



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE CINCO METODOS DE CONSERVACION
SOBRE EL PERFIL DE n-ALCANOS EN TRES GRAMINEAS Y
DOS LEGUMINOSAS DE CLIMA TEMPLADO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :
MARIA DEL ROCIO REYES REYES

ASESORES: Ph.D. SILVIA ELÉNA BUNTINX DIOS
Q. IRMA CRUZ GAVILAN GARCIA
M.V.Z. JUAN MANUEL HORTA RAMIREZ



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: Ph.D. Silvia Elena Buntinx Dios, Q. Irma Cruz Gavilán García, MVZ Juan Manuel Horta Ramírez, por guiarme y compartir su tiempo en todo momento.

A mi jurado: M. en C. Francisco A. Castrejón Pineda, MPA. Sergio Angeles, MVZ Lucas Melgarejo, por compartir sus conocimientos y experiencia.

Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, por permitirme trabajar en sus instalaciones.

A los profesores, ayudantes de profesor y laboratoristas que forman parte del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes, por sus consejos y sobre todo por su amistad.

A la MPA Aurora Hilda Ramírez Pérez, por su comprensión y cariño.

Al Q. Flavio Sinai Barajas Torres, por su paciencia, apoyo incondicional y amistad.

Al Ing. Emilio Eslava Plascencia, por compartir su tiempo, su experiencia y ayuda en todo momento.

Al proyecto PAPIIT IN205301, por el financiamiento brindado para la realización de este trabajo de investigación.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Consumo voluntario	3
2.2. Marcadores	4
2.2.1. Óxido de cromo	5
2.2.2. n-Alcanos	6
2.3. Características fisicoquímicas de los n-alcanos	8
2.4. Cera cuticular de las plantas	9
2.5. Cromatografía de gases	10
2.6. Gramíneas	12
2.6.1. <i>Dactylis glomerata</i>	14
2.6.2. <i>Lolium perenne</i>	15
2.6.3. <i>Pennisetum clandestinum</i>	15
2.7. Leguminosas	16
2.7.1. <i>Medicago sativa</i> var. Puebla 76	16
2.7.2. <i>Trifolium repens</i>	17
2.8. Métodos de conservación de la muestra para análisis de laboratorio	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1. Fase de campo	21
6.2. Fase de laboratorio	22
6.3. Análisis de la información	24
7. RESULTADOS	26
7.1. Perfil de n-alcanos	26

	Página
7.1.1. Alfalfa	26
7.1.2. Kikuyo	28
7.1.3. Orchard	30
7.1.4. Ryegrass	30
7.1.5. Trébol	33
7.2. Concentración del n-alcano C ₃₁	33
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	42
10. RECOMENDACIONES	43
11. LITERATURA CITADA	44
12. ANEXOS	50
12.1. Técnica para la determinación de n-alcanos por cromatografía de gases	50
12.2. Preparación del estándar interno C ₃₄	52
12.3. Preparación de los estándares para la curva de calibración	53
12.4. Preparación de la columna de sílica gel	54
12.5. Preparación de la solución hidroalcohólica KOH 1M	55

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Rango de concentraciones (mg/kg MS) de n-alcanos en la cera cuticular de cinco forrajes de clima templado.....	6
Cuadro 2. Cantidad de muestra (gramos de materia seca) utilizada de cinco forrajes sometidos a cinco métodos de conservación	23
Cuadro 3. Perfil de n-alcanos en la cera cuticular de la alfalfa (<i>Medicago sativa</i> var. Puebla 76).....	27
Cuadro 4. Perfil de n-alcanos en la cera cuticular del pasto kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>).....	29
Cuadro 5. Perfil de n-alcanos en la cera cuticular del pasto orchard (<i>Dactylis glomerata</i>).....	31
Cuadro 6. Perfil de n-alcanos en la cera cuticular del pasto ryegrass (<i>Lolium perenne</i>)	32
Cuadro 7. Perfil de n-alcanos en la cera cuticular del trébol (<i>Trifolium repens</i>).....	34
Cuadro 8. Concentración del n-alcano C ₃₁ en cinco forrajes con cinco métodos de conservación	35
Cuadro 9. Análisis de varianza para la concentración del n-alcano C ₃₁ en cinco forrajes con cinco métodos de conservación	35
Cuadro 10. Análisis de varianza para la concentración del n-alcano C ₂₉ en trébol	36
Cuadro 11. Concentración del n-alcano C ₂₉ del trébol con cinco métodos de conservación.....	37
Cuadro 12. Estándares de n-alcanos	52
Cuadro 13. Cantidad calculada de cada n-alcano	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de la cutícula de una hoja de <i>Pyrus communis</i> mostrando diferentes capas	10
Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de gases	11
Figura 3. Cromatograma	12
Figura 4. Esquema general de plantas gramíneas	13
Figura 5. Espiguilla	14
Figura 6. Trébol blanco mostrando parte de un estolón.	17
Figura 7. Columna de sílica gel	56

REYES REYES MARÍA DEL ROCÍO. Efecto de cinco métodos de conservación sobre el perfil de n-alcenos en tres gramíneas y dos leguminosas de clima templado. Bajo la asesoría de Silvia Elena Buntinx Dios, Irma Cruz Gavilán García y Juan Manuel Horta Ramírez.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) encontrar el método de conservación que, comparado con el de nitrógeno líquido, no altere la concentración del C₃₁ (n-hentriacontano) y 2) determinar el perfil de n-alcenos cuticulares (C₂₅ a C₃₅) de tres gramíneas (kikuyo, orchard y ryegrass) y dos leguminosas (alfalfa y trébol) de clima templado. Se tomó una muestra de cada planta, se dividió en cinco partes, y cada parte se sometió a uno de cinco métodos de conservación: hielo (H), hielo seco (HS), nitrógeno líquido (NL), secado en papel periódico (PP) y secado al sol (SS). Las muestras se liofilizaron, excepto los de SS; posteriormente, todas se molieron y se extrajeron los n-alcenos (extracción Soxhlet, saponificación con una solución hidroalcohólica KOH 1M, purificación en una columna de sílica gel, deshidratación y resuspensión) que se analizaron cromatográficamente. Las muestras se trabajaron por triplicado (tres repeticiones por combinación forraje/tratamiento) y por cada repetición se realizaron tres inyecciones, cuyos resultados se promediaron. Se perdió una repetición del tratamiento en hielo de la muestra del trébol, por lo que el número total de observaciones fue n=74. Los datos obtenidos de la concentración de C₃₁ (mg/kg MS) se analizaron mediante un análisis de varianza para un diseño completamente al azar en arreglo factorial: cinco forrajes x cinco métodos de conservación. La comparación entre medias se hizo a través del método de Bonferroni (P<0.05). El perfil de n-alcenos fue diferente entre especies; predominaron los n-alcenos de cadena impar; la cantidad (mg/kg MS) del n-alceno C₃₁ para cada forraje fue: alfalfa, 290.80; kikuyo, 261.16; orchard, 37.03; ryegrass, 166.18 y trébol, 27.25. El método de conservación alteró la concentración de C₃₁ en los forrajes, excepto orchard y trébol, disminuyéndola o aumentándola en comparación con el trébol en NL, por lo que se concluye que la congelación en nitrógeno líquido parece ser el método más confiable para la conservación del forraje que será sometido al análisis de n-alcenos cuticulares.

1. INTRODUCCIÓN

Los forrajes han sido y seguirán siendo una fuente sostenible de nutrientes para la alimentación de los rumiantes domésticos, que son utilizados por el humano para la producción de leche, carne y lana (22, 39). Existen dos sistemas de producción animal: intensivo, en el cual se ofrece a los animales forraje y concentrado, y extensivo, en el cual el animal obtiene su sustento mediante el pastoreo (59). En pastoreo, la ingestión del forraje está limitada por la digestibilidad, especie y variedad vegetal, estación del año, alternancia de corte, especie y estado fisiológico del animal (40). Una pradera de baja calidad nutrimental disminuye el rendimiento de los animales por tres factores fundamentales: concentración limitada de nutrimentos, menor digestibilidad de los mismos y reducción del consumo de forraje (22). Por otro lado, en clima templado, los rumiantes domésticos consumen mayor cantidad de leguminosas que gramíneas, porque las leguminosas tienen menor resistencia al desmenuzamiento durante la masticación y la rumia. Además, se sabe que los cambios en la maduración de la planta afectan el consumo voluntario, cuando la proporción del tallo es mayor que la de las hojas (39).

El ganado tiene la particularidad de seleccionar lo que consume y, por lo general, lo hace sobre el forraje más suave y las especies más nutritivas; incluso dentro de una pastura de buena calidad, el animal ejerce selección bocado a bocado (22), aunque la selección también depende de la variación del apetito día a día y de la disponibilidad del forraje (39).

Se han realizado diversos estudios para estimar la cantidad de forraje consumido por el animal en pastoreo; sin embargo, debido a los factores mencionados, ha sido difícil el encontrar un procedimiento que indique con precisión la cantidad y, principalmente, el forraje que consume el animal.

2. ANTECEDENTES

2.1. Consumo voluntario

El consumo voluntario (CV) se define como la cantidad de materia seca de un forraje o la cantidad total de un alimento que consume el animal en un día (o en un periodo de tiempo) sin interferencia del cuidador (14, 39).

Para determinar el CV se han usado diversos métodos, desde establecer la composición física y química del forraje, técnicas de digestión *in vivo* e *in vitro*, hasta evaluaciones con modelos matemáticos (14, 39). Uno de ellos, fue observar el cambio en el peso vivo de los animales, tomar el peso de éstos antes (W_1) y después (W_2) de pastorear, considerar la pérdida del peso corporal por la excreción de heces (H), orina (O), pérdidas insensibles (I) y considerar el agua que bebían los animales (A), con la siguiente ecuación:

$$\text{Consumo} = (W_2 + H + O + I) - W_1 - A$$

El principal problema es la pérdida insensible del peso, que está influida por las condiciones ambientales (39) y por diferencias en la tasa metabólica, en el contenido intestinal y en la tasa de fermentación por parte del animal (36).

Otro método es ver el comportamiento que tienen los animales al pastorear: el tiempo de pastoreo (T), el número de mordidas por unidad de tiempo (R) y el promedio del tamaño de cada mordida (S), con la ecuación (39):

$$\text{Consumo} = T \times R \times S$$

Puesto que se necesita una persona que monitoree el número de mordidas durante el día, ésta es una técnica inexacta, ya que el tamaño de la mordida no es constante. Por otro lado, el periodo de observación puede ser muy largo y es difícil vigilar el número de mordidas sin llegar a perturbar al animal (23, 36). Actualmente existen equipos electrónicos (fotográfico, de video, switches) para determinar si el movimiento de la mandíbula está

asociado a la mordida, a la masticación o a la rumia, pero todo esto aumenta el costo de la investigación y no indica qué tipo de forraje consume el animal (36, 39).

En 1934, Garrigus describió un método para estimar el consumo voluntario, mediante la cantidad total de heces recolectadas (en bolsas de lona adaptadas a animales estabulados) y la digestibilidad aparente de la materia seca (DMS) del forraje (39):

$$\text{Consumo MS} = \frac{\text{Producción total de heces}}{1 - \text{DMS}}$$

Para utilizar este método se requiere de un muestreo representativo de toda la dieta, así como de evitar que las heces caigan fuera de la bolsa (36). Este método es laborioso y requiere del control preciso de varios elementos, siendo finalmente inconveniente porque puede interrumpir el comportamiento normal de los animales en pastoreo (39).

2.2. Marcadores

La técnica de marcación se ha utilizado para estimar la producción fecal, mediante la administración diaria de una cantidad conocida de un marcador, y en una muestra representativa de las heces se determina la concentración de éste (39):

$$\text{Producción diaria de heces (g/d)} = \frac{\text{marcador administrado (mg/d)}}{\text{marcador en heces (mg/d)}}$$

El marcador no debe ser alterado a su paso por el tracto digestivo y debe recuperarse completamente en las heces. Puede ser un constituyente natural del forraje (sílice, hierro, lignina, pinitol, calcio, celulosa, n-alcanos), en cuyo caso se conoce como marcador interno, o puede ser agregado a la dieta como marcador externo (sesquióxido de cromo, sulfato de bario, óxido de titanio, polietilenglicol) (36, 39, 50).

