

ANALISIS DE LOS ACIDOS GRASOS Y DE LOS ESTEROLES DE LOS ACEITES DE CUATRO ESPECIES DE BRASSICA.

J. VIOQUE^{*}, J. PASTOR^{*} & E. VIOQUE^{**}

^{*}Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla.

^{**}Instituto de la Grasa, Avda. Padre García Tejero nº 4, Sevilla.

(Recibido el 30 de Mayo de 1990)

Resumen. Se estudian los ácidos grasos de los triglicéridos y los esteroides libres de los aceites de las semillas de *Brassica tournefortii* Gouan, *B. fruticulosa* Cyr., *B. oxyrrhina* (Cosson) Cosson y *B. barrelieri* (L.) Janka en un total de 18 poblaciones, realizándose un análisis multivariante con los resultados obtenidos. Se hace una representación en el espacio según los tres primeros componentes principales. Los resultados obtenidos apoyan los límites taxonómicos existentes actualmente, diferenciándose en el análisis multivariante cuatro grupos bien definidos que se corresponden con las cuatro especies estudiadas.

Summary. A study of the fatty acids of the triglycerides and the free sterols of the oil of *Brassica tournefortii* Gouan, *B. fruticulosa* Cyr., *B. oxyrrhina* (Cosson) Cosson and *B. barrelieri* (L.) Janka in 18 populations has been carried out. With the results obtained a multivariant analysis was designed and a spatial representation was drawn according to the first three principal axes. The results support the existing taxonomic limits, appearing in the multivariant analysis four well defined groups which correspond to the four species studied.

INTRODUCCION

El uso de los lípidos, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, no está muy extendido como carácter que pudiera resultar de utilidad en taxonomía vegetal.

Son compuestos de reserva (como en el caso de los triglicéridos), que también realizan funciones estructurales (esteroides en las membranas) o protectoras (ceras en las cubiertas vegetales). Están sujetos a variaciones ambientales como le ocurre a la mayoría de los metabolitos secundarios, aunque los compuestos que forman parte del material de reserva suelen variar bastante menos con el entorno que otros más expuestos, como pueden ser las ceras de las hojas.

Existen, en general, estudios relativos a estos compuestos desde un punto de vista taxonómico, tanto de los lípidos de reserva o ácidos grasos de los

triglicéridos (CHAVEN & al., 1982, NAGY & al., 1974) como de las ceras de las hojas (HOGG & al., 1984) o esteroides (MATSUO & al., 1973). En el caso concreto de la familia *Brassicaceae*, debido a la riqueza en lípidos de reserva y al aprovechamiento económico de muchos de sus representantes, son bien conocidas químicamente especies cultivadas, como *B. oleracea* L., *B. nigra* (L.) Koch o *B. napus* L. (MIKOLAJCZAK & al., 1961). Sin embargo, en la mayoría de los casos, estos estudios químicos no orientan los resultados con fines taxonómicos y generalmente no se realizan con especies silvestres.

En este trabajo se han estudiado treinta compuestos químicos en los aceites de las semillas de cuatro especies mediterráneas de *Brassica*: *B. oxyrrina* (Cosson) Cosson, *B. tournefortii* Gouan, *B. barleri* (L.) Janka y *B. fruticulosa* Cyr. Las observaciones, que se han realizado en un total de 18 poblaciones, incluyen la composición en ácidos grasos totales de los triglicéridos, la composición de los ácidos mayoritarios en posición β así como de los esteroides principales.

MATERIAL Y METODOS

El material fue recolectado cuando estaba completamente maduro, para evitar variaciones dependientes del grado de desarrollo del individuo. La procedencia del mismo se indica detalladamente en el apéndice final.

