



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DEL PERFIL DE n-ALCANOS EN FORRAJES  
DE CLIMA SEMI-ARIDO, TEMPLADO, TROPICAL HUMEDO Y  
TROPICAL SECO, EN EPOCA DE LLUVIAS.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

**JUAN JOSE MONTES SANCHEZ**



ASESORES: PhD SILVIA ELENA BUNTINX DIOS  
M. en C. FRANCISCO CASTREJON PINEDA  
DRA. ELVIRA SANTOS SANTOS

MEXICO, D. F.

2005

m. 346856



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.

## DEDICATORIA

A mi mamá, Auguria Sánchez Santiago, por su amor, dedicación y la confianza que siempre me ha brindado.

A mi papá, Juan Montes Santos, por pensar en nuestro bienestar.

A mis hermanos, Gustavo, Reyna y Olivia, por poner su granito de arena para que funcione nuestra familia.

A mis sobrinos, Erika y Juan Carlos, deseándoles que siempre logren sus aspiraciones.

Sin ninguno de ellos mi vida hasta este punto no hubiera sido la misma.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juan José Montes Sánchez

FECHA: 18 - Agosto - 05

FIRMA: Juan José Montes Sánchez

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, los Drs. Silvia Elena Buntinx Dios, Francisco Alejandro Castrejón Pineda y Elvira Santos Santos, por darme la oportunidad y confianza para realizar este trabajo. Al MI Jorge Lecumberri López por su guía y apoyo en los análisis estadísticos.

A los miembros del jurado, los Drs. Humberto Troncoso Altamirano, Sergio Angeles Campos y Agustín Bobadilla Hernández, por su apoyo y el tiempo brindado.

A los Centros de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Bovina y Caprina, en Ganado Tropical y Producción Animal en el Altiplano (CEIEPBC, CEIEGT y CEIEPAA, respectivamente) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por permitirme realizar los muestreos. Al Depto. de Nutrición Animal y Bioquímica, por el apoyo brindado en el procesamiento de las muestras.

Al laboratorio de Diseño de Experimentos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la UNAM, por permitirme trabajar en sus instalaciones. Al Q. Flavio Barajas, por su apoyo y enseñanzas durante el trabajo de laboratorio.

A Mónica, Zayra, Espiridión, Guadalupe, Alberto, Clara, Laura, Francisco, Adriana, Rocío, María Guadalupe y Eduardo, por brindarme su amistad.

A todos los que en su momento me apoyaron para lograr este trabajo. Finalmente, esta tesis no hubiera sido posible sin el financiamiento otorgado por el proyecto PAPIIT IN205301.

Gracias a todos.

## CONTENIDO

	Página
Lista de cuadros.....	VII
Lista de figuras.....	IX
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Revisión de literatura.....	5
2.1 Especies forrajeras.....	5
2.2 Vegetación de México.....	5
2.2.1 Zona árida.....	8
2.2.2 Zona templada.....	10
2.2.3 Zona tropical húmeda.....	10
2.2.4 Zona tropical seca.....	11
2.3 Consumo voluntario y selectividad.....	15
2.3.1 Medición de consumo voluntario en pastoreo.....	15
2.3.2 Medición de selectividad del alimento en pastoreo.....	16
2.3.3 Marcadores fecales.....	16
2.3.3.1 n-Alcanos.....	17
2.4 Cromatografía de gases.....	22
2.5 Análisis multivariado.....	23
2.5.1 Componentes principales.....	24
2.5.2 Análisis discriminante.....	24
3. Justificación.....	26
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos.....	28
6. Material y métodos.....	29
6.1 Sitios de muestreo.....	29
6.2 Muestreo.....	30
6.3 Liofilización y molido.....	31