2.2.1. Óxido de cromo

El marcador externo más usado ha sido el sesquióxido de cromo (Cr_2O_3), el cual se administra una o dos veces al día, ya sea en cápsulas de gelatina, papel impregnado con Cr_2O_3 , pelets o en cápsulas intrarruminales, que liberan el óxido de cromo durante un periodo de tres semanas. El problema del Cr_2O_3 es que su excreción en las heces a veces no es completa y presenta una variación diurna, lo que provoca un error en la estimación del consumo. Sin embargo, estos factores de error se aminoran si se administra dos veces al día (14, 39).

Una vez estimada la producción fecal, es necesario determinar la digestibilidad de la materia seca del forraje consumido, lo que generalmente se hace a través del método de Tilley y Terry, mejor conocido como digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) (59). Con la información sobre producción fecal y DIVMS, el CV se calcula siguiendo la fórmula de Garrigus, de la siguiente manera (39):

$$\text{Consumo voluntario (kg/d MS)} = \frac{\text{producción fecal (kg/d MS)}}{1 - \text{DIVMS}}$$

La limitante de la técnica Cr_2O_3 -DIVMS para la estimación del consumo radica en la metodología de DIVMS más que en el uso del Cr_2O_3 , que ha probado ser un marcador confiable para estimar la producción fecal. La determinación de la DIVMS de un forraje es más complicada. Primero está el problema del muestreo del forraje, porque se necesita tener una muestra lo más representativa posible de lo que el animal selecciona. La mejor manera de lograr esto es tener animales fistulados esofágicamente y tomar muestras directamente del esófago mientras el animal come. Sin embargo, la técnica es invasiva y cada vez se justifica menos realizar este procedimiento en los animales. Otra opción es obtener muestras manuales del forraje: se sigue a los animales y se corta el forraje de áreas adyacentes al pastoreo. El problema de esta técnica, que se conoce como “handplucking”, es que la muestra tomada de esta manera no va a ser tan representativa como la muestra esofágica. El segundo problema es el resultado de digestibilidad del forraje, porque es el mismo para todos los animales y no considera la variación individual (12, 23, 36).

2.2.2. n-Alcanos

Un reciente desarrollo para tratar de resolver los problemas de la técnica Cr₂O₃-DIVMS ha sido el uso de la relación entre un n-alcano sintético de cadena par (n-C₃₂) y un n-alcano natural (presente en el forraje) de cadena impar (principalmente n-C₃₁ o n-C₃₃). En las investigaciones realizadas sobre n-alcanos (15, 30, 33) se ha encontrado que los principales alcanos detectados en el forraje son de cadena larga (C₂₁ a C₃₅), encontrándose en mayor cantidad los n-alcanos de cadena impar que los n-alcanos de cadena par (Cuadro 1).

Cuadro 1. Rango de concentraciones (mg/kg MS) de n-alcanos en la cera cuticular de cinco forrajes de clima templado

Forraje	n-alcano (mg/kg MS)											Ref.
	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅	C ₃₆	
Alfalfa			36	9	202	12	324	7	21	0		33
		13	55		207		103		8			10
Kikuyo	17.4		21.7		25.2		84		141.4	103.3		55
	2.7		5.2		9.3		34.5		69.7	35.8		55
	10.9		16.4		26.2	8.3	204.7	10.4	240.7	105.9	4.9	48
Orchard			20	2	38	2	58	2	21	0		33
Ryegrass			36	6	142	12	220	7	99	9		33
	6		29	11	159	18	317	10	149	11		12
			19	5	73	9	137	9	116	18		12
			26	7	163	14	261	8	110	7		12
	6		20		109		215		141	12		10
Trébol			38	7	109	5	67	1	7	0		55
			19		75		66		5	0		12
	4		12	6	88	4	55	3	26	5		12

Mayes y colaboradores (37) indicaron que la recuperación fecal de los n-alcanos de cadena impar era incompleta, por eso trabajaron con la relación de los n-alcanos C₃₁:C₃₂ o C₃₂:C₃₃, ya que estos tienen una recuperación fecal similar porque las longitudes de cadena varían sólo en un carbono. Sus resultados y los de otros investigadores (11, 14) han sugerido que

la estimación del consumo con n-alcanos en comparación con la técnica Cr₂O₃-DIVMS es más precisa.

La ventaja de la técnica de los n-alcanos con respecto al uso del Cr₂O₃ es que no se necesita una estimación de la digestibilidad, además de que el n-alcano dosificado (de cadena par) puede administrarse solamente una vez al día. Sin embargo, si junto con el n-C₃₂ se proporciona otro n-alcano (C₃₆) u Cr₂O₃ como marcadores externos, entonces se estimará el consumo voluntario y la producción fecal de cada animal. Con esta información se puede estimar la digestibilidad de la materia seca del forraje (32, 39):

$$\text{DMS (\%)} = \frac{\text{MS consumida} - \text{MS excretada}}{\text{MS consumida}} \times 100$$

Así, se puede obtener para cada animal una determinación de digestibilidad, lo que hace a esta técnica muy atractiva, desde el punto de vista de investigación. Además, si se conoce el perfil de n-alcanos de los forrajes que los animales consumen y se obtiene el perfil de n-alcanos de las heces de los animales, puede llegarse a identificar, por medio de modelos matemáticos, la composición botánica de la dieta (10, 37). Esto es una ventaja que, hasta ahora, ninguna otra técnica de marcadores podía ofrecer. Por todo lo anterior, es importante conocer las concentraciones individuales de n-alcanos de las especies forrajeras.

Los n-alcanos que se encuentran en la cera cuticular de las plantas son insolubles en agua, fáciles de identificar y se encuentran en cantidades suficientes para permitir su estimación. Se ha trabajado también con alcoholes de cadena larga y β-dicetonas, presentes en la cera cuticular, como marcadores, pero su análisis es difícil y no están disponibles sus análogos sintéticos (10, 14, 39).

La desventaja de los n-alcanos es su recuperación en las heces, porque puede variar de acuerdo con la edad, estado fisiológico y especie del animal. Así también, la concentración de n-alcanos puede variar en el forraje con relación a la especie, variedad, edad y parte de la planta (15, 37).

2.3. Características fisicoquímicas de los n-alcenos

Los n-alcenos son hidrocarburos que contienen solamente enlaces sencillos. Tienen el mayor número posible de átomos de hidrógeno por átomo de carbono y se les denominan hidrocarburos saturados. El prefijo "n" indica que son estructuras lineales. Se pueden escribir diversas fórmulas generales:



Los alcanos son notablemente regulares en sus características estructurales. Los átomos de carbono son tetraédricos, con ángulos de enlace cercanos a 109° y longitudes de enlace $C-H \approx 1.10 \text{ \AA}$ y $C-C \approx 1.54 \text{ \AA}$, muy constantes (4, 61).

Los n-alcenos son moléculas no polares; por ello son casi completamente insolubles en agua, pero se disuelven fácilmente en otros disolventes no polares. Además, tienden a ser menos volátiles al aumentar el peso molecular, debido a las fuerzas de dispersión de London. Estas fuerzas se refieren a la correlación de electrones, lo que causa la atracción entre moléculas de alcanos. Por lo tanto, su punto de fusión, punto de ebullición y densidad se incrementan al aumentar el peso molecular a causa de una mayor atracción de dichas moléculas (4, 61). Sin embargo, estas fuerzas son todavía relativamente débiles, e incluso los alcanos de peso molecular elevado tienen puntos de fusión relativamente bajos, como los alcanos lineales $C_{29}H_{60}$ y $C_{31}H_{64}$, que poseen puntos de fusión menores a 70°C . A temperatura ambiente (25°C), los hidrocarburos de menor peso molecular son gases o líquidos incoloros y los hidrocarburos de mayor peso molecular son sólidos con apariencia de ceras (61).

Los alcanos son poco reactivos. Por ejemplo, a temperatura ambiente no reaccionan ni con ácidos, ni con bases, ni con oxidantes fuertes, ni son atacados por el ácido nítrico hirviendo. Una razón de su baja reactividad química es la fuerza de los enlaces carbono-carbono (C-C) y carbono-hidrógeno (C-H). Sus reacciones más importantes son la combustión (ruptura de

enlaces) y la halogenación (reacción de sustitución de flúor, cloro y bromo por un hidrógeno) (4).

Los n-alcanos son los componentes más ampliamente distribuidos, principalmente en la cera cuticular de las plantas e insectos. En muchas de las plantas, cerca del 50% del total de la cera son n-alcanos (2).

2.4. Cera cuticular de las plantas

Chibnall y colaboradores, por los años 30's del siglo pasado, demostraron la presencia de n-alcanos en la cera cuticular de las plantas (14). El término "cera" es usado para describir una mezcla de lípidos cubriendo la superficie de la planta; también se usa el término cutina (2).

La cera da un aspecto lustroso a muchas hojas y frutos, siendo muy importante en la impermeabilización de la superficie del órgano (reduce la pérdida de agua); protege a la planta de lesiones por el viento, abrasiones físicas y heladas. Es la primera barrera contra insectos, hongos y otros patógenos, y sirve de filtro contra la radiación solar (2, 34, 43).

La epidermis (Figura 1) es la capa celular más externa en hojas, tallos, frutos, semillas y raíces. En la cara externa de las células epidérmicas se encuentra una capa de pectina muy pura que separa la pared celular de la cutícula y se denomina capa de pectina. La **cutícula** (≥ 0.5 mm de ancho) se encuentra sobre la pared celular de las células epidérmicas y está en contacto con el medio externo, constituida por cutina y una capa cuticular (0.1–0.5 mm de ancho). Existen dos tipos de cera: epicuticular (sobre la superficie cuticular) e intracuticular (en la matriz de la cutina). La cera intracuticular está compuesta principalmente por monómeros de cadena corta (C_{18}) (35, 43).

La **cera cuticular** está constituida por una mezcla compleja de ácidos grasos de cadena larga; los hidrocarburos son principalmente n-alcanos, estos pueden presentarse en forma

de gránulos, bastoncillos, placas irregulares o disponerse en láminas continuas. La mayoría de estos compuestos se encuentran en cadenas largas de 21 a 35 carbonos, los cuales pueden ser fácilmente removidos sin dañar la membrana subyacente con disolventes orgánicos. También en menor proporción se encuentran alcanos ramificados y alquenos, alcoholes primarios, secundarios y α - ω -dioles, cetonas, monocetonas, β -dicetonas e hidroxi β -dicetonas (en algunas ceras) (30, 34, 43).

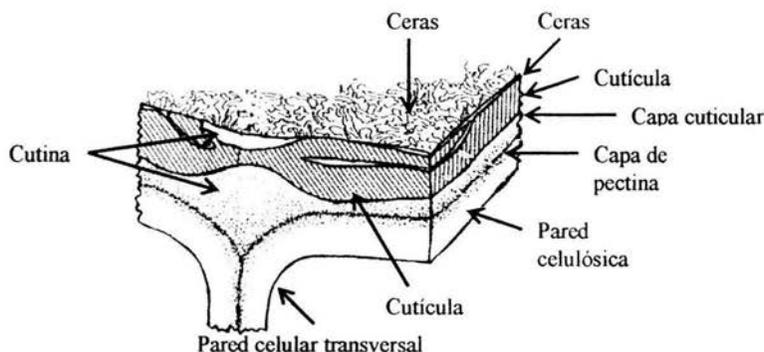


Figura 1. Esquema de la cutícula de una hoja de peral (*Pyrus communis*) mostrando diferentes capas (43)

2.5. Cromatografía de gases

El método de elección para la identificación de los n-alcanos ha sido la cromatografía de gases (CG). Es un método de análisis para compuestos orgánicos térmicamente estables, volátiles y que están presentes en una muestra (como ejemplo, los n-alcanos que se encuentran en la cera cuticular de las plantas). El fundamento de la técnica involucra una distribución diferencial de los componentes entre dos fases: fase estacionaria y fase móvil; ésta última usualmente es un gas inerte o un líquido (46, 47).

Las partes básicas del cromatógrafo son (38, 41, 46, 47, 58) (Figura 2):

- ▶ Gas de arrastre: transporte por el cual la muestra circula a lo largo de la columna.
- ▶ Puerto de inyección: es donde se lleva a cabo la introducción de la muestra usando una jeringa a través de un tapón elástico, septo para evitar que la muestra se escape.
- ▶ Columna: se encuentra dentro del horno; su fase estacionaria, diámetro y largo influyen en la eficiencia de separación y rapidez del análisis.
- ▶ Detector: indica la presencia y cantidad de componentes que salen de la columna; es selectivo y altamente sensible a ciertos compuestos (dependiendo del tipo de detector).
- ▶ Registrador: permite obtener un registro gráfico de los componentes.

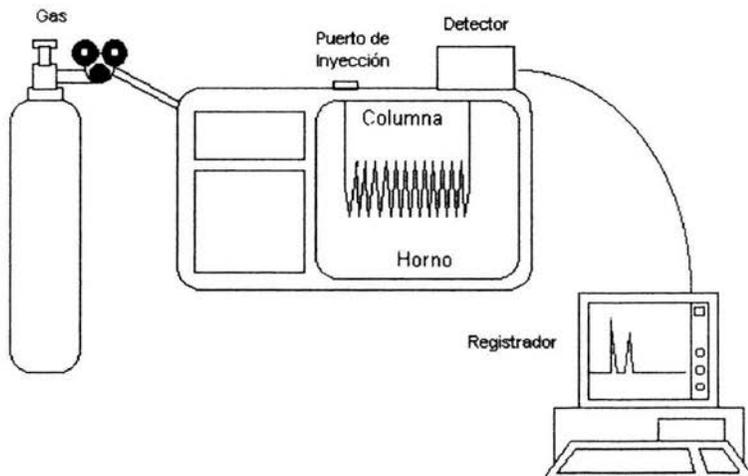


Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de gases (8)

El procedimiento para la preparación de muestras y su análisis cromatográfico es el siguiente:

- ▶ Muestreo: Consiste en separar aleatoriamente la muestra del resto del material.
- ▶ Purificación: consiste en la extracción, concentración y aislamiento de los componentes de la muestra.
- ▶ Análisis cromatográfico: es el paso final que permite la identificación y cuantificación de los compuestos de la muestra (45). Se inyecta la muestra (1 μ l es suficiente para el

análisis), ésta se volatiliza y es acarreada por la fase móvil y el gas de arrastre a través de la columna, donde tiene lugar la separación de los componentes.

Si tenemos una muestra A+B+C que se desea separar y se sabe que “C” es un compuesto retenido más fuertemente que “B” y éste más que “A”, entonces “A” saldrá primero de la columna, seguido de “B” y, finalmente, de “C”. A esto se le conoce como tiempo de retención. La información de estos compuestos pasan al detector, el cual responde a la cantidad o concentración del analito; como se utiliza una cantidad tan pequeña de la muestra (μg), el CG responde con una alta sensibilidad.

Toda esta información llega a un registrador, donde se obtiene el resultado del análisis de una manera gráfica, conocida como cromatograma (Figura 3), donde se espera una resolución alta, esto es, que los picos y las bases de los componentes estén definidos y separados. Durante todo el proceso, el sistema está a una temperatura suficiente para mantener a los componentes de la muestra en fase de vapor (27, 47).

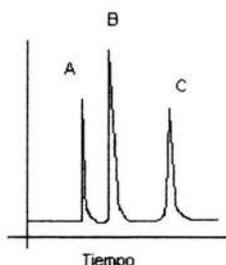


Figura 3. Cromatograma (57)

2.6. Gramíneas

La familia de las gramíneas es una de las más importantes del reino vegetal, porque junto con ellas se asocian hierbas subdominantes, que dan a la pradera una distribución de sociedades mixtas; además, están formadas por un gran número de géneros y especies (22).

Las gramíneas son monocotiledóneas (embrión con un cotiledón). Tienen tres hábitos de crecimiento: matas, macollo, césped. En cuanto a la altura que alcanzan se dividen en: pastos bajos (10 – 45 cm), medianos (60 – 120 cm) y altos (150 – 250 cm). Son anuales o perennes, tienen raíces fibrosas, los tallos pueden ser rastreros (estoloníferos) o subterráneos (rizomas) (Figura 4). La hoja está constituida por la vaina que envuelve al tallo y la lámina o limbo, que se desprende de la vaina, suele ser larga y estrecha. Entre la vaina y el limbo se encuentra la ligula (pequeña membrana a modo de prolongación de la vaina) y aurículas (prolongaciones del limbo) (40). La unidad de la inflorescencia es la espiguilla (Figura 5), habiendo tres tipos básicos: espiga, racimo y panícula. El fruto de las gramíneas suele ser un grano o cariópside. La forma del grano es un criterio importante de identificación de la especie (22, 40). Para el presente estudio, se describen tres gramíneas.

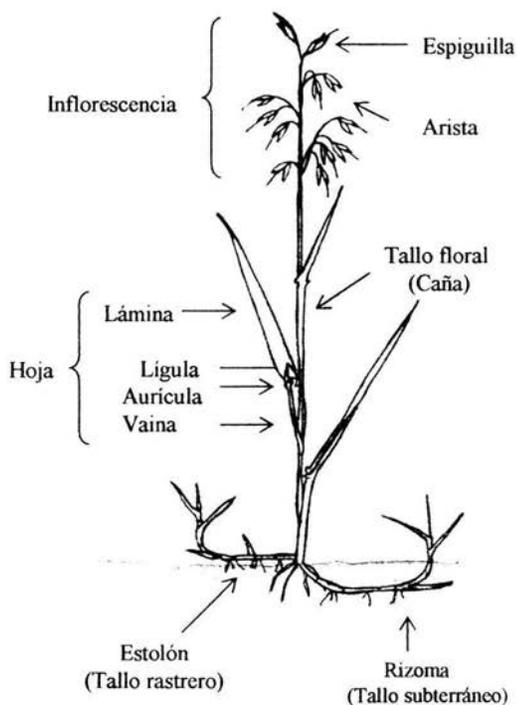


Figura 4. Esquema general de plantas gramíneas (40)

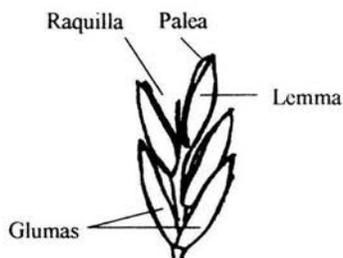


Figura 5. Espiguilla (40)

2.6.1. *Dactylis glomerata*

- *Sinónimos*: orchard, pata de gallo (16, 44).
- *Distribución geográfica*: nativa de Europa (centro y oeste), Asia (este) y norte de África; introducida en América del Norte. En la República Mexicana se encuentra principalmente en Coahuila, San Luis Potosí, Puebla, Oaxaca, Chiapas (16, 44, 52).
- *Descripción*: planta perenne de tallo erecto (20 – 120 cm de altura); lámina alargada, plana, puntiaguda; no tiene aurícula; lígula membranácea, grande, irregular; hojas sin vellos, plegadas, de color grisáceo o azulado, con nervadura central muy marcada; espiguillas de pocas flores (3 a 6), dispuestas en extremos de las pocas ramas que constituyen la panícula; glumas desiguales; palea más corta que el lema; raíces subterráneas (pequeños rizomas), de crecimiento amacollado (9, 16, 22, 40, 44, 52).
- *Características*: resistente a heladas y sequías (no a sequías prolongadas); florece en tierras fértiles; usada para pastura, heno y ensilado. Crece mejor durante el otoño; parcialmente tolerante a la sombra; presenta buena adaptación bajo condiciones semihúmedas (16, 22, 44).

2.6.2. *Lolium perenne*

- *Sinónimos*: ryegrass perenne, raigrass inglés, zacate centeno, zacate americano, ballico perenne (17, 22, 52).
- *Distribución geográfica*: nativa de Europa, introducida en el norte de África, en zonas templadas de Asia, norte y sur de América. En México se puede localizar en Baja California, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Tamaulipas (17, 22, 52).
- *Descripción*: planta perenne, robusta, de talla mediana, sin vellosidades. El tallo es un poco aplanado y rojizo, alcanza de 10 a 60 cm de altura, ramificado en la base. Las hojas están dobladas en estado joven, después son planas de color verde oscuro y con envés muy brillante, de 5 a 15 cm de largo; la lígula es corta, las aurículas estrechas; la vaina es lisa y está bien marcada. La inflorescencia es en espiga erecta, de 10 a 20 cm de largo; presenta varias flores (6 a 10), solitarias; primera gluma ausente; lema a veces aguda o con aristas cortas; palea de color verde, ligeramente más corta que la lema. Raíces densamente fasciculadas, que alcanzan 1 – 1.5 m de profundidad; de tallos subterráneos; crece en forma amacollada (9, 17, 22, 52).
- *Características*: resistente al pastoreo; menos susceptible al frío que el ryegrass italiano y sensible a las altas temperaturas. En México se ha observado que temperaturas de 5°C no afectan mucho su producción. Crece en tierras drenadas, se cultiva en zonas templadas (17, 22, 52).

2.6.3. *Pennisetum clandestinum*

- *Sinónimos*: zacate kikuyo, pasto africano (53).
- *Distribución geográfica*: nativa de Zaire y Kenia, introducido en Sudamérica, Australia, Estados Unidos, Guatemala. En México se puede encontrar en el Distrito Federal, Morelos, Veracruz, Tlaxcala, Chihuahua (19, 53).
- *Descripción*: perenne, tallo de 3 a 15 cm de alto (puede llegar a 45 cm), cubierto de vellosidades; láminas planas triangulares; la lígula presenta un anillo ciliado, las vainas son

quilladas. La inflorescencia presenta numerosas espigas, flor pequeña; primera gluma ausente, segunda gluma ausente o reducida. Raíces con rizomas y estolones (19, 53).

- *Características*: rústico, de fácil propagación; resistente al pastoreo, sequía, frío y humedad; se adapta a diversas calidades de suelo (22)

2.7. Leguminosas

La familia de las leguminosas es uno de los grupos más extensos del reino vegetal; la gran mayoría vive en simbiosis con bacterias (*Rhizobium*) fijadoras de nitrógeno libre en la atmósfera del suelo. Forman numerosas nudosidades en las raíces; así enriquecen los suelos y permiten cosechas más abundantes de pastos y cereales. Son dicotiledóneas (embrión con dos cotiledones), pueden ser anuales, bianuales o perennes.

Las hojas están dispuestas alternadamente, pueden ser simples o compuestas y es característico que tengan grandes estípulas (Figura 6). Las hojas trifoliadas son características de tréboles y medicagos. Los tallos varían en longitud, grado de ramificación y lignificación. La mayoría de las leguminosas tiene raíces pivotantes. Las flores están en racimos, cabezuelas o racimos que parecen espigas. El fruto es una vaina que puede contener una o varias semillas (22, 40).

Para el presente estudio se describen dos leguminosas:

2.7.1. *Medicago sativa* var. Puebla 76

- *Sinónimos*: alfalfa, alfalfa púrpura (18).

Distribución geográfica: ampliamente distribuida en zonas templadas de todo el mundo (18). La variedad Puebla 76 fue creada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (actualmente Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) en 1976; se puede localizar en el Bajío, Puebla y Estado de México (5, 22).

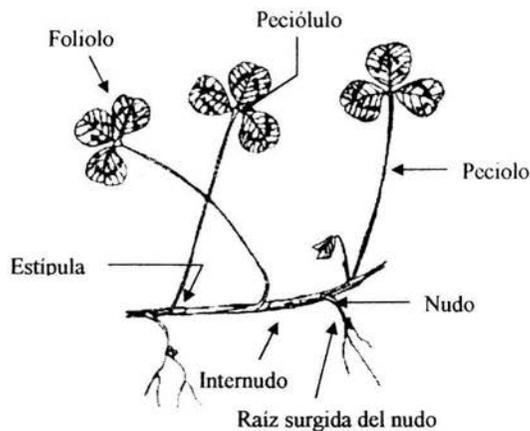


Figura 6. Trébol blanco mostrando parte de un estolón. Las estípulas membranosas que abrazan el estolón son características de esta especie (40)

- *Descripción*: erecta o ascendente, 56 cm de altura promedio. Hojas trifoliadas alternadas, inflorescencias con racimos compactos, flores púrpura, raíces profundas (18, 22).
- *Características*: de clima templado o templado frío. Conservación en heno o ensilado. Temperatura óptima de crecimiento entre 15 y 25°C; resistente al frío (7, 18).

2.7.2. *Trifolium repens*

- *Sinónimos*: trébol blanco, trébol rastrero, trébol ladino, trébol amargo (20).
- *Distribución geográfica*: nativa de Europa y Asia menor. Mundialmente distribuido en zonas templadas (20, 44).
- *Descripción*: planta perenne, rastrera, de tallos estoloníferos, los estolones inician en la axila de la hoja (se forman raíces en los nudos). Las hojas son trifoliadas, con folíolos ovales entre sí, sin ninguna vellosidad. Puede o no presentar una mancha clara en los folíolos. Las inflorescencias son globulares, conteniendo de 50 a 200 flores blancas o blanco-rosadas (6, 20, 22, 40).

- *Características*: usado para pastoreo y heno; palatable; requiere fósforo, potasio y calcio. De clima templado, pero crece bien en regiones frías (20, 44).

2.8. Métodos de conservación de la muestra para análisis en laboratorio

Para llevar a cabo una investigación científica en plantas, por lo general se necesita un medio de transporte o de almacén para conservarlas.

Al momento de realizar un muestreo del forraje, se busca reducir la temperatura para su almacenaje; por ejemplo, las leguminosas y gramíneas a una temperatura de 2-6°C pueden durar aproximadamente un año en buenas condiciones (64).

El método de conservación de uso más común es el nitrógeno líquido. Por la temperatura que alcanza (-196°C), casi cesa por completo la actividad bioquímica y hay un menor riesgo de que se presenten cambios fisiológicos y genéticos en las muestras (4,21). También se usa la refrigeración (5°C o menos) para almacenar las muestras durante unos años (64). El hielo seco, de igual manera, se utiliza como un medio de conservación para transportar alimentos (28).

Otros métodos de conservación en los cuales no se ve involucrada la disminución de temperatura, es por medio de la deshidratación de las muestras, ya sea por el simple secado al sol, que prácticamente no requiere de ningún costo adicional y no se necesita de estructuras permanentes (42), y por el papel, que permite la evaporación del agua, impidiendo que la humedad favorezca el crecimiento de microorganismos que descompondrían la muestra (59).

La conservación que se haga de la muestra es importante, pues si no se trata de forma adecuada los resultados de análisis que se obtengan no van a ser confiables; por eso las muestras de forraje deben ser protegidas para evitar que se altere su composición química (59).

3. JUSTIFICACIÓN

En los estudios realizados hasta el momento para determinar los n-alcenos de la cera cuticular de las plantas, no está claro el método de conservación o de transporte utilizado en la muestra de forraje. Por lo general, se usa el nitrógeno líquido para trasladar o conservar las muestras (dependiendo del estudio que se lleve a cabo). La ventaja del nitrógeno líquido es que detiene el metabolismo celular de la planta, lo que redundará en una mejor conservación y en análisis más exactos. Sus desventajas son el costo, la dificultad en el transporte (se necesita de recipientes especiales) y su peligrosidad.

Con esta investigación, se espera encontrar una alternativa menos cara y más segura al uso de nitrógeno líquido, que conserve la muestra de forraje del campo al laboratorio, sin que se altere la concentración o el perfil de n-alcenos cuticulares. Esto es importante porque las concentraciones de ciertos n-alcenos, principalmente C_{31} y C_{33} , se utilizan como marcadores internos para la determinación del consumo voluntario en animales en pastoreo. Si el método de conservación de la muestra afecta la concentración de los n-alcenos, entonces los cálculos de consumo voluntario estarán equivocados, lo que puede conducir a tomar decisiones incorrectas sobre el manejo nutricional de los animales.

4. HIPÓTESIS

- ✓ El perfil de n-alcenos varía de acuerdo con la especie vegetal.
- ✓ El método de conservación de las muestras vegetales del campo al laboratorio no altera el perfil de n-alcenos de la cera cuticular de tres gramíneas y dos leguminosas.
- ✓ El método de conservación no altera la concentración del n-alceno C_{31} de la cera cuticular de tres gramíneas y dos leguminosas.

5. OBJETIVOS

- ✓ Estandarizar la técnica de determinación de n-alcenos en el laboratorio.
- ✓ Determinar el perfil de n-alcenos de tres gramíneas y dos leguminosas de clima templado.
- ✓ Encontrar el método de conservación que, comparado con el nitrógeno líquido, no altere la concentración de C_{31} de las plantas en estudio.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Fase de campo

Se recolectaron muestras de tres gramíneas, ryegrass perenne (*Lolium perenne*), orchard (*Dactylis glomerata*) y kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), y dos leguminosas, trébol blanco (*Trifolium repens*) y alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Puebla 76).

La recolección de las gramíneas y el trébol blanco se realizó a los 35 días de rebrote en las praderas del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO), ubicado en el kilómetro 53.1 de la carretera federal México-Cuernavaca, poblado de Tres Marías, municipio de Huitzilac, Estado de Morelos, a 10°03' latitud norte, 99°14' longitud oeste y a 2180 m de altitud. La zona presenta clima tipo Cb(m)(w), una temperatura promedio anual de 18°C y una precipitación pluvial anual de 1724 mm (24).

La alfalfa se recolectó después de 36 días de rebrote en un alfalfar de primer ciclo, establecido en el Campo Experimental Santa Isabel, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el kilómetro 18.5 de la carretera México-Lechería, Texcoco, Estado de México, a 19°29' latitud norte, 98°53' longitud oeste y a 2250 m de altitud. La zona presenta clima tipo Cb(w_o)(w)(i^g), una temperatura anual que oscila entre 12 y 18°C, con una precipitación pluvial anual de 691mm (24).

Para la recolección se tomó la parte aérea de diferentes plantas de cada especie y se cortó a 5 cm del suelo, con una podadora eléctrica manual. Las muestras se colocaron en una bolsa de plástico, se homogeneizaron revolviendo con las manos e inmediatamente se dividieron de acuerdo con los siguientes métodos de conservación (tratamientos):

→ Congelación con nitrógeno líquido (NL) (testigo): Se tomó la muestra y se introdujo en una bolsa de plástico, que se enrolló; se ataron los extremos con hilo de nylon y se

sumergió la bolsita en el tanque de NL, a los pocos minutos se volteó la muestra para un mejor congelamiento.

→ Hielo (H): La muestra se depositó en una bolsa de plástico y de manera encontrada se colocó en otra bolsa de plástico. La muestra se guardó en una hielera que contenía refrigerantes.

→ Hielo seco (HS): La muestra se manipuló de la misma forma que en H, se guardó en una hielera y se le colocó encima el hielo seco para su congelamiento.

→ Secado en papel periódico (PP): La muestra se distribuyó en hojas de papel periódico, se dobló y se depositó en una bolsa de plástico para su transportación.

→ Secado al sol (SS): El forraje se colocó en una hoja de papel periódico, se dobló e introdujo en una bolsa de plástico para su transportación. Después de 24 horas se expuso al sol para su deshidratación.

Todas las muestras se identificaron y se transportaron al laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

6.2. Fase de laboratorio

Un día (24 horas) después de la recolección comenzó el procesamiento de las muestras en el laboratorio, por que se consideró que ese sería un tiempo razonable de transporte cuando la zona de muestreo está lejos de algún laboratorio.

Las muestras se trabajaron de la siguiente manera:

1) El tratamiento SS se expuso al sol por 48 horas; una vez deshidratada, se guardó en una bolsa de plástico.

2) Los tratamientos H, HS y PP se dividieron en varias partes, según la cantidad recolectada de forraje, y se depositaron en bolsas de plástico que se enrollaron y sellaron con cinta adhesiva, se hicieron perforaciones pequeñas con un estilete a las bolsas de plástico y se colocaron en un ultra congelador (-70° C) por dos horas.

3) Para el tratamiento NL, las bolsas se sacaron del tanque de nitrógeno para hacerles perforaciones y se volvieron a depositar en el nitrógeno líquido.

4) Las muestras de los diferentes tratamientos (NL, H, HS, PP) se colocaron en un contenedor para alto vacío, que a su vez se depositó en un recipiente de plástico con hielo seco y acetona para obtener el congelamiento del envase, y evitar que las muestras se descongelaran rápidamente. Estos recipientes se conectaron a la liofilizadora durante 24 horas.

5) Las muestras liofilizadas se guardaron en bolsas de plástico con cierre hermético y posteriormente se molieron en un molino Wiley, usando un tamiz de 1 mm de diámetro.

Las muestras se trabajaron aleatoriamente. La cantidad de muestra utilizada de acuerdo a los tratamientos aparece en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Cantidad de muestra (gramos de materia seca) utilizada de cinco forrajes sometidos a cinco métodos de conservación

Método de conservación	Forraje				
	Alfalfa	Kikuyo	Orchard	Ryegrass	Trébol
Nitrógeno líquido	2.0	0.5	0.5	0.5	0.5
Hielo	2.0	0.5	0.5	0.5	0.5
Hielo seco	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Secado en papel	2.0	2.0	0.5	0.5	0.5
Secado al sol	2.0	2.0	0.5	0.5	0.5

El análisis cromatográfico de las muestras se realizó siguiendo la técnica de Mayes *et al.* (38), Dove (10) y Vulich *et al.* (62), con las siguientes modificaciones: el peso de la muestra (Cuadro 2), la cantidad de estándar interno (0.040 g), la saponificación (en baño

maría), la separación (30 ml de n-heptano), la utilización de una columna de silica gel con elución con n-heptano (25 ml), la evaporación de la muestra (completa) y, por último, las condiciones del cromatógrafo. La extracción en Soxhlet (1) se realizó en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica y el resto de la técnica se llevó a cabo en el laboratorio de Diseño de Experimentos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, de la UNAM. La metodología completa se describe en los Anexos 12.1 al 12.5.

Las muestras se trabajaron por triplicado (tres repeticiones por combinación forraje/tratamiento) y por cada repetición se realizaron tres inyecciones, cuyos resultados se promediaron. Se determinó el perfil de n-alcanos de cadena impar (C_{25} a C_{33} o C_{35}) para cada combinación forraje/tratamiento. En la muestra del trébol se perdió una repetición del tratamiento en hielo, por lo que el número total de observaciones fue $n=74$.

6.3. Análisis de la información

Se calculó la relación entre los diversos n-alcanos. Esto se hizo porque Dove y Mayes (13) indican que en la mayoría de los casos en que se usan los n-alcanos (estimaciones de consumo, composición de la dieta y digestibilidad) no es importante tener una precisión absoluta en las mediciones, siempre y cuando las concentraciones **relativas** se determinen con precisión.

Para evaluar el efecto de tratamiento se utilizó la concentración de C_{31} como variable de respuesta. Se decidió realizar el análisis estadístico con este alcano porque es uno de los más abundantes en muchas plantas y porque el cálculo de consumo de MS en animales en pastoreo utilizando la técnica de n-alcanos se basa, por lo general, en la relación $C_{31}:C_{32}$ (siendo C_{31} el marcador interno y C_{32} el externo).

Los datos de la concentración de C_{31} (mg/kg MS) se analizaron de acuerdo con un análisis de varianza para un diseño completamente al azar en arreglo factorial: cinco forrajes x

cinco métodos de conservación, con tres repeticiones por tratamiento (29). La comparación entre medias se hizo a través del método de Bonferroni ($P < 0.05$) (56).

El método estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + C_j + FC_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = concentración de C_{31} en la k -ésima repetición del i -ésimo forraje sometido al j -ésimo método de conservación

μ = media general

F_i = efecto del i -ésimo forraje ($i=1, \dots, 5$)

C_j = efecto del j -ésimo método de conservación ($j=1, \dots, 5$)

FC_{ij} = efecto de la interacción forraje x método de conservación

E_{ijk} = error experimental ($k=1, \dots, 3$)

7. RESULTADOS

7.1. Perfil de n-alcenos

En los Cuadros 3 a 7 se muestra el perfil de n-alcenos de la cera cuticular de los forrajes en estudio y el efecto que el método de conservación tuvo en dicho perfil. El método de referencia, con el cual se hicieron las comparaciones, fue el de NL, ya que proporciona el mayor grado de confiabilidad, puesto que al sumergir el tejido vegetal en NL inmediatamente después de un muestreo, cesa toda actividad metabólica y lo que se mide refleja más fielmente las características de la planta al momento de ser cortada.

7.1.1. Alfalfa (Cuadro 3)

- Los n-alcenos más abundantes fueron el C_{29} y C_{31} .
- La relación C_{29}/C_{31} se mantuvo constante en los diferentes tratamientos, lo que significa que los cambios (aumento o descenso) que se presentaron en las concentraciones de estos dos n-alcenos fueron proporcionales.
- La relación C_{27}/C_{25} disminuyó en los tratamientos de H y SS con respecto a NL, principalmente debido a que en estos dos tratamientos se registró un aumento importante (39 % y 57 %, respectivamente) de C_{25} con relación al tratamiento de NL.
- La relación C_{29}/C_{27} presentó mayor variación entre los tratamientos, especialmente en los dos que involucraron una deshidratación (PP y SS). La concentración de C_{29} aumentó 18% en el tratamiento de PP con respecto a la detectada en NL, mientras que la concentración de C_{27} aumentó 23% en el tratamiento de SS con respecto a NL. Esto ocasionó que en el primer caso (PP), la relación aumentara (8.7) y en el segundo (SS), disminuyera (6.8).
- La relación C_{31}/C_{33} fue menor en los tratamientos con H y SS. En el caso del hielo, la concentración de C_{31} disminuyó 10% con respecto al tratamiento con NL y en el tratamiento de SS, la concentración de C_{33} aumentó 16% con respecto al tratamiento de NL.

Cuadro 3. Perfil de n-alcenos en la cera cuticular de la alfalfa (*Medicago sativa* var. Puebla 76)

Método de conservación	n-alcenos (mg/kg MS)				
	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₁	C ₃₃
Nitrogeno líquido	7.27	40.02	317.29	290.80	15.76
D.E.	0.51	1.12	5.91	4.86	0.47
Hielo	10.13	43.76	309.90	264.08	16.61
D.E.	1.42	1.57	16.71	18.29	0.63
Hielo seco	8.11	44.28	343.34	277.47	14.95
D.E.	0.86	2.42	12.02	11.10	0.82
Papel periódico	8.44	43.29	375.28	334.15	18.34
D.E.	0.64	1.18	6.16	2.11	0.25
Secado al sol	11.41	49.17	332.11	307.79	18.35
D.E.	0.25	3.35	24.43	15.86	0.91
Relación entre n-alcenos impares					
	C ₂₇ /C ₂₅	C ₂₉ /C ₂₇	C ₂₉ /C ₃₁	C ₃₁ /C ₃₃	
Nitrogeno líquido	5.5	7.9	1.1	18.5	
Hielo	4.3	7.1	1.2	15.9	
Hielo seco	5.5	7.8	1.2	18.6	
Papel periódico	5.1	8.7	1.1	18.2	
Secado al sol	4.3	6.8	1.1	16.8	

- En general, el efecto de los tratamientos en la concentración de los diferentes n-alcános fue poco predecible. El n-alcáno que menos se vio afectado por el método de conservación fue el C_{27} .

7.1.2. Kikuyo (Cuadro 4)

- Los n-alcános más abundantes fueron C_{33} , C_{31} y C_{35} . En general, en todos los n-alcános se observó el mismo fenómeno: una disminución en la concentración en todos los tratamientos en comparación con nitrógeno líquido, excepto para C_{35} , que registró un aumento de 20% en el tratamiento con hielo y no tuvo cambio significativo con los otros tres métodos.
- Las relaciones más constantes fueron las de C_{27}/C_{25} , C_{33}/C_{31} y C_{33}/C_{35} . La relación C_{27}/C_{25} aumentó en todos los tratamientos con relación a NL, principalmente debido a una marcada disminución en la concentración de C_{25} .
- La relación C_{33}/C_{31} aumentó en todos los tratamientos con relación al NL porque hubo una disminución en la concentración de ambos n-alcános, pero ésta fue ligeramente más pronunciada para C_{31} .
- La relación C_{33}/C_{35} fue más estable, disminuyendo un poco en el tratamiento con H y SS por un aumento en la concentración de C_{35} en estos tratamientos, especialmente en el tratamiento con hielo.
- Las otras dos relaciones, C_{29}/C_{27} y C_{31}/C_{29} , fueron más variables, principalmente la última. En ambas hubo un aumento casi del doble en el tratamiento de hielo seco comparado con la relación de NL, pero en todos los tratamientos las relaciones aumentaron debido a una disminución considerable en la concentración de los n-alcános C_{27} y C_{29} , respectivamente, con respecto a NL.

Cuadro 4. Perfil de n-alcenos en la cera cuticular del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*)

Método de conservación	n-alcenos (mg/kg MS)					
	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₁	C ₃₃	C ₃₅
Nitrogeno líquido	27.42	43.61	74.85	261.16	311.87	123.27
D.E.	10.72	13.62	17.45	9.41	12.28	8.60
Hielo	9.68	17.98	50.89	205.67	292.05	147.92
D.E.	1.35	4.90	28.91	25.63	30.15	9.73
Hielo seco	4.62	8.77	29.64	198.11	285.87	120.44
D.E.	0.38	0.65	1.59	2.99	2.24	2.37
Papel periódico	6.14	13.07	35.14	193.04	293.87	120.03
D.E.	0.86	0.78	1.29	7.69	8.24	0.67
Secado al sol	8.33	15.93	40.23	198.82	290.21	126.69
D.E.	1.05	1.85	3.17	15.72	29.64	5.52

	Relación entre n-alcenos impares			
	C ₂₇ /C ₂₅	C ₂₉ /C ₂₇	C ₃₁ /C ₂₉	C ₃₃ /C ₃₁
Nitrogeno líquido	1.6	1.7	3.5	1.2
Hielo	1.9	2.8	4.0	1.4
Hielo seco	1.9	3.4	6.7	1.4
Papel periódico	2.1	2.7	5.5	1.5
Secado al sol	1.9	2.5	4.9	1.5

7.1.3. Orchard (Cuadro 5)

- Los n-alcenos en mayor concentración fueron el C_{33} y el C_{31} . Todos los tratamientos disminuyeron la concentración de n-alcenos con relación al tratamiento de NL, pero la mayor disminución se detectó para C_{29} en el tratamiento de HS.
- Las relaciones entre alcanos fueron constantes, lo que indica efectos proporcionales de los diferentes tratamientos en las concentraciones de los distintos n-alcenos. La excepción fueron las relaciones C_{29}/C_{27} y C_{31}/C_{29} . En el primer caso, la relación disminuyó y en el segundo, aumentó marcadamente debido a la baja concentración de C_{29} en el tratamiento de HS. En las muestras en HS se registró menos del 40% de la concentración de C_{29} obtenida en el tratamiento con NL.

7.1.4. Ryegrass (Cuadro 6)

- Los n-alcenos más abundantes fueron el C_{31} y el C_{33} . Al igual que en alfalfa, el efecto del tratamiento en la concentración de los n-alcenos fue poco predecible, lo que se reflejó en los valores de las diferentes relaciones.
- Las relaciones más estables fueron C_{31}/C_{29} y C_{31}/C_{33} . La primera aumentó en el tratamiento de SS porque la concentración de C_{29} disminuyó más que la de C_{31} con relación al tratamiento de NL. La segunda relación (C_{31}/C_{33}) disminuyó igualmente en el tratamiento de SS porque la concentración de C_{31} disminuyó más que la de C_{33} con respecto a NL.
- Las demás relaciones fueron más variables, básicamente porque el efecto de los tratamientos no fue similar en todos los n-alcenos:
 - El tratamiento con hielo disminuyó las relaciones C_{27}/C_{25} , C_{29}/C_{27} y C_{33}/C_{35} por un aumento en los n-alcenos C_{25} , C_{27} y C_{35} , respectivamente.
 - El tratamiento de HS aumentó las relaciones C_{27}/C_{25} , y C_{29}/C_{27} , pero disminuyó la relación C_{33}/C_{35} en comparación con el tratamiento de NL.

Cuadro 5. Perfil de n-alcenos en la cera cuticular del pasto orchard (*Dactylis glomerata*)

Método de conservación	n-alcenos (mg/kg MS)					
	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₁	C ₃₃	C ₃₅
Nitrogeno líquido	11.09	8.91	10.87	37.03	44.70	15.16 *
D.E.	0.94	0.82	0.15	0.11	2.33	1.04
Hielo	9.81	6.37	8.13	28.06	33.49	13.85 *
D.E.	3.79	2.45	0.92	0.42	1.73	0.60
Hielo seco	7.43	4.30	3.92	23.63	30.96	11.35
D.E.	0.91	0.60	0.12	2.74	1.97	0.54
Papel periódico	10.39 *	7.35 *	8.94 *	34.52	40.32	12.52
D.E.	0.44	0.15	0.16	3.42	2.29	0.71
Secado al sol	10.44	6.12	8.24	31.44	34.81	
D.E.	0.34	0.13	0.24	0.33	1.49	

	Relación entre n-alcenos impares					
	C ₂₅ /C ₂₇	C ₂₉ /C ₂₇	C ₃₁ /C ₂₉	C ₃₃ /C ₃₁	C ₃₃ /C ₃₅	
Nitrogeno líquido	1.2	1.2	3.4	1.2	2.9	
Hielo	1.5	1.3	3.4	1.2	2.4	
Hielo seco	1.7	0.9	6.0	1.3	2.7	
Papel periódico	1.4	1.2	3.9	1.2	3.2	
Secado al sol	1.7	1.3	3.8	1.1		

* Promedio de dos repeticiones.

Cuadro 6. Perfil de n-alcenos en la cera cuticular del pasto ryegrass (*Lolium perenne*)

Método de conservación	n-alcenos (mg/kg MS)					
	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₁	C ₃₃	C ₃₅
Nitrógeno líquido	9.55	18.83	85.51	166.18	112.57	23.21
D.E.	2.82	1.17	2.31	4.51	2.27	0.83
Hielo	19.98	26.88	97.09	189.08	130.61	31.61
D.E.	4.74	2.56	3.30	0.83	0.56	1.62
Hielo seco	5.05	16.45	79.32	159.19	113.99	29.41
D.E.	0.03	0.99	2.95	4.07	1.76	0.68
Papel periódico	6.32	18.65	86.28	184.19	125.78	26.70
D.E.	0.61	1.35	3.06	5.90	2.25	0.19
Secado al sol	7.35	15.52	49.20	121.72	102.93	26.61
D.E.	1.16	0.75	0.38	2.08	1.30	1.89

	Relación entre n-alcenos impares					
	C ₂₇ /C ₂₅	C ₂₉ /C ₂₇	C ₃₁ /C ₂₉	C ₃₁ /C ₃₃	C ₃₃ /C ₃₅	
Nitrógeno líquido	2.0	4.5	1.9	1.5	4.9	
Hielo	1.3	3.6	1.9	1.4	4.1	
Hielo seco	3.3	4.8	2.0	1.4	3.9	
Papel periódico	2.9	4.6	2.1	1.5	4.7	
Secado al sol	2.1	3.2	2.5	1.2	3.9	

- El tratamiento de PP aumentó la relación C_{27}/C_{25} , pero no cambió apreciablemente las otras dos (C_{29}/C_{27} y C_{33}/C_{35}), con respecto al tratamiento de NL.
- El tratamiento de SS no alteró la relación C_{27}/C_{25} , pero disminuyó las relaciones C_{29}/C_{27} y C_{33}/C_{35} con respecto a NL.