El análisis de los ácidos grasos se realizó en los triglicéridos del aceite de las semillas. Para la extracción del aceite, se procedió a moler las semillas obteniéndose una harina que se mantuvo en hexano agitándose durante media hora. Los triglicéridos se purificaron, del extracto graso obtenido con el hexano, mediante cromatografía en capa fina (CCF), usando placas de 20x20 cm y 0.5 mm de grosor, con sílica gel G60 como adsorbente y hexano-eter etílico-ácido fórmico (v/v/v), en proporción 85:15:1, como líquido de desarrollo. A continuación, los triglicéridos obtenidos de las placas fueron transesterificados con metilato sódico (0.2 N) y sulfúrico diluido en metanol al 3.5%. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos se analizaron por cromatografía gaseosa.

El análisis de los ácidos grasos en posición β , se llevó a cabo mediante hidrólisis enzimática con lipasa pancreática que forma los β -monoglicéridos cuya composición en ácidos grasos es determinada igual que en el caso anterior.

Se estudiaron 15 ácidos en la composición total, C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:0}, C_{20:1}, C_{20:2}, C_{21:1}, C_{22:0}, C_{22:1}, C_{22:2}, C_{23:1} y C_{24:1}, y los 7 mayoritarios en posición β , C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:1} y C_{22:1} (El primer número indica el número de átomos de carbono y el segundo el de dobles enlaces).

El análisis de los ácidos se realizó mediante un cromatógrafo modelo 5710-AP Hewlett-Packard, con una columna capilar SUPELCO (fase fija: supelcowax 10, diámetro 0.25 mm, longitud 60 m). Las condiciones de análisis fueron: temperatura de la columna, 210 °C; temperatura del inyector, 250 °C; temperatura del detector, 250 °C. La identificación de los ácidos grasos se realizó mediante patrones adecuados.

Entre los esteroides se estudiaron los siguientes: colesterol, brasicasterol, campesterol, estigmasterol, sitosterol, Δ^5 -avenasterol y Δ^7 -estigmasterol. Su purificación se realizó a partir de la misma placa de donde se obtuvieron los triglicéridos, ya que se separan de estos al tener un factor de retención (Rf) menor debido a su mayor polaridad. El análisis se realizó en un cromatógrafo modelo 5710-AP Hewlett-Packard, con una columna capilar HP-5 (fase fija: 5% Ph Me Silicone, diámetro 0.32 mm, longitud 25 m). Las condiciones fueron: temperatura inicial, 275 °C; tiempo inicial, 15 min.; rampa, 1 °C/min.; temperatura final, 285 °C; tiempo final, 5 min.; temperatura del detector, 300 °C y temperatura del inyector, 275 °C.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de los ácidos grasos de los triglicéridos (Cuadro 1), muestran como mayoritario al ácido erúrico (C_{22:1}), ácido característico de las *Brassicaceae*, con unos porcentajes que oscilan entre el 28,97% en una población de *B. barrelieri* y el 56% en otra de *B. oxyrrhina*. Le sigue en abundancia el ácido linolénico (C_{18:3}), con valores que oscilan entre el 10,56% en una población de *B. fruticulosa* y el 26,35% en otra de *B. barrelieri*. Otros ácidos en la composición total con valores superiores al 5% son: el ácido oleico (C_{18:1}), el linoleico (C_{18:2}) y el gadoleico (C_{20:1}).

Respecto a la posición β se presenta como mayoritario el ácido linolénico (C_{18:3}) en todas las especies salvo en *B. fruticulosa* donde es superado por el linoleico (C_{18:2}). Por otra parte, el ácido erúrico (C_{22:1}) que aparecía como mayoritario en la composición total, está en posición β en cantidades muy pequeñas, con unos valores que no llegan al 2% en ningún caso.

En cuanto a la composición en esteroides (Cuadro 2) aparece como mayoritario el sitosterol, típico del reino vegetal, con unos porcentajes que van del 55,20% en una población de *B. barrelieri* al 70,70% en otra de *B. fruticulosa*. Sigue el campesterol, oscilando entre el 12,20% en una población de *B. tournefortii* y el 28,03% para otra de *B. barrelieri*. También se encuentra el

Poblac. Acidos	<i>B. oxyrrhina</i>				<i>B. tournefortii</i>					<i>B. barrelieri</i>					<i>B. fruticulosa</i>			
	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
[C _{16:0}]	4,50	2,54	3,02	3,30	2,84	2,59	2,86	3,05	2,75	4,36	4,43	3,95	4,61	3,47	4,97	3,36	3,78	3,55
[C _{16:1}]	0,14	0,11	0,07	0,15	0,02	0,03	0,01	0,04	0,03	0,11	0,17	0,09	0,08	0,08	0,07	0,05	0,09	0,08
[C _{18:0}]	1,38	0,87	1,07	1,77	1,50	1,65	1,65	1,81	1,61	1,71	2,16	2,03	2,11	2,14	2,33	1,89	3,24	1,85
[C _{18:1}]	10,70	6,20	10,30	11,01	10,59	7,80	8,68	8,66	8,45	12,52	14,59	11,30	15,23	14,09	10,66	8,88	13,25	10,11
[C _{18:2}]	10,32	6,90	9,61	10,35	10,59	10,02	11,14	12,65	12,13	12,15	14,43	11,76	11,30	12,54	18,69	14,12	17,36	16,19
[C _{18:3}]	19,11	16,65	15,65	17,08	12,63	13,10	12,83	14,58	13,08	24,4	19,32	24,11	26,35	21,84	13,18	10,56	11,45	12,03
[C _{20:0}]	0,83	0,72	1,08	1,32	1,26	1,78	1,63	2,09	1,65	1,13	1,85	1,48	1,17	1,34	1,68	1,66	2,44	1,69
[C _{20:1}]	9,08	5,99	6,27	9,70	8,23	8,36	10,11	8,48	8,49	7,22	7,05	5,40	6,20	7,57	6,21	5,99	8,80	6,59
[C _{20:2}]	0,85	0,24	0,67	0,62	0,73	0,83	0,88	1,19	1,05	0,83	0,93	0,89	0,71	0,89	1,35	1,34	1,26	1,34
[C _{21:1}]	0,26	0,29	0,27	0,12	0,12	0,22	0,06	0,07	0,22	0,43	0,36	0,49	0,35	0,24	0,13	0,21	0,17	0,05
[C _{22:0}]	0,91	1,21	0,58	0,76	1,56	2,06	0,44	1,70	0,67	0,96	0,36	1,14	1,05	0,42	1,08	1,92	0,72	2,01
[C _{22:1}]	40,63	56,00	47,54	42,10	47,03	49,57	48,37	44,52	48,25	32,61	32,56	35,4	28,97	34,18	38,1	47,72	35,94	42,64
[C _{22:2}]	0,56	0,55	0,78	0,74	0,53	0,68	0,69	0,33	0,38	0,50	0,52	0,56	0,16	0,16	0,97	1,30	0,44	0,91
[C _{23:1}]	0,07	0,38	0,28	0,33	0,22	0,22	0,18	0,12	0,13	0,24	0,13	0,26	0,18	0,12	0,07	0,12	0,33	0,15
[C _{24:0}]	0,07	0,5	1,02	0,81	1,56	0,37	0,22	0,27	0,35	0,63	0,21	0,13	0,36	0,32	0,07	0,31	0,36	0,32
[C _{24:1}]	0,12	0,71	1,65	0,12	0,43	0,61	0,25	0,37	0,58	0,24	0,24	0,87	1,00	0,49	0,18	0,44	0,36	0,47
[C _{16:0}] _β	0,77	4,60	0,39	1,25	0,44	0,91	0,45	0,66	2,02	1,26	1,04	0,96	1,48	4,60	1,08	2,80	2,65	3,74
[C _{18:0}] _β	0,31	2,60	0,09	0,70	0,15	0,39	0,17	0,22	0,36	0,51	0,38	0,10	0,54	3,00	0,72	1,76	1,46	1,28
[C _{18:1}] _β	23,96	20,24	22,53	17,37	23,62	18,85	21,66	19,36	19,09	18,80	20,62	15,80	19,15	20,96	18,77	20,70	23,25	19,66
[C _{18:2}] _β	27,86	21,71	26,63	28,2	31,13	31,83	34,45	34,57	34,26	24,60	28,33	24,90	24,34	23,02	46,45	41,08	40,39	32,23
[C _{18:3}] _β	45,81	49,06	49,70	51,40	42,90	47,36	42,36	43,86	44,11	52,86	40,89	57,80	50,41	40,25	31,94	31,66	28,55	30,73
[C _{20:1}] _β	0,55	0,39	0,28	0,46	0,50	0,22	0,40	0,37	0,06	0,72	1,75	0,18	1,69	1,79	0,42	0,56	0,82	1,98
[C _{22:1}] _β	0,74	1,40	0,38	0,62	1,26	0,44	0,51	0,96	0,10	1,25	6,99	0,26	2,39	6,38	0,62	1,44	2,88	10,38

Cuadro 1. Composición en ácidos grasos totales y en posición β de los triglicéridos del aceite de las semillas. O, *B. oxyrrhina*; T, *B. tournefortii*; B, *B. barrelieri*; F, *B. fruticulosa*.

	Col.	Bras.	Camp.	Est.	Sit.	Δ^5 -Aven.	Δ^7 -Est.
O ₁	0,75	5,01	21,40	1,61	69,50	0,31	1,37
O ₂	1,32	7,96	20,70	2,73	64,30	2,64	0,33
O ₃	0,48	10,04	24,10	0,52	63,30	0,37	1,15
O ₄	1,14	9,05	24,99	0,7	62,75	0,31	1,04
T ₁	1,88	8,60	15,17	1,07	70,63	2,30	0,35
T ₂	3,00	9,58	16,90	2,30	61,30	2,63	3,85
T ₃	2,27	10,60	12,20	0,49	69,60	3,80	0,99
T ₄	1,79	8,93	18,37	0,84	66,90	1,99	1,10
T ₅	2,36	10,80	15,75	3,16	60,10	1,26	6,59
B ₁	1,28	11,77	19,66	1,27	64,00	1,20	0,76
B ₂	0,55	12,70	28,03	0,95	55,20	0,91	1,65
B ₃	1,18	11,26	23,80	1,06	61,03	1,13	0,63
B ₄	0,75	9,42	22,80	0,47	62,40	0,82	3,28
B ₅	0,97	10,98	22,30	1,22	60,60	1,10	2,80
F ₁	1,38	8,97	15,76	1,37	70,70	0,81	1,02
F ₂	1,49	15,86	18,81	0,50	60,47	2,54	0,33
F ₃	2,40	5,20	20,70	3,80	61,90	8,90	1,96
F ₄	1,59	11,30	17,60	0,17	67,23	1,96	1,15

Cuadro 2. Composición en esteroides libres (Col., Colesterol; Bras., Brasicasterol; Camp., Campesterol; Est., Estigmasterol; Sit., Sitosterol; Δ^5 -Aven., Δ^5 -Avenasterol; Δ^7 -Est., Δ^7 -Estigmasterol) del aceite de las semillas. O, *B. oxyrrhina*; T, *B. tournefortii*; B, *B. barrelieri*; F, *B. fruticulosa*.

brasicasterol, un esteroide característico en *Brassicaceae*, con unos valores que oscilan entre el 5,01% para *B. oxyrrhina* y el 15,86% para *B. fruticulosa*.

Con estos resultados se efectuó un análisis multivariante, calculándose la matriz de distancias euclídeas (Cuadro 3) y realizándose una representación en el espacio mediante los tres primeros componentes principales (Fig. 1).

Las diferencias de los contenidos en ácidos y esteroides separan las poblaciones estudiadas en cuatro grupos que se corresponden con las cuatro especies consideradas.

	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
O ₁	0																	
O ₂	8,213	0																
O ₃	7,153	7,003	0															
O ₄	6,034	7,160	6,239	0														
T ₁	6,864	7,901	6,172	6,487	0													
T ₂	7,777	7,483	7,400	6,639	5,938	0												
T ₃	6,937	8,849	7,701	6,772	5,061	5,439	0											
T ₄	6,363	8,715	7,384	6,090	5,305	4,444	4,257	0										
T ₅	7,795	8,494	7,903	7,393	7,251	4,023	6,033	5,499	0									
B ₁	5,586	7,730	6,460	4,895	6,872	7,080	7,426	6,464	7,420	0								
B ₂	7,331	10,522	8,359	6,808	9,691	9,379	9,518	8,119	8,954	5,685	0							
B ₃	7,398	8,161	6,403	6,114	8,563	7,131	8,585	6,898	7,812	3,720	6,616	0						
B ₄	6,757	9,206	6,957	6,890	8,453	8,425	9,073	7,588	8,326	4,336	5,628	4,956	0					
B ₅	7,492	8,468	8,454	7,271	8,772	8,712	8,726	7,757	7,892	6,165	5,745	7,602	5,336	0				
F ₁	7,232	10,898	9,368	8,181	8,019	7,940	6,923	5,712	7,784	7,462	8,281	8,163	8,605	8,751	0			
F ₂	8,815	9,198	8,269	8,101	7,742	6,818	7,125	6,221	7,665	7,842	8,367	8,143	9,341	8,323	5,962	0		
F ₃	9,736	11,178	11,117	9,451	9,362	8,680	8,730	8,113	8,675	9,525	9,173	10,329	10,098	8,858	8,228	9,243	0	
F ₄	8,503	9,732	9,126	8,077	7,801	7,801	7,661	6,295	8,531	7,977	7,684	8,945	8,413	6,911	6,417	5,465	8,862	0

Cuadro 3. Matriz de distancias euclideas.

