B-5 y B-16 estuvieron más relacionadas entre sí (Figura 1), mientras los caracteres más importantes para determinar los componentes principales fueron los triacilgliceroles y los fosfolípidos, indicando una mayor variabilidad entre cultivares para estos caracteres, mientras que aquellos menos importantes fueron el ácido linolénico (C18:3) y el ácido eicosenoico (C20:1) (Figura 2).

El análisis de agrupamiento indicó similares resultados a aquellos de los componentes principales (Figuras 3 y 4). Estos resultados indican que los métodos multivariados (análisis de componentes principales y análisis de conglomerados o agrupamiento) son útiles a la hora de unir o separar a cultivares de girasol. Similitud de resultados fueron reportados por Malavé-Acuña y Méndez-Natera (2005), quienes trabajaron con tres cultivares de ajonjolí e indicaron la utilidad de los métodos multivariados.

Las técnicas multivariadas permitieron agrupar los cultivares de girasol de acuerdo a sus características lipídicas. Similares resultados fueron indicados por López *et al.* (2006) quienes determinaron la composición de ácidos grasos en 67 presentaciones comerciales de aceite de aceitunas de mesa y encontraron que el análisis de componentes principales de la matriz de la composición de ácidos grasos condujo a la deducción de nuevos factores, el primero explicó el 55,19 % de la variación total y estuvo relacionado principalmente con los ácidos palmítico, esteárico, araquídico, behénico, lignocérico, oleico, elaidico y eicosenoico, el segundo factor explicó el 10,33 % de la variación y estuvo relacionado con los ácidos palmitoleico y linoleico. Ellos no permitieron la diferenciación entre los tipos de elaboración o cultivares, sin embargo, el análisis discriminante fue exitosamente aplicado para este objetivo. Los ácidos grasos que más contribuyeron a discriminar entre los estilos de elaboración fueron los ácidos heptadecenoico, oleico, palmítico, margárico y esteárico (función 1) y los ácidos margárico, heptadecenoico, araquídico, palmítico, oleico y lignocérico (función 2). En el caso de los cultivares, ellos fueron los ácidos araquídico, oleico, heptadecenoico, linoleico, elaidico y t-Linoleico (función 1); y los ácidos linoleico, oleico, heptadecenoico, palmítico, araquídico, esteárico y t-Linoleico (función 2) y los ácidos margárico, linolénico y heptadecenoico (función 3), los autores mostraron diferencias entre la composición de ácidos grasos y el contenido de aceite de las diversas presentaciones comerciales de aceituna de mesa, las cuales pueden ser aplicadas en el análisis discriminante predictivo y clasificatorio.

Brondz *et al.* (2004) realizaron un trabajo cuyo objetivo fue estudiar la posibilidad de usar el contenido de ácidos grasos en las basidiosporas como una herramienta taxonómica. Fueron utilizadas las basidiosporas de *Armillaria borealis*, *Amanita*

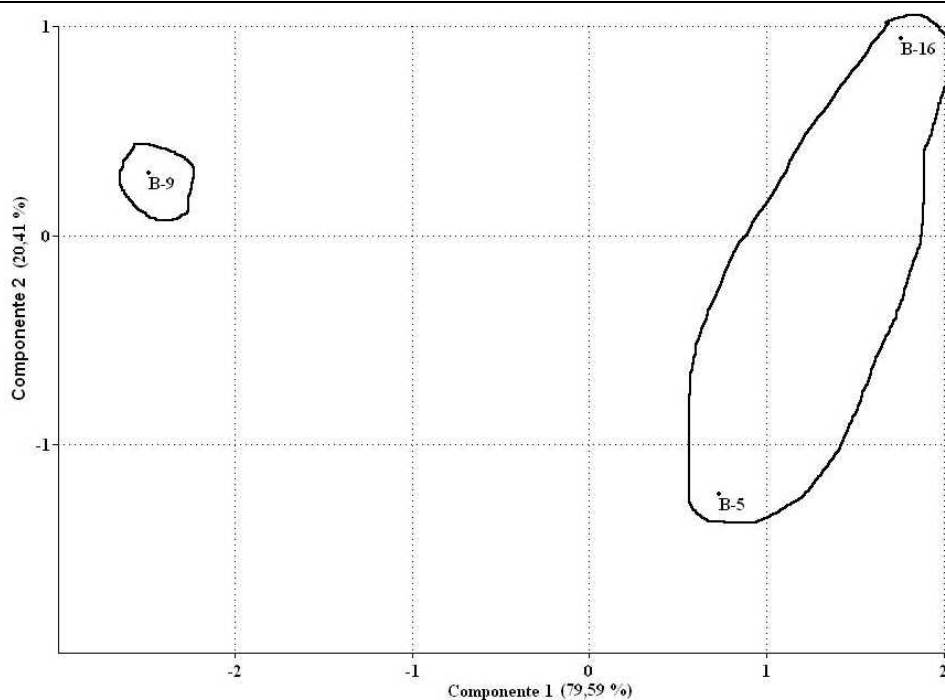


Figura 1. Componentes principales de tres cultivares de girasol (*Helianthus annuus* L.)