7.1.5. Trébol (Cuadro 7)

- El n-alcano más abundante fue el C_{29} , seguido del C_{27} .
- No se registraron valores para los n-alcanos C_{33} y C_{35} .
- Las mejores relaciones fueron C_{29}/C_{27} y C_{29}/C_{31} . El tratamiento en hielo aumentó la concentración de C_{27} , lo que provocó que la primera relación disminuyera, mientras que el tratamiento de SS aumentó la concentración de C_{31} , lo que hizo disminuir la relación C_{29}/C_{31} .
- La relación C_{27}/C_{25} fue más variable porque el tratamiento en hielo hizo aumentar ambos n-alcanos, pero el efecto fue mayor en C_{25} . Por el contrario, los demás tratamientos hicieron disminuir en mayor proporción la concentración de C_{25} con respecto a la de C_{27} .

7.2 Concentración del n-alcano C_{31}

La concentración de C_{31} encontrada en la alfalfa, el pasto kikuyo y el ryegrass (Cuadro 8) estuvo dentro del rango de valores indicados en la literatura (14, 33, 49, 56). Los valores consignados en la literatura para trébol blanco oscilan entre 55 y 67 mg/kg MS (14, 56) y aquellos para orchard son de 58 mg/kg MS (33). Estos valores son mayores a los encontrados en este estudio (27 y 37 mg/kg MS, respectivamente, Cuadro 8, tratamiento NL).

Cuadro 7. Perfil de n-alcianos en la cera cuticular del trébol (*Trifolium repens*)

Método de conservación	n-alcianos (mg/kg MS)				
	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₁	
Nitrogeno líquido	8.81 *	41.38	71.25	27.25	
D.E.	0.36	2.82	5.10	2.45	
Hielo	22.90 *	52.31 *	66.00 *	23.80 *	
D.E.	5.46	6.95	11.42	5.38	
Hielo seco	5.52	35.71	54.79	21.07	
D.E.	0.72	1.35	1.66	1.08	
Papel periódico	4.47	33.20	56.45	21.47	
D.E.	0.31	1.82	2.55	1.70	
Secado al sol	7.06	37.39	61.15	28.24	
D.E.	1.15	1.53	4.00	1.43	

	Relación entre n-alcianos impares		
	C ₂₇ /C ₂₅	C ₂₉ /C ₂₇	C ₂₉ /C ₃₁
Nitrogeno líquido	4.7	1.7	2.6
Hielo	2.3	1.3	2.8
Hielo seco	6.5	1.5	2.6
Papel periódico	7.4	1.7	2.6
Secado al sol	5.3	1.6	2.2

* Promedio de dos repeticiones.

Cuadro 8. Concentración del n-alcano C₃₁ en cinco forrajes con cinco métodos de conservación.

FORRAJE	C ₃₁ , mg/kg MS				
	Nitrógeno líquido	Hielo	Hielo seco	Papel periódico	Secado al sol
Alfalfa	290.80 ^a	264.08 ^b	277.47 ^{a,b}	334.15 ^c	307.79 ^d
Kikuyo	261.16 ^a	205.67 ^b	198.11 ^b	193.04 ^b	198.82 ^b
Orchard	37.03 ^a	28.06 ^a	23.63 ^a	34.52 ^a	31.44 ^a
Ryegrass	166.18 ^a	189.08 ^b	159.19 ^a	184.19 ^b	121.72 ^c
Trébol	27.25 ^a	23.80 ^a	21.07 ^a	21.47 ^a	28.24 ^a
EEM	5.1				

^{a,b,c,d} Literales diferentes en la misma hilera indican diferencia estadística (P<0.05).

El error estándar de la media (EEM) para trébol blanco en hielo fue de 6.3

El análisis de varianza para la concentración de C₃₁ se encuentra en el Cuadro 9. Como puede observarse, el efecto de la interacción forraje x método de conservación fue significativo (P<0.0001, Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza para la concentración del n-alcano C₃₁ en cinco forrajes con cinco métodos de conservación.

Fuente de variación	GL	CM	F	P
Forraje	4	200392.805	2555.888	< 0.0001
Método	4	1307.7548	16.6796	< 0.0001
Forraje x método	16	1390.3513	17.7341	< 0.0001
Error	49	78.4		
Total	73			

Se perdió una repetición del tratamiento en hielo del trébol.

- El método de conservación no tuvo efecto en la concentración de C₃₁ del pasto orchard y del trébol blanco, quizá debido en parte a la mayor variabilidad en los datos (Cuadro 8).

- En el pasto kikuyo, en comparación con el tratamiento NL, los demás métodos de conservación disminuyeron la concentración de C_{31} entre 27 y 35% ($P < 0.05$) (Cuadro 8).
- En la alfalfa, los métodos de SS y PP incrementaron la concentración de C_{31} en 6% y 15%, respectivamente ($P < 0.05$) con relación al NL, mientras que el tratamiento de hielo la disminuyó un 9% ($P < 0.05$) y no hubo diferencia estadística con HS (Cuadro 8).
- En el caso de ryegrass, en comparación con el tratamiento de NL, la conservación en H y en PP aumentó la concentración de C_{31} en un 12% ($P < 0.05$), el SS la disminuyó aproximadamente un 30% ($P < 0.05$) y no hubo diferencia estadística con HS (Cuadro 8).

Debido a que el n-alcano con mayor concentración fue C_{29} para trébol, se decidió realizar un análisis de varianza por separado para este forraje (Cuadro 10), el cual indicó un efecto de tratamiento. Los tratamientos HS, PP y SS disminuyeron entre 14 y 23% la concentración de C_{29} , en comparación con NL, pero no hubo diferencias con H (Cuadro 11).

Cuadro 10. Análisis de varianza para la concentración del n-alcano C_{29} en trébol

Fuente de variación	GL	CM	F	P
Método	4	134.330	5.1912	0.0190
Error	9	25.877		
Total	13			

Se perdió una repetición del tratamiento en hielo.

Cuadro 11. Concentración del n-alcano C₂₉ del trébol con cinco métodos de conservación.

	C ₂₉ , mg/kg MS				
	Nitrógeno líquido	Hielo	Hielo seco	Papel periódico	Secado al sol
Trébol	71.25 ^a	66.00 ^{a,c}	54.79 ^b	56.45 ^{b,c}	61.15 ^{b,c}
EEM	5.1				

^{a,b,c} Literales diferentes en la misma hilera indican diferencia estadística (P<0.05).

El EEM fue de 2.94 para todos los tratamientos excepto para hielo, que fue de 3.60

8. DISCUSIÓN

La revisión del perfil de n-alcenos de los forrajes que se estudiaron (Cuadros 3 a 7) indica que los n-alcenos más abundantes fueron el C₂₉, el C₃₁ y el C₃₃. En un forraje, el trébol blanco, el C₂₇ fue relativamente importante y en el kikuyo, lo fue el C₃₅. Existieron diferencias entre familias y especies. Para el caso de las leguminosas (alfalfa y trébol), la concentración más elevada fue la de C₂₉, aunque las concentraciones fueron sensiblemente diferentes entre ellas, y en las gramíneas, el C₃₃ fue más abundante en los pastos kikuyo y orchard, mientras que el C₃₁ lo fue en el ryegrass. Estas diferencias en el perfil de n-alcenos entre familias y especies también se mencionan en la literatura. Tulloch (60), en un estudio realizado de la cera epicuticular de 28 géneros de gramíneas, encontró que las ceras de los pastos son generalmente mezclas de C₂₇, C₂₉, C₃₁ y C₃₃, siendo los hidrocarburos más importantes el C₂₉ o el C₃₁. De las 34 especies que éste autor examinó, 23 mostraron al C₃₁ como el n-alceno más importante, ocho indicaron al C₂₉ y dos al C₂₇ y C₃₃.

En cuanto al hecho de que las concentraciones de C₃₁ encontradas en trébol blanco y pasto orchard fueran menores a las indicadas en la literatura, los estudios sobre n-alcenos señalan que las condiciones medioambientales, como luminosidad y humedad, pueden afectar su concentración en las plantas (2) y es posible que la elevada precipitación pluvial en el área de Tres Marias, Morelos, donde se recolectaron ambos forrajes, influyera en la concentración de este n-alceno, disminuyendo su producción. Malossini *et al.* (33) encontraron elevadas concentraciones de los n-alcenos de cadena impar más importantes en muestras de ryegrass del norte de Italia e indicaron que un descenso en la humedad ambiental y del suelo puede tener efectos estimulantes en la producción de cera.

Cada forraje tuvo una respuesta diferente a los diversos tratamientos, lo que podría ser un indicio de su respuesta al estrés por frío y deshidratación. Las plantas pueden experimentar lo que se conoce como estrés por enfriamiento (a cualquier temperatura desde los 10-15° C hasta los 0° C) y estrés por congelamiento (por debajo de los 0° C) (31). El significado biológico del frío yace, parcialmente, en disminuir la velocidad de los procesos químicos y en alteraciones de estructuras biológicamente importantes (51). Para sobrevivir, la planta

debe evitar el daño letal que estas tensiones puedan producir. Muchas plantas han desarrollado adaptaciones que las protegen en varias formas. Una de estas adaptaciones se conoce como “robustez” (hardiness) o “aclimatación”, es decir, la habilidad de la planta para resistir o tolerar un estrés de baja o alta temperatura o una sequía (31). De esta manera, las plantas se pueden clasificar como sensibles o tolerantes al enfriamiento y sensibles o tolerantes al congelamiento (31, 51). El tratamiento en hielo equivaldría a un estrés por enfriamiento, el tratamiento en HS sería semejante a un estrés por congelación y los tratamientos PP y SS serían equivalentes a un estrés por deshidratación.

El ryegrass, por ejemplo, se considera una planta tolerante al congelamiento y en este estudio no se encontró ninguna diferencia en la concentración de C_{31} entre el tratamiento de HS y el de NL, pero el enfriamiento en hielo aumentó su concentración significativamente (Cuadro 8). Por otro lado, la concentración de C_{31} en la alfalfa en hielo [la alfalfa varía en robustez dependiendo de la variedad (25)] no fue diferente de la concentración en el tratamiento con HS, pero fue significativamente menor que en el tratamiento con NL (Cuadro 8). Ambos forrajes (ryegrass y alfalfa), sin embargo, fueron sensibles a la deshidratación, aunque en direcciones contrarias. La concentración de C_{31} en las muestras de alfalfa deshidratada con PP o en SS aumentó [una respuesta que en otras plantas, como el algodón, se ha interpretado como una mejoría en la protección contra el estrés hídrico (3)], mientras que en el ryegrass la concentración de C_{31} en las muestras SS disminuyó significativamente en comparación con el tratamiento de NL.

Por otra parte, el pasto kikuyo es sensible tanto al congelamiento como a la deshidratación y esto podría explicar por qué la concentración de C_{31} disminuyó significativamente en todos los tratamientos con relación a la congelación en NL. Por el contrario, el pasto orchard es mucho más tolerante que el pasto kikuyo al congelamiento y a la deshidratación, lo que podría explicar la ausencia de diferencias entre los tratamientos. Finalmente, el trébol blanco se comportó de manera similar al pasto orchard, aunque no se considera una planta resistente a la sequía. Sin embargo, en el caso del trébol se observó un efecto del tratamiento cuando se analizó la concentración de C_{29} y el resultado fue que los dos

tratamientos de deshidratación (PP y SS) disminuyeron la concentración de ese n-alcano (al igual que HS) en comparación con NL.

La hipótesis de que las plantas respondieron a los diferentes tratamientos alterando la concentración de C_{31} se estaría apoyada por lo encontrado al calcular las relaciones entre los diferentes n-alcanos.

Las relaciones (Cuadro 3 a 7) que se mantuvieron más estables entre tratamientos fueron C_{29}/C_{31} para alfalfa; C_{27}/C_{25} , C_{33}/C_{31} y C_{33}/C_{35} para pasto kikuyo; C_{33}/C_{31} para pasto orchard; C_{31}/C_{29} y C_{31}/C_{33} para ryegrass, y C_{29}/C_{31} para trébol. La “estabilidad” estuvo dada por el hecho de que las concentraciones de esos n-alcanos variaron (aumentaron o disminuyeron) de manera similar en todos los tratamientos. Es decir, el tratamiento afectó a ambos alcanos en la relación proporcionalmente: si uno disminuyó, el otro aumentó proporcionalmente, o los dos aumentaron o disminuyeron proporcionalmente. En las demás relaciones, aparentemente uno de los n-alcanos fue más afectado que el otro. Por ejemplo, en la relación C_{29}/C_{27} de la alfalfa (Cuadro 3), el tratamiento PP aumentó más la concentración de C_{29} que de C_{27} , mientras que en el tratamiento SS el aumento fue mayor para C_{27} ; o el efecto del HS en la concentración de C_{29} , que hizo que las relaciones C_{29}/C_{27} y C_{31}/C_{29} fueran muy diferentes a las del tratamiento con NL.

De todo lo anterior, puede concluirse que no existe evidencia para aceptar dos de las propuestas en el estudio, que el perfil de n-alcanos y que la concentración de C_{31} no cambiaría, independientemente del método de conservación utilizado. Es decir, el estudio mostró que el método de conservación sí afectó tanto el perfil como la concentración de C_{31} en algunos de los forrajes estudiados. El experimento se diseñó sólo con este propósito, pero es importante tratar de entender qué pudo haber pasado en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos. La literatura indica que el robustecimiento o aclimatación (“hardening”) de una planta es un proceso complejo, que incluye cambios fisiológicos, fisicoquímicos y químicos (26). Hietala *et al.* (26), trabajando con tallos de clones del sauce mimbrero (*Salix viminalis*) estudiados bajo tratamiento de congelamiento controlado, concluyeron que la aclimatación podía dividirse en tres etapas. La etapa de pre-

aclimatación, que podría parecerse más a lo que sucedió con las muestras enfriadas, se asoció con una disminución de n-alcanos, de la cantidad total de ácidos grasos y de la proporción de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados. Estos cambios indicaron que cesó el crecimiento y disminuyó en la actividad metabólica.

Los n-alcanos se sintetizan a través de una vía de elongación–descarboxilación/descarbonilación (2). Los pasos iniciales ocurren en el mesófilo de las células de la palizada interna (2) y son similares a los pasos de la síntesis de ácidos grasos hasta ácido palmítico (54). Posteriormente, se realiza la elongación de la cadena en las células de la epidermis para producir los ácidos grasos de cadena más larga, que pueden reducirse o descarboxilarse/descarbonilarse para generar alcoholes de cadena larga o alcanos, respectivamente (2, 54). Se ha confirmado que el paso final en la formación de n-alcanos es una descarbonilación en lugar de un descarboxilación y se ha consignado actividad enzimática de descarbonilación en la región pared celular-cutícula (2).

Wilkinson y Kasperbauer (63), trabajando con hojas de tabaco, encontraron que el contenido de alcanos de las hojas respondía a su estado metabólico, que estaba en sintonía con las condiciones ambientales. Estos investigadores concluyeron que la variabilidad total de la calidad y cantidad de la cera epicuticular en hojas de tabaco genéticamente uniformes parecía ser un reflejo de la actividad de los procesos enzimáticos individuales bajo diferentes condiciones ambientales. Consecuentemente, argumentaron, la cera epicuticular presente en hojas que crecen naturalmente podría ser la suma de estos sistemas en cambio constante, que responden al medio ambiente.

En el presente estudio, cinco diferentes forrajes se sometieron a estrés por frío (0° C, hielo, y -80° C, hielo seco) y a estrés hídrico (deshidratación con papel periódico y por sol). Los resultados observados quizás se debieron a cambios en los procesos enzimáticos que conducen a la síntesis de n-alcanos. En el caso de las muestras congeladas en NL, la temperatura del NL (-196° C) (31) probablemente cesó toda actividad metabólica y, por lo tanto, este tratamiento puede considerarse como el de referencia.

9. CONCLUSIONES

El perfil de n-alcanos varió entre las diferentes especies vegetales.

En los forrajes muestreados, predominaron los n-alcanos de cadena impar, siendo el C₃₁ (n-hentriacontano) el más abundante.

El método de conservación alteró el perfil de n-alcanos de los forrajes muestreados en el presente estudio, quizá debido a cambio en los procesos enzimáticos que conducen a la síntesis de n-alcanos.

La congelación en nitrógeno líquido parece ser el método más confiable para la conservación de forrajes que van a someterse a la determinación del perfil de los n-alcanos.

10. RECOMENDACIONES

Para una mejor evaluación de la concentración de n-alcenos en los forrajes, se recomienda utilizar dos estándares internos (C_{32} y C_{34}).

Como los valores obtenidos de los n-alcenos de menor longitud fueron muy variables, sería mejor realizar el análisis con mayor cantidad de muestra (5 g), al momento de preparar la curva de calibración, se recomienda hacer diluciones de menor concentración para obtener una mayor precisión en los resultados.

Se sugiere realizar algunos cambios a la técnica referida, para ahorrar tiempo sería favorable utilizar la saponificación directa (omitir el paso de extracción por sistema Soxhlet) y para disminuir costos, sería necesario realizar una serie de experimentos con algún otro disolvente orgánico que no sea n-heptano.

11. LITERATURA CITADA

1. Association of Official Analytical Chemists. Methods of the Association of Official Analytical Chemists. 12th ed. USA: AOAC, 1975.
2. Banthorpe DV. Natural occurrence, biochemistry and toxicology. In: Patai S, Rappoport Z, editors. The chemistry of alkanes and cycloalkanes. England: John Wiley and Sons, 1992.
3. Bondada BR, Oosterhuis DM, Murphy J, Kin KS. Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract and boll. *Env Exp Bot* 1996;36:61-69.
4. Brown TD, LeMay HE, Bursten BE. Química. La ciencia central. 2^a ed. Estado de México: Prentice-Hall-Hispanoamericana, 1993.
5. Castro AL. Resumen e informe de labores del programa de alfalfa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Campo Experimental "Valle de México". Chapingo: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1986.
6. Chimal HA. Manual para la identificación de las leguminosas forrajeras. México: UAM, 1977.
7. Coaché BO. Rendimiento de ocho variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y sus componentes (tesis de Licenciatura) Chapingo (Estado de México) México: Univ Aut Chapingo, 1998.
8. Cromatógrafo, esquema. Disponible en URL:
<http://www.ur.mx/.../quimica/jescob/images/croma4.jpg>
9. Díaz PCI. Manual de gramíneas. México: UAM, 1976.
10. Dove H. Using the n-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixtures. *Aust J Agric Res* 1992;43:1711-1724.
11. Dove H, Freer M, Foot JZ. The nutrition of grazing ewes during pregnancy and lactation: a comparison of alkane-based and chromium/*in vitro*-based estimates of herbage intake. *Aust J Agric Res* 2000;51:765-777.
12. Dove H, Mayes RW. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. *Aust J Agric Res* 1991;42:913-952.

13. Dove H, Mayes RW. Plant wax components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *J Nut* 1996;126:13-26.
14. Dove H, Mayes RW. Satellite meeting: Wild and domestic herbivore diet characterization. VI International Symposium on the nutrition of herbivores; 2003 octubre 17-19; Mérida (Yucatán) México.
15. Dove H, Mayes RW, Freer M. Effects of species, plant part, and plant age on the n-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. *Aust J Agric Res* 1996;47:1333-1347.
16. FAO. Grassland and pasture crops. Grassland index. *Dactylis glomerata*. Disponible en URL:
<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPC/doc/GBASE/Dat a/pf000431.HTM>
17. FAO. Grassland and pasture crops. Grassland index. *Lolium perenne*. Disponible en URL:
<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPC/doc/GBASE/Dat a/pf000449.HTM>
18. FAO. Grassland and pasture crops. Grassland index. *Medicago sativa*. Disponible en URL:
<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPC/doc/GBASE/Dat a/pf000346.HTM>
19. FAO. Grassland and pasture crops. Grassland index. *Pennisetum clandestinum*. Disponible en URL:
<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPC/doc/GBASE/Dat a/pf000298.HTM>
20. FAO. Grassland and pasture crops. Grassland index. *Trifolium repens*. Disponible en URL:
<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPC/doc/GBASE/Dat a/pf000350.HTM>
21. Finkle BJ, Ulrich JM, Rains DW, Stavarek SJ. Growth and regeneration of alfalfa callus lines after freezing in liquid nitrogen. *Plant Sci* 1985;42:133-140.
22. Flores MJA. *Bromatología animal*. 3a ed. México: Limusa, 1989.

23. Forbes JM. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. UK: CAB International, 1995.
24. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climático de Köeppen. 4ª ed. México: Indianápolis, 1988.
25. Hanson CH, Barnes DK. Alfalfa. In: Heath ME, Metcalfe DS, Barnes RF, editors. Forages. 3a ed. USA: State Univ, 1973:136-147.
26. Hietala T, Hiekka P, Rosenguist H, Leakso S, Taharainen L, Repo T. Fatty acid and alkanes changes in willow during frost hardening. *Phytochemistry* 1998;47:1501-1507.
27. Hill HH, McMinn DG. Detection in capillary chromatography. In: Hill HH, McMinn DG, editors. Detectors for capillary chromatography. Chemical Analysis Series, Vol. 1. New York: John Wiley and Sons, 1992:1-6.
28. International Group Transport. Métodos de transporte. Refrigeración. Disponible en URL: <http://www.igt-transport.com/refrigeracion.htm>
29. JMP. SAS Institute, Inc. 1988-1996.
30. Kolattukudy PE. Cutin, suberin, and waxes. In: Stumpf PK, editor. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Lipids: structure and function. Vol. 4. New York: Academic Press, 1980:571-645.
31. Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Vol.1.: Chilling, freezing and high temperatures stresses. 2nd ed. New York: Academic Press, 1980.
32. Malossini F, Bovolenta S, Piasentier E, Piras C, Martillotti F. Comparison of n-alkanes and chromium oxide methods for estimating herbage intake by grazing dairy cows. *Anim Feed Sci Tech* 1996;61:155-165.
33. Malossini F, Piasentier E, Bovolenta S. n-Alkane content of some forages. *J Sci Food Agric* 1990;53:405-409.
34. Martin JT, Juniper BE. The cuticles of plants. Great Britain: R&R Clark, 1970.
35. Mauseth JD. Plant anatomy. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1988.
36. Mayes RW, Dove H. Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores. *Nutr Res Rev* 2000;13:107-138.
37. Mayes RW, Lamb CS, Colgrove PM. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J Agric Sci* 1986;107:161-170.

38. McNair HM, Bonelli EJ. Basic gas chromatography. California: Consolidated Printers, 1968.
39. Minson DJ. Forage in ruminant nutrition. California: Academic Press, 1990.
40. Muslera PE, Ratera GC. Praderas y forrajes. Producción y aprovechamiento. Madrid: Mundi-Prensa, 1983.
41. Onuska FI. Basic principles, characteristics and selection of open tubular columns in gas chromatography. In: Clement RE, editor. Gas chromatography. Biochemical, biomedical and clinical applications. Chemical Analysis Series, Vol. 111. New York: John Wiley and Sons, 1992:3-24.
42. Oti-Boateng P, Axtell B. Técnicas de secado. Métodos tradicionales de secado. Capítulo 2. 2ª ed. Lima: ITDG, 1998. Disponible en URL: http://www.fao.org/inpho/vlibrary/new_else/x5694x/x5694s03.htm
43. Paniagua GAR, Nistal MSM, Alvarez URVM, Anadón AR, Fraile LB, Sáez CFJ, González MPM. Citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1997.
44. Philips Petroleum Company. Pasture and range plants. Oklahoma: Philips Petroleum Company, 1963.
45. Poole CF, Poole SK. Chromatography today. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1991.
46. Pool CF, Poole SK. Gas chromatography. In: Heftmann E, editor. Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods. Journal of Chromatography library, Vol. 51A. USA: Elsevier Science Publisher, 1992.
47. Ravindranath B. Principles and practice of chromatography. England: Ellis Horwood Limited, 1989.
48. Reeves M, Fulkerson WJ, Kellaway RC, Dove H. A comparison of three techniques to determine the herbage intake of dairy cows grazing kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) pasture. Aust J Exp Agric 1996;36:23-30.
49. Romney DL, Gill M. Intake of forages. In: Givens DI, Owen E, Oxford RFE, Omed HM, editors. Forage evaluation in ruminant nutrition. UK: CABI Publishing, 2000:43-62.

50. Rymer C. The measurement of forage digestibility *In vivo*. In: Givens DI, Owen E, Axford RFE, Omed HM, editors. Forage evaluation in ruminant nutrition. UK: CABI Publishing, 2000:113-134.
51. Sakai A, Larcher W. Frost survival of plants. Berlin: Springer Verlag, 1987.
52. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Las gramíneas de México. Tomo III. Comisión Técnico Consultiva de Coeficientes de Agostadero. México: SARH, 1991.
53. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Las gramíneas de México. Tomo V. Comisión Técnico Consultiva de Coeficientes de Agostadero. México: SAGAR, 1999.
54. Shelvey JD, Koziol MJ. Seasonal and SO₂-induced changes in epicuticular wax of ryegrass. *Phytochemistry* 1986;25:415-420.
55. Smith DG, Mayes RW, Raats JG. Effects of species, plant part, and season of harvest on n-alkane concentrations in the cuticular wax of common rangeland grasses from southern Africa. *Aust J Agric Res* 2001;52:875-882.
56. Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures statistics: a biometrical approach. 2nd ed. New York: McGraw Hill, 1980.
57. Supelco. Productos de cromatografía para análisis y purificación. USA: Sigma Supelco, 2003/2004.
58. Tashiro C, Clement RE. Characteristics of modern GC instrumentation. In: Clement RE, editor. Gas chromatography. Biochemical, biomedical and clinical applications. Chemical Analysis Series, Vol. 111. New York: John Wiley and Sons, 1992:25-54.
59. Tejeda HI. Manual de laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal. México: SARH, 1983.
60. Tulloch AP. Composition of epicuticular waxes from 28 genera of gramíneas differences between subfamilias. *Can J Bot* 1981;59:1213-1221.
61. Vollhardt KPC, Schore NE. Química orgánica. 2^a ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1996.
62. Vulich SA, Hanrahan JP, Crowley BA. Modification of the analytical procedures for the determination of herbage and faecal n-alkanes used in the estimation of herbage intake. *J Agric Sci* 1995;124:71-77.

63. Wilkinson RE, Kasperbauer MJ. Effect of light and temperatura on epicuticular fatty acid and fatty alcohol of tobacco. *Phytochemistry* 1980;19:1379-1383.
64. Withers LA. The low temperature preservation of plant cell, tissue and organ cultures and seed for genetic conservation and improved agricultural practice. In: Grout BWW, Morris GJ, editors. *The effects of low temperatures on biological systems*. Great Britain: Edward Arnold, 1987:389-409.

12. ANEXOS

12.1. Técnica para la determinación de n-alcenos por cromatografía de gases

Material

- ✓ Pipeta volumétrica clase A de 1 ml
- ✓ Cartucho para Soxhlet pared sencilla
- ✓ Matraz de ebullición fondo plano de 250 ml
- ✓ Perlas de vidrio de 5 mm diámetro
- ✓ Rotavapor
- ✓ Probeta (10 y 25 ml)
- ✓ Soporte universal
- ✓ Pinza de tres dedos
- ✓ Condensador Liebig 309 mm
- ✓ Pipeta Pasteur 9''
- ✓ Bulbo de hule ámbar
- ✓ Matraz de ebullición fondo redondo de 50 ml
- ✓ Vial sin tapa de 2 ml
- ✓ Jeringa de 10 ml
- ✓ Embudo estriado tallo corto
- ✓ Pipeta digital con punta inyectora de 1000 μ l
- ✓ Punta de pipeta de 50 – 1000 μ l
- ✓ Vial de vidrio de borosilicato de 2 ml con tapa

Reactivos

- ✓ Heptano (n-C₇) (J.T. Baker, 99.5%)
- ✓ Tetratriacontano (n-C₃₄) (Fluka Chemic, 97%)
- ✓ Sílica gel 60 – 200 mallas (J.T. Baker)
- ✓ Solución hidroalcohólica de KOH 1M

Método

El pasto molido, liofilizado y tamizado (criba de 1 mm) se coloca en un cartucho de celulosa, se le agrega 1 ml de estándar interno n-C34 y como disolvente n-heptano; se coloca en el sistema de extracción Soxhlet durante 6 horas; posteriormente se deja enfriar el extracto y se destila en un rotavapor. Una vez recuperado el extracto seco se le añade 5ml de la solución hidroalcohólica de KOH 1M y se coloca en un sistema de reflujo a baño María, durante tres horas y media. Concluido el tiempo, se enfría el extracto saponificado y se efectúa la separación de la fase orgánica y de la fase acuosa con una pipeta Pasteur, mediante "lavados" con n-heptano (3x10 ml). La fase orgánica se transfiere a un matraz de fondo redondo de 50 ml y se coloca en un sistema de destilación para recuperar el disolvente. El residuo de la destilación se transfiere a un vial y se le agrega sílica gel para adsorber la muestra.

A continuación se coloca la sílica gel más la muestra, en una columna con sílica gel (2.5 g) y se eluye con 25 ml de n-heptano. El extracto purificado se recibe en un matraz de 50 ml y se destila hasta su concentración; el residuo de la destilación se coloca en un vial de 2 ml y se almacena hasta la realización del análisis cromatográfico.

Al momento de hacer las inyecciones, a la muestra seca se le agregan 300 µl de n-heptano para su disolución y se inyecta 1µl en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Serie II 5890, equipado con una columna capilar HP5 (95% dimetil polisiloxano, 5% difenil) con 30 m de largo, 0.32 mm de diámetro y 0.25 µm de fase estacionaria; con detector de ionización de flama (aire comprimido extra seco – INFRA; hidrógeno cromatográfico pureza 99.998% – INFRA). Temperatura del inyector y del detector, 250° C. Rampa de temperatura de la columna: 250° C por 3 min; 10° C/min hasta 300° C; 7 min a 300° C; 10° C/min hasta 320° C; 15 min a 320° C. Se usa nitrógeno (cromatográfico pureza 99.998% – INFRA) como gas acarreador a un flujo de 10 psi.

El análisis cualitativo se realiza comparando los tiempos de retención con estándares de n-alcenos conocidos (Cuadro 12). El análisis cuantitativo se lleva a cabo por el método de

estandarización interna, haciendo una relación del área bajo la curva de las señales de los n-alcanos del pasto con la señal del estándar interno (n-C34).

Cuadro 12. Estándares de n-alcanos

Analytical Standards Stockroom		Fluka Chemic		Aldrich Chem	
n-Alcano	Pureza (%)	n-Alcano	Pureza (%)	n-Alcano	Pureza (%)
C ₂₀	99.0	C ₃₁	99.5	C ₂₇	99.0
C ₂₁	99.5	C ₃₃	97.0	C ₂₉	99.0
C ₂₂	99.5	C ₃₄	97.0		
C ₂₃	99.0	C ₃₅	99.5		
C ₂₄	99.0				
C ₂₅	99.0				
C ₂₆	99.0				
C ₂₈	99.5				
C ₃₀	99.4				
C ₃₂	99.0				
C ₃₆	99.1				

12.2. Preparación del estándar interno C₃₄

Material

- ✓ Matraz volumétrico de 25 ml

Reactivos

- ✓ Heptano (n-C₇) (J.T. Baker, 99.5%)
- ✓ Tetratriacontano (n-C₃₄) (Fluka Chemic, 97%)

Método

Con relación a la concentración en moles, se pesa la cantidad calculada de n-alcano n-C₃₄; se disuelve en aproximadamente 5 ml de n-heptano, se coloca en el matraz y se afora.

12.3. Preparación de los estándares para la curva de calibración

Material

- ✓ Matraz volumétrico de 5 ml
- ✓ Matraz volumétrico de 10 ml
- ✓ Pipeta digital con punta inyectora de 1000 µl

Reactivos

- ✓ Kit de estándares (n-C₂₀ a n-C₃₆) (Analytical standards stockroom, Aldrich Chem, Fluka Chemic)
- ✓ Tetratriacontano (n-C₃₄) (Fluka Chemic, 97%)
- ✓ Heptano (n-C₇) (J.T. Baker, 99.5%)

Método

De acuerdo a la concentración en moles, se pesa la cantidad calculada de cada uno de los alcanos (excepto n-C₃₄) (Cuadro 13), se disuelven juntos en 5 ml de n-heptano y se vacían en un matraz de 10 ml; se afora. A ésta se denomina solución madre de estándares.

Por otro lado, se pesa la cantidad calculada de n-C₃₄ (Cuadro 13), se disuelve en 5 ml de n-heptano y se coloca en un matraz de 10 ml, el cual se afora. A esta se denomina solución madre de estándar interno.

De la solución madre de estándares se toma respectivamente 0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 2.5 y 4.5 ml y se coloca en matraces de 5ml, después a cada matraz se le agrega 0.5 ml de la solución madre de estándar interno. Se aforan y se identifican para su posterior inyección en el cromatógrafo de gases, y así obtener los valores de la curva de calibración.

Cuadro 13. Cantidad calculada de cada n-alcano.

n-Alcano	Peso (g)	Concentración (M)
C ₂₀	0.0141	5x10 ⁻³
C ₂₁	0.0148	5x10 ⁻³
C ₂₂	0.0155	5x10 ⁻³
C ₂₃	0.0162	5x10 ⁻³
C ₂₄	0.0169	5x10 ⁻³
C ₂₅	0.0176	5x10 ⁻³
C ₂₆	0.0183	5x10 ⁻³
C ₂₇	0.0190	5x10 ⁻³
C ₂₈	0.0197	5x10 ⁻³
C ₂₉	0.0204	5x10 ⁻³
C ₃₀	0.0211	5x10 ⁻³
C ₃₁	0.0218	5x10 ⁻³
C ₃₂	0.0225	5x10 ⁻³
C ₃₃	0.0232	5x10 ⁻³
C₃₄ (E.I.)	0.0400	1x10⁻³
C ₃₅	0.0246	5x10 ⁻³
C ₃₆	0.253	5x10 ⁻³

E.I.= Estándar interno

12.4. Preparación de la columna de sílica gel

Material

- ✓ Jeringa de 10 ml
- ✓ Algodón
- ✓ Vaso de precipitado

Reactivos

- ✓ Sílica gel 60 – 200 mallas (J.T. Baker)
- ✓ Heptano (n-C7) (J.T. Baker 99.5%)

Método

Se coloca un trozo pequeño de algodón al final de la jeringa (Figura 7) para evitar que la sílica salga. En un vaso de precipitado se pesan 2.5 g de sílica gel, se le agrega n-heptano para que se disuelva y se agrega a la jeringa, se enjuaga con n-heptano hasta limpiar de sílica el vaso de precipitado y se le va agregando n-heptano a la columna para que asiente la sílica. Al momento de vaciar la muestra a la columna, ésta última tiene que estar húmeda.

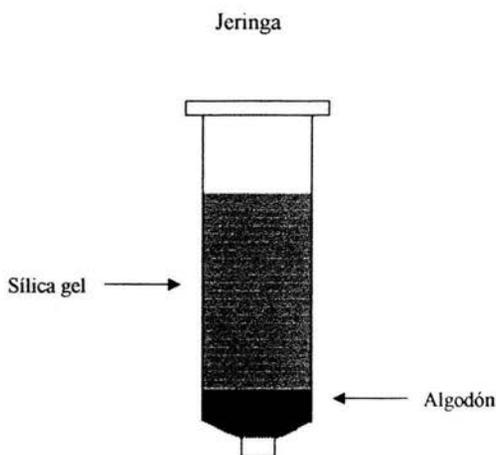


Figura 7. Columna de sílica gel.

12.5. Preparación de la solución hidroalcohólica KOH 1M

Material

- ✓ Matraz volumétrico de 1 L
- ✓ Vaso de precipitado de 500 ml
- ✓ Balanza

Reactivos

- ✓ KOH (Lentejas J.T. Baker 98%)
- ✓ Alcohol etílico (Q.P.)
- ✓ Agua destilada

Método

Se miden 500 ml de agua destilada y 500 ml de etanol, se mezclan. Se pesan 57 g de KOH y se coloca en el matraz; se disuelve con un poco de la solución de etanol-agua; una vez que esté completamente disuelto, se afora a 1 L.