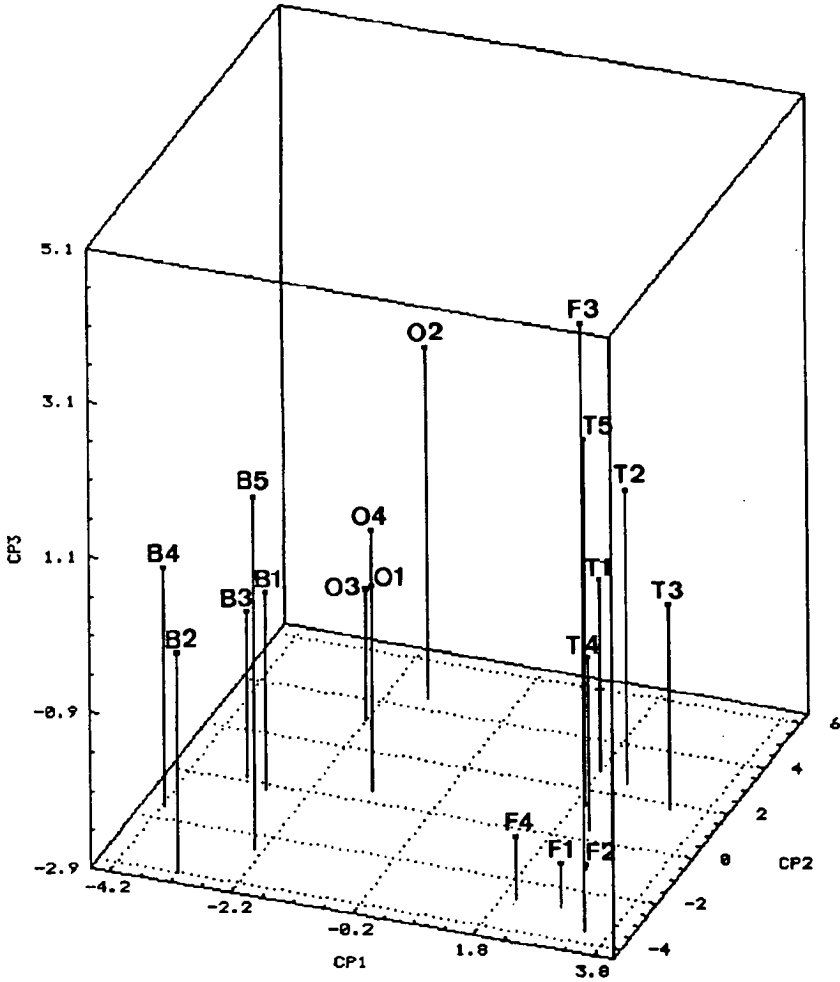


Fig. 1. Representación en el espacio según los tres primeros componentes principales de las 18 poblaciones estudiadas. O, *B. oxyrhina*; T, *B. tournefortii*; B, *B. barrelieri*; F, *B. fruticulosa*.

DISCUSION

A pesar de los márgenes de variación encontrados en la composición de algunos ácidos, los resultados que se han obtenido apoyan la delimitación de los cuatro taxones con respecto a los caracteres químicos considerados. Es preciso destacar que los grupos han podido separarse gracias a las diferencias cuantitativas de compuestos presentes en todas las poblaciones, ya que, como HOLMAN (1978) hizo notar, los ácidos grasos más comunes se encuentran en todos los seres vivos y por ello un estudio quimiotaxonómico basado en dichos compuestos debe llevarse a cabo desde un punto de vista cuantitativo y no cualitativo.

Según la bibliografía consultada (HILDITCH & al., 1964 y MILLER & al., 1965) los resultados no difieren mucho de los de otros representantes de la familia *Brassicaceae*, encontrándose los porcentajes dentro de los márgenes conocidos para esta familia. Así, es lógico que el ácido erúxico sea el mayoritario y que aparezca brasicasterol entre los esteroides más abundantes. También se confirmó la tendencia a aumentar los ácidos insaturados en posición β del triglicérido, observándose como mayoritario en esta posición al ácido linolénico (C_{18:3}).

En la composición química se observan diferencias y semejanzas cuantitativas, que no permiten establecer grados de parentesco, pero sí distinguir los cuatro taxones. Puede observarse que *B. oxyrrhina* y *B. tournefortii* tienen un porcentaje entre el 40 y el 50 % de ácido erúxico, mientras que en *B. barrelieri* no llega al 36 % en ningún caso (29-35 %). Igualmente *B. oxyrrhina* y *B. tournefortii* tienen un contenido en ácido oleico que no pasa del 11 % (7-11 %) y *B. barrelieri* tiene un contenido que varía entre el 11.3 y el 15 %. Pero, por otro lado, los niveles de linoleico en posición β están entre el 31 y el 35 % en *B. tournefortii* y entre el 22 y el 28 % en *B. oxyrrhina* y *B. barrelieri*. Es preciso hacer notar también el bajo porcentaje de linoleico en posición β de *B. fruticulosa*.

En cuanto a los esteroides también aparecen diferencias, como los valores de colesterol que agrupan por un lado a *B. oxyrrhina* y *B. barrelieri* y por otro a *B. tournefortii* y *B. fruticulosa*, o el caso del campesterol, que agrupa a *B. oxyrrhina* y *B. barrelieri* con porcentajes entre el 20 y el 28 % y separa a *B. tournefortii* que no llega al 19 % (12-18.4 %).