6.4 Medición de n-alcános.....	32
6.5 Análisis estadístico.....	32
7. Resultados y discusión.....	34
7.1 Perfil por especie.....	34
7.1.1 Factores que influyen en el perfil de n-alcános.....	34
7.1.1.1 Efecto de la especie vegetal.....	34
7.1.1.2 Efecto de la parte anatómica.....	39
7.1.1.3 Efecto del ambiente.....	40
7.1.2 Relaciones entre los n-alcános.....	41
7.1.3 Contribución de cada n-alcáno en el perfil de n-alcános	
C <sub>24</sub> -C <sub>36</sub> .....	42
7.1.4 Errores en la medición de n-alcános en los forrajes.....	45
7.1.4.1 Efecto del sitio de muestreo y manejo de la muestra.....	45
7.1.4.2 Efecto del proceso de extracción.....	47
7.1.5 Importancia de la concentración de cada n-alcáno en las	
estimaciones de consumo voluntario y selectividad.....	48
7.2 Perfil por clima.....	49
7.2.1 Clima semi-árido.....	49
7.2.2 Clima templado.....	51
7.2.3 Clima tropical húmedo.....	52
7.2.4 Clima tropical seco.....	52
7.3 Perfil por familia.....	53
7.4 Análisis estadísticos.....	55
7.4.1 Análisis de varianza de parcelas divididas.....	55
7.4.2 Matriz de correlación entre los n-alcános.....	57
7.4.3 Componentes principales.....	57
7.4.4 Análisis multivariado discriminante.....	59
7.4.4.1 Discriminación entre familias.....	59
7.4.4.2 Discriminación entre climas.....	61
7.4.4.3 Discriminación entre especies.....	65
8. Conclusiones.....	67

9. Recomendaciones.....	68
10. Literatura citada.....	69
11. Anexo.....	75
I. Preparación del estándar interno.....	75
II. Preparación de la solución hidroalcohólica de KOH etanólico.....	75
III. Preparación de la columna de gel de sílica.....	75
IV. Método de extracción de n-alcenos.....	76
V. Inyección.....	78
VI. Cromatogramas de las extracciones.....	78
VII. Preparación de la curva de calibración de los estándares de n-alcenos..	81
VIII. Aporte de cada n-alceno en la concentración total de hidrocarburos saturados (C <sub>24</sub> -C <sub>36</sub> ) y la concentración total del perfil en todas las especies analizadas.....	83

## Lista de cuadros

	Página
Cuadro 1. Gramíneas muestreadas y presentes en diversas zonas de México.....	12
Cuadro 2. Leguminosas muestreadas y presentes en diversas zonas de México.....	14
Cuadro 3. Principales componentes de la cera cuticular vegetal.....	19
Cuadro 4. Calendario de muestreo de los forrajes en estudio.....	30
Cuadro 5. Perfil de n-alcános (mg/kg de MS) de forrajes de clima semi-árido.....	35
Cuadro 6. Perfil de n-alcános (mg/kg de MS) de forrajes de clima templado.....	36
Cuadro 7. Perfil de n-alcános (mg/kg de MS) de forrajes de clima tropical húmedo.....	37
Cuadro 8. Perfil de n-alcános (mg/kg de MS) de forrajes de clima tropical seco.....	38
Cuadro 9. Relación entre las concentraciones de los n-alcános más importantes en algunas especies.....	42
Cuadro 10. Porcentaje de aporte de cada n-alcáno en la concentración total de hidrocarburos (C <sub>24</sub> -C <sub>36</sub> ) y la concentración total del perfil.....	44
Cuadro 11. Perfil de n-alcános (mg/kg de MS) en los diferentes climas.....	50
Cuadro 12. Perfil de n-alcános (mg/kg de MS) por familia.....	54
Cuadro 13. Análisis de varianza de parcelas divididas para la concentración del n-alcáno C <sub>31</sub> .....	56
Cuadro 14. Matriz de correlación entre los n-alcános.....	57
Cuadro 15. Vectores característicos de los dos primeros componentes principales.....	58
Cuadro 16. Capacidad discriminante de la función canónica para familia.....	59

Cuadro 17. Correlación entre los n-alcenos y la función canónica para familia.....	59
Cuadro 18. Predicción de familia utilizando la función canónica encontrada.....	60
Cuadro 19. Capacidad discriminante de las funciones canónicas para clima.....	61
Cuadro 20. Correlación entre las funciones canónicas y los n-alcenos.....	62
Cuadro 21. Predicción de cada especie dentro de su clima de muestreo.....	63
Cuadro 22. Especies forrajeras clasificadas incorrectamente en otro clima al del muestreo de acuerdo con las funciones canónicas.....	64
Cuadro 23. Capacidad discriminante de las funciones canónicas para especie.....	65
Cuadro A. Cantidad de n-alcenos (g) