

Comparación de la composición lipídica en semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) usando técnicas multivariadas

Lipid composition of sesame seeds (*Sesamum indicum* 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

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar mediante técnicas multivariadas tres variedades experimentales de ajonjolí (AB-1, AB-2 y AB-3). 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 a la llama (TLC/FID) se utilizaron varillas de cuarzo cubiertas con silica gel. La cromatografía de gas-líquido se empleó para determinar la composición de ácidos grasos. 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. Para el análisis de componentes principales los dos primeros componentes explicaron toda la variación (100 %), la variedad AB-2 y AB-3 estuvieron más relacionadas entre sí, mientras 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 diacilgliceroles. El análisis de agrupamiento indicó similares resultados a aquellos de los componentes principales. 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.

Palabras clave: Ajonjolí, *Sesamum indicum*, análisis cromatográfico, análisis multivariado.

ABSTRACT

The objective of this work was to compare by multivariate techniques three experimental varieties of sesame (AB-1, AB-2 and AB-3). Seed lipids were extracted with a chloroform-methanol mixture (2:1 v/v). For the chromatography analyses of thin layer chromatography with flame ionization detector (TLC/FID), chromarods were used. The gas-liquid chromatography was used to determine the fatty acids composition. Percentage of total lipids, lipid composition, *viz*, triacylglycerol, diacylglycerol, phospholipids and fatty acids composition, *viz*, palmitic, araquídic, oleic, linoleic, linolenic and eicosenoic acids were determined. For the principal component, the first two components explained the whole variation (100 %), varieties AB-2 and AB-3 were more related to each other, while the most important characters were percentage of total lipids, oleic acid content and percentage of unsaturated fat indicating a bigger variability among varieties for these characters, while the less important characters were araquídic acid, behenic acid and the diacylglycerol. The cluster analysis indicated similar results to those of principal components. In conclusion, principal component and cluster analysis can be used to study the relationships among total lipids, lipid composition and fatty acids in order to identifying similar groups for these characters.

Kew word: Sesame, *Sesamum indicum*, chromatography analyses, multivariate analyses

INTRODUCCIÓN

El ajonjolí representa una de las principales fuentes de aceites y grasas en el país, la producción para los años 2003 y 2004 alcanzó las 5502 y 20806 toneladas, respectivamente, esto representó un valor de la producción de 1469 y 5556 millones de bolívares, respectivamente, siendo la segunda oleaginosa anual más importante detrás del algodón y

superando a cultivos como girasol, maní y soya para estas dos características. Por otra parte, la superficie cosechada para estos años fue de 6565 y 44193 ha, respectivamente, siendo para el año 2004 el cultivo oleaginoso tanto anual como perenne con mayor superficie cosechada, pero desafortunadamente es también el cultivo oleaginoso de menor rendimiento el cual fue de 838 y 471 kg/ha para los años 2003 y 2004, respectivamente (FEDEAGRO 2005).

La semilla de ajonjolí contiene de 50 a 60% de aceite de muy buena calidad y con una excelente estabilidad debido a la presencia de antioxidantes naturales tales como sesamol, sesamin y sesamol (Brar y Ahuja 1979). El sesamin ha sido asociado con la disminución de la presión arterial (Matsumura *et al.* 1998) e importante en mejorar los perfiles de colesterol (Ogawa *et al.* 1995).

Se han utilizado varios métodos para caracterizar a los cultivares de ajonjolí. La forma más común de evaluar a los cultivares de ajonjolí es de acuerdo a sus características agronómicas. Rincón y Silva (1993), evaluaron variedades de ajonjolí en época de lluvias en la Mesa de Guanipa, estado Anzoátegui, Venezuela para diferentes caracteres agronómicos. Métodos más inusuales son los utilizados por Milano-Ramírez *et al.* (1995) quienes evaluaron 16 cultivares de ajonjolí de acuerdo a caracteres fitopatológicos ante la presencia de manchas foliares fungosas, Mazzani y Layrisse (1996) evaluaron cultivares de ajonjolí de acuerdo a las características físicas del grano. Laurentin y Karlovsky (2005) utilizaron marcadores moleculares del tipo AFLP para investigar la variabilidad genética entre cultivares venezolanos de ajonjolí. Mazzani y Layrisse (1998) evaluaron las características químicas del grano de cultivares de ajonjolí seleccionados de la colección Venezolana de germoplasma, entre estas características químicas estaban el contenido de aceite y el contenido de proteínas y la composición del aceite (ácidos grasos) y los contenidos de azúcares reductores. Pero han sido pocos los trabajos en ajonjolí que han considerado el uso de las técnicas multivariadas para agrupar a los cultivares de acuerdo a los caracteres bajo estudio.

A pesar de que en sus comienzos la cromatografía de capa fina fue cuestionada por la falta de precisión en los resultados obtenidos, en los últimos años se han logrado grandes mejoras en su instrumentación, por lo que actualmente es catalogada como una herramienta que ha marcado grandes avances en el campo de la biología, bioquímica, etc., donde ha tenido aplicación en análisis de numerosos compuestos entre ellos los lípidos y ácidos grasos.

Las técnicas multivariadas permiten analizar grupos complejos de datos y realizar el análisis donde hay muchas variables independientes y posibles variables dependientes, las cuales están correlacionadas entre sí a diferentes niveles. Los métodos multivariados son extraordinariamente útiles

para ayudar a los investigadores a encontrar sentido en conjuntos grandes y complejos de datos que además constan de una gran cantidad de variables medidas en números grandes de unidades experimentales. En la medida en que se incrementan el número de variables que se están midiendo y el número de unidades experimentales que se están evaluando, entonces, es cuando aumenta la importancia y utilidad de los métodos multivariados.

El objetivo de este trabajo fue comparar mediante técnicas multivariadas (análisis de agrupamiento y de componentes principales) tres variedades experimentales de ajonjolí (AB-1, AB-2 y AB-3).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas estudiadas en el presente trabajo fueron colectadas en la Estación Experimental de Sabana de la UDO, Jusepín-Monagas, en tres cultivares de ajonjolí. 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 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, 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 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 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 30 cm de largo y 1,40 cm 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 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 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.

1.34 (Hammer *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el análisis de componentes principales los dos primeros componentes explicaron toda la variación (100 %), la variedad AB-2 y AB-3 estuvieron más relacionadas entre sí (Figura 1), mientras los caracteres más importantes fueron el porcentaje de lípidos totales, el ácido oleico y el porcentaje de aceites 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 diacilgliceroles (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 ajonjolí. Khan *et al.* (2005) realizaron un ensayo con cultivares de cártamo e indicaron que el análisis de agrupamiento y el análisis de componentes principales para los caracteres agro-morfológicos y los ácidos grasos dieron resultados comparables y mostraron una relación compleja entre los cultivares, caracteres y orígenes geográficos e indicaron que los resultados mostraron una gran variabilidad genética

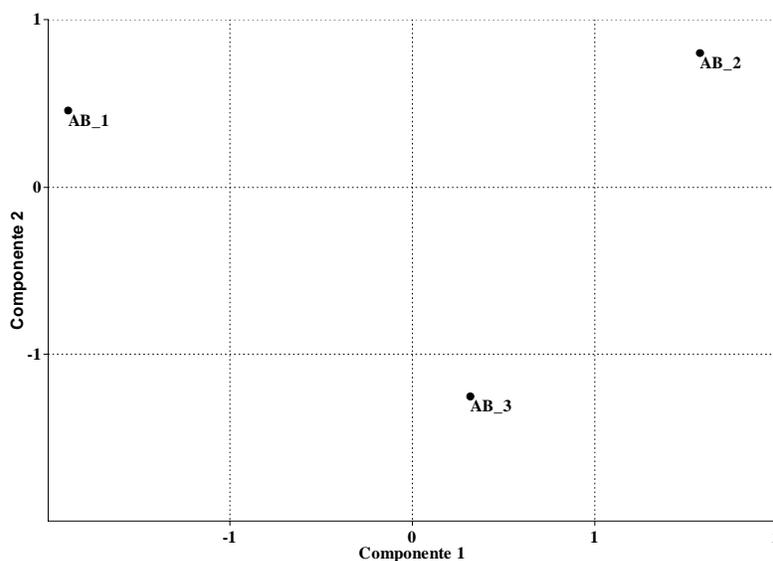


Figura 1. Componentes principales de tres cultivares de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.)

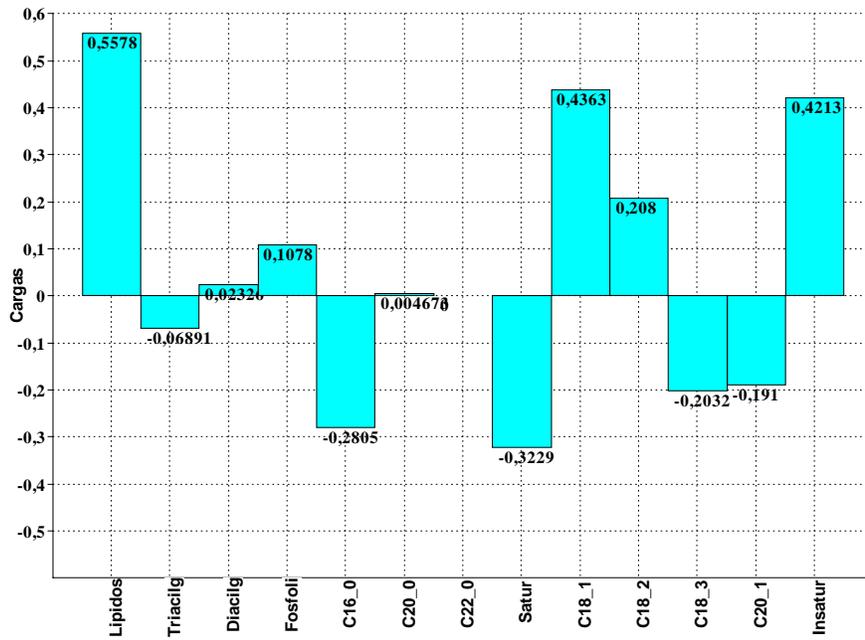


Figura 2. Máximas cargas de los componentes principales de tres cultivares de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.)

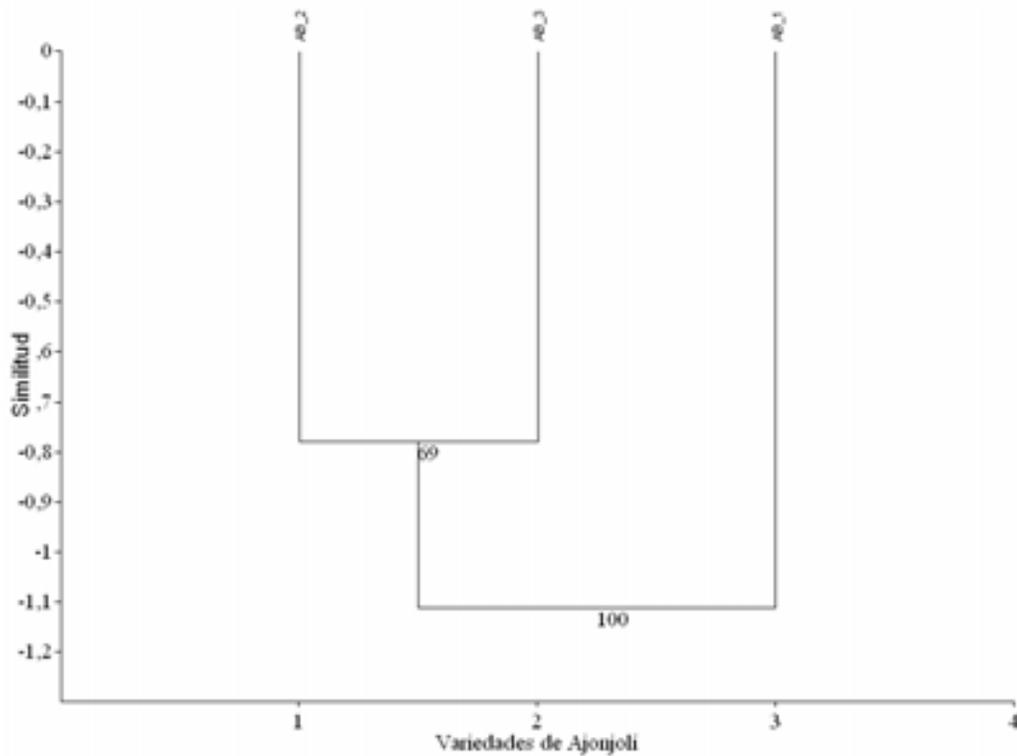


Figura 3. Análisis de agrupamiento método UPGMA de tres cultivares de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.)

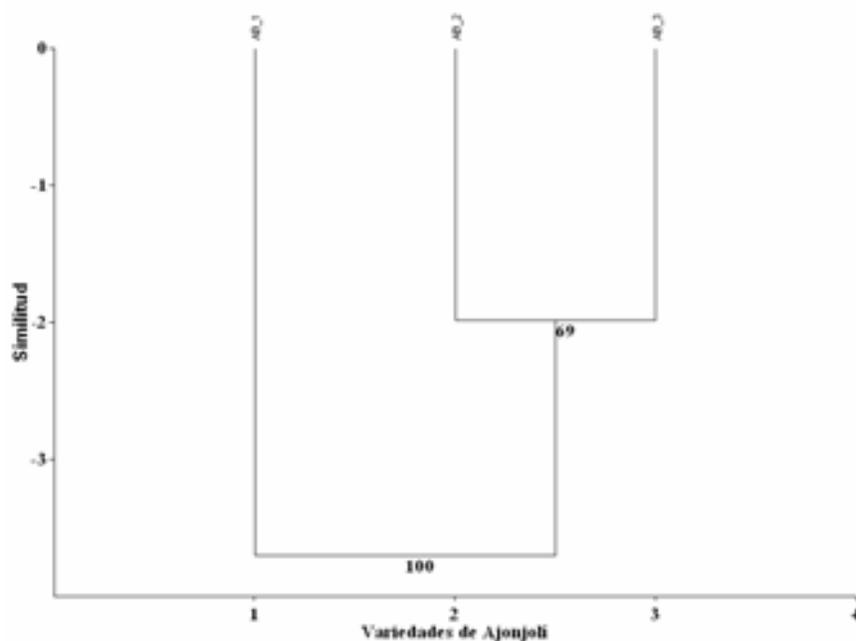


Figura 4. Análisis de agrupamiento método de Ward de tres cultivares de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.)

entre los cultivares de cártamo evaluados, la cual pudiera ser usada en futuros programas de mejoramiento y en seleccionar directamente de las colecciones de germoplasma.

Las técnicas multivariadas permitieron agrupar los cultivares de ajonjolí de acuerdo a sus características lipídicas. Resultados similares fueron indicados por Perri *et al.* (1999) quienes aplicaron análisis de estadística multivariada para estudiar la posibilidad de usar la composición de ácidos grasos para distinguir entre once cultivares de aceite virgen de oliva de cuatro diferentes regiones Italianas: Calabria, Basilicata, Lazio y Umbria y utilizaron el análisis de componentes principales y el análisis discriminante lineal, los autores indicaron que los resultados obtenidos del análisis de trece ácidos grasos permitieron distinguir entre los diferentes cultivares basados en sus genotipos y se formaron tres diferentes grupos de variedades de aceite de oliva Italiano de acuerdo a su origen geográfico

Resultados diferentes fueron reportados por Kodad *et al.* (2004) en almendro (*Prunus amygdalus* L.) quienes evaluaron cinco ácidos grasos de 37 selecciones de almendro del programa de mejoramiento de Zaragoza, España y encontraron que el análisis de agrupamiento o conglomerados mostró una alta similitud en el perfil de ácidos grasos entre las selecciones y sus parentales y entre las

selecciones, las diferencias en la composición de ácidos grasos fueron altamente significativas para los ácidos oleicos y linoleico y menos significativa para los ácidos palmítico, palmitoleico y esteárico. En nuestro experimento uno de los caracteres más importantes fue el ácido oleico, lo que indicó una mayor variabilidad entre variedades para estos caracteres. Adamska *et al.* (2004) indicaron que los métodos multivariados pueden ser útiles en la evaluación y selección de genotipos de calirrábano (*Brassica napus* L.) siendo la composición de ácidos grasos ventajosa desde el punto de vista de la nutrición humana, el enfoque del análisis de varianza múltiple propuesto por los autores permitió encontrar y distinguir líneas doble haploides de callirrábano cumpliendo con todos los criterios nutricionales del contenido de ácidos grasos.

Un extensivo número de aplicaciones de la evaluación multivariada de los perfiles de ácidos grasos han sido realizados durante los últimos 10 años (Grahl-Nielsen, 1999) e inclusive se ha utilizado en estudios taxonómicos en abeto (Grahl-Nielsen *et al.*, 1991).

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 en cuanto a estas características.

LITERATURA CITADA

- Adamska, E.; T. Cegielska-Taras; Z. Kaczmarek and L. Szala. 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.
- Brar, G. S. and K. L. Ahuja. 1979. Sesame: its culture, genetics, breeding and biochemistry p. 245-313. In: Malik, C.P. (ed.). *Annu. Rev. of Plant Sci.* Kalyani Publishers, New Delhi.
- FEDEAGRO. 2005. Producción Agropecuaria. <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>. Última visita 8 de octubre de 2005.
- Grahl-Nielsen, O. 1999. Comment: Fatty acid signatures and classification trees: new tools for investigating the foraging ecology of seals. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 2219-2223.
- Grahl-Nielsen, O.; O. Mjaavatten and D. O. Øvstedal. 1991. A chemometric comparison between *Picea abies* and *P. obovata* (Pinaceae) in Norway. *Nord. J. Bot.* 11: 613-618.
- 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.
- Khan, M. A.; S. von Witzke-Ebrecht; B. K. Maass and H. C. Becker. 2003. Evaluation of a worldwide collection of safflower for morphological diversity and fatty acid composition. *Deutscher Tropentag 2003. International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development* Georg August Universität Göttingen, Germany. October 8-10, 2003. <http://www.tropentag.de/2003/proceedings/node192.html>. Última visita 15 de octubre de 2005.
- Kodad, O.; M. S. Gracia-Gómez and R. Socias i Company. 2004. Fatty acid composition as evaluation criterion for kernel quality in almond breeding. *Acta Hort. (ISHS)* 663: 301-304.
- Laurentin, H. and P. Karlovsky. 2005. Investigation of genetic variability among twenty sesame (*Sesamum indicum* L.) Venezuelan cultivars using amplified fragments length polymorphisms (AFLP). *Deutscher Tropentag 2005. The Global Food y Product Chain – Dynamics, Innovations, Conflicts, Strategies.* Stuttgart-Hohenheim, Germany. October 11 - 13, 2005. <http://www.tropentag.de/abstract.php?code=cy8LJv8Z>. Última visita 15 de octubre de 2005.
- Litchfield, C. 1972. *Analysis of triglycerides.* Academic Press. New York. Cap: 1,2, 6, 11 y 12.
- Matsumura, Y.; S. Kita; Y. Tanida; Y. Taguchi; S. Morimoto; K. Akimoto and T. Tanaka. 1998. Antihypertensive effect of sesamin. III. Protection against development and maintenance of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 21(5): 469-473.
- Mazzani, E. y A. Layrisse. 1996. Selección de cultivares de ajonjolí por características físicas del grano. *Agronomía Tropical* 46 (3): 251-264
- Mazzani, E. y A. Layrisse. 1998. Características químicas del grano de cultivares de ajonjolí seleccionados de la colección Venezolana de germoplasma. *Agronomía Tropical* 48(1): 5-18.
- Milano-Ramírez, T. M.; J. R. Méndez-Natera y J. Cedeño. 1995. Evaluación de 16 cultivares de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) ante la presencia de manchas foliares fungosas. *Saber* 7 (2): 47-53.
- Ogawa, H.; S. Sasagawa; T. Murakami and H. Yoshizumi. 1995. Sesame lignans modulate cholesterol metabolism in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl* 1: S310-312.
- 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.
- Perri, E.; M. V. Parlati; A. Palopoli; M. Pellegrino. and B. Rizzuti. 1999. Characterization of Italian virgin olive oils using fatty acids. *Acta Hort. (ISHS)* 474: 627-630.
- Rincón, C. A. y C. de Silva, L. 1993. Evaluación de variedades de ajonjolí (*Sesamun indicum* L.) en época de lluvia en la Mesa de Guanipa, edo. Anzoátegui, Venezuela. *Agronomía Tropical* 43 (3-4): 127-143.