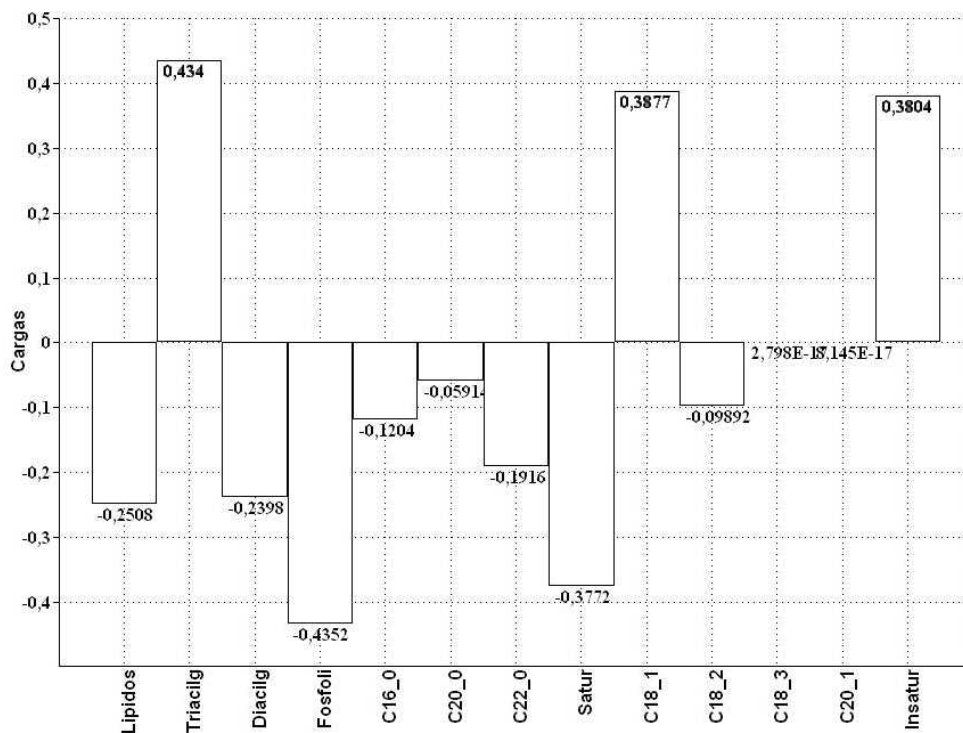


Figura 2. Máximas cargas de los componentes principales de tres cultivares de girasol (*Helianthus annuus* L.)

muscaria, *Agaricus sylvicola*, *Hypholoma capnoides*, *Cortinarius nemorensis* y *Russula delica*. Se utilizaron la cromatografía de gas y espectrometría de masas-cromatografía de gas después de metanólisis de las esporas de los hongos para mapear los ácidos grasos esenciales en los basidiomicetes. Se observó la

presencia de ácidos grasos del tamaño C12:0 a C24:0 en las basidiosporas de estos basidiomicetes superiores, los autores concluyeron que las basidiosporas fueron una buena fuente de ácidos grasos para las investigaciones quimiotaxonómicas de agaricales.

En conclusión, las técnicas multivariadas (componentes principales y análisis de agrupamiento) pueden ser usadas para estudiar las relaciones entre lípidos totales, composición lipídica y ácidos grasos de manera de identificar grupos similares de cultivares de girasol en cuanto a estas características.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el soporte dado a los autores.

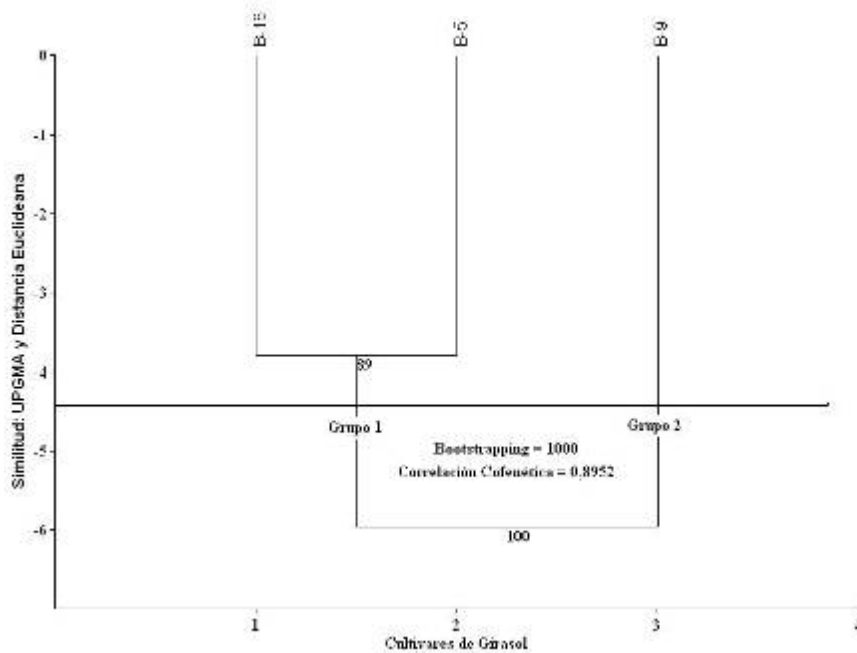


Figura 3. Análisis de agrupamiento método UPGMA y distancia Euclídeana de tres cultivares de girasol (*Helianthus annuus* L.)

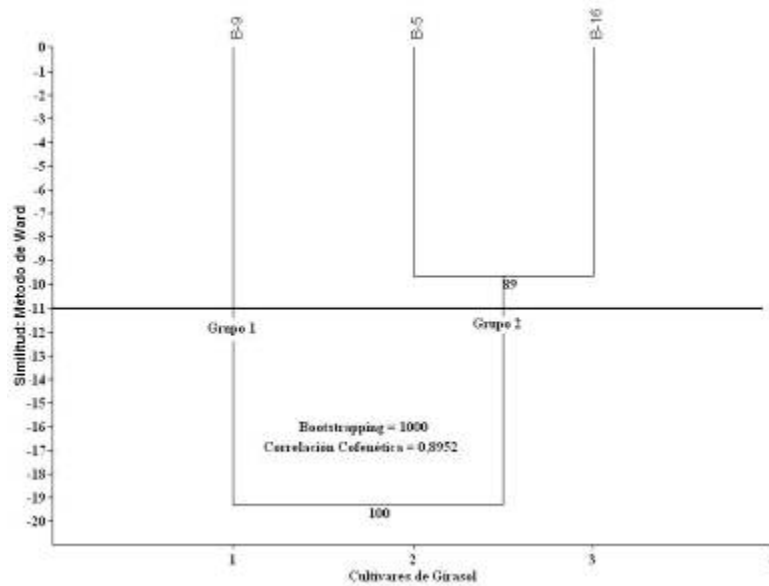


Figura 4. Análisis de agrupamiento método de Ward de tres cultivares de girasol (*Helianthus annuus* L.)

LITERATURA CITADA

- Aponte, A., C. A. Rincón y C. Marín R. 2004. Reacción de genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.) a *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki y Nishihara en infecciones de campo y su relación con el rendimiento y el contenido de aceite. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (1): 129-133.
- Brondz, I.; K. Hoiland and D. Ekeberg. 2004. Multivariate analysis of fatty acids in spores of higher basidiomycetes: a new method for chemotaxonomical classification of fungi. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 50 (1-2): 303-307.
- FEDEAGRO. 2006. Producción Agropecuaria. <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>. Última visita 15 de agosto de 2006.
- Hammer, Ö.; D. A. T. Harper and P. D. Ryan. 2001. PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9 p.
- Litchfield, C. (1972). *Analysis of triglycerides*. Academic Press. New York. Cap: 1, 2, 6, 11 y 12.
- Liu, J., G. S. Liu and C. C. Jan. 2003. Comparison of genetic diversity of the germplasm resources of confectionary sunflower (*Helianthus annuus*) in China based on RAPDs and AFLPs. *Acta Botanica Sinica* 45 (3): 352-358.
- López, A., A. Montaña, P. García and A. Garrido. 2006. Fatty acid profile of table olives and its multivariate characterization using unsupervised (PCA) and supervised (DA) Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 54 (18): 6747 -6753.
- Méndez-Natera, J. R. y J. R. Cedeño. 1996. Comportamiento agronómico de 16 cultivares de girasol (*Helianthus annuus* L.) bajo condiciones agroecológicas de sabana en el estado Monagas. *Oriente Agropecuario* 21: 125-137.
- Malavé-Acuña, A. y J. R. Méndez-Natera. 2005. Comparación de la composición lipídica en semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) usando técnicas multivariadas. *Revista Científica UDO Agrícola* 5 (1): 48-53.
- National Sunflower Association (NSA). 2006. Study shows NuSun™ sunflower oil protects against cardiovascular disease. *Nutritional Power of Sunflower Oil*. Vol 3 Nro. 2, 2 p.
- Overturf, M. and R. Dryer. 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.
- Peña. D. 2002. Análisis de datos multivariantes. Editorial McGraw Hill. Madrid, España. 539 p.
- Popov, V. N.; O. Yu Urbanovich and V. V. Kirichenko. 2002. Studying genetic diversity in inbred sunflower lines by RAPD and isozyme analyses. *Russian Journal of Genetics* 38 (7): 785-790
- Shanta, N. C. and G. E. Napolitano. 1992. Review: Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography*, 624 (1-2): 37-51
- Soto, E.; E. Arnal y A. Aponte. 2005. Manual para la evaluación de cultivares de girasol sometidos a pruebas regionales. *Revista Digital CENIAP HOY* Número 7. Maracay, Aragua, Venezuela. http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n7/arti/soto_e/arti/soto_e.htm. Última visita 18 de agosto de 2006.
- Zamora, A. 2005. Fats, Oils, Fatty Acids, Triglycerides - Chemical Structure. http://www.scientificpsychic.com/fitness/fattyacid_s2.html. Última visita 12 de agosto de 2006.