APENDICE

B. oxyrrhina. O₁.- Toledo. Velada, 7.VI.1989 Vioque y Pérez (SEV 128180). O₂.-Zamora. A 4 Km de Toro, 20.VI.1989 Vioque, Santa-Bárbara y Díaz (SEV-128181). O₃.- Salamanca. Entre Salamanca y Zamora. Km. 319, 12.VIII.1989 Vioque (SEV 128182). O₄.-

- PORTUGAL. Estremadura. Entre Pegoes y Marateca. Arenas, 28.IV.1989 *Diosdado y Vioque* (SEV-128179).
- B. tournefortii*. T₁.- Granada. Calahonda 18.IV.1989 *Vioque y Girón* (SEV 128177). T₂.- Almería. Próximo al Cabo de Gata (pueblo), 19.IV.1989 *Vioque y Girón* (SEV-128176). T₃.- Almería. Tabernas, 10.V.1989 *Diosdado y Vioque* (SEV 128178). T₄.- Almería. Aeropuerto, 19.IV.1989 *Vioque y Girón* (SEV-128175). T₅.- Alicante. Entre Torrevieja y Guadamar. Pinar, 20.IV.1989 *Vioque y Girón* (SEV 128174).
- B. barrelieri*. B₁.- Toledo. Entre Arenas de S Pedro y Talavera de la R^a. Próximo a Velada, 7.VI.1989 *Vioque y Pérez* (SEV 128173). B₂.- Zamora. A 1 Km del cruce de la carretera de Zamora con la de Benavente, 21.VI.1989 *Vioque, Santa-Bárbara y Díaz* (SEV 128172). B₃.- Cáceres. Casas del Castañar, 4.V.1989 *Vioque* (SEV 128169). B₄.- Ciudad Real. Castillo de Calatrava, 25.V.1989 *Vioque y Girón* (SEV 128170). B₅.- Zamora. Ricobayo. Salida hacia Alcañices, 21.VI.1989 *Vioque, Santa-Bárbara y Díaz* (SEV 128171).
- B. fruticulosa*. F₁.- Málaga. Salida de Nerja, 18.IV.1989 *Vioque y Girón* (SEV 128183). F₂.- Granada. Antes de Picena. 750 m., 10.V.1989 *Diosdado y Vioque* (SEV 128186). F₃.- Granada. Motril, 18.IV.1989 *Vioque y Girón* (SEV 128184). F₄.- Granada. Entre Válor y Ugíjar. 550 m., 10.V.1989 *Diosdado y Vioque* (SEV 128185).

BIBLIOGRAFIA

- CHAVEN, C., T. HYMOWITZ & C. A. NEWELL (1982) Chromosome number, oil and fatty acid content of species in the genus *Glycine* subgenus *Glycine*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59(1): 23-25.
- HILDITCH, T. P. & P. N. WILLIAMS (1964) *The chemical constitution of natural fats*. Chapman & Hall. London.
- HOGG, R. W. & F. T. GILLAN (1984) Fatty acids, sterols and hydrocarbons in the leaves from eleven species of Mangrove. *Phytochemistry* 23(1): 93-97.
- HOLMAN, R. T. (1978) Quantitative chemical taxonomy based upon composition of lipids. *Prog. Chem. Fats other Lipids* 16: 9-29.
- MATSUO, A., M. NAKAYAMA, M. MAEDA, S. HAYASHI & S. YASUDA (1973) Distribution pattern of sterols in liverworts belonging to the Jungermanniineae. *Phytochemistry* 12: 2413-2415.
- MIKOLAJCZAK, K. L., T. K. MIWA, F. R. EARLE & J. A. WOLFF (1961) Search for new industrial oils. V. Oils of Cruciferae. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38: 678-681.
- MILLER, R. W., F. R. EARLE & J. A. WOLFF (1965) Search for new industrial oils. XIII. Oils from 102 species of Cruciferae. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42: 817-821.
- NAGY, S. & H. E. NORDBY (1974) Fatty acids of triglycerides from Citrus juice sacs. *Phytochemistry* 13: 153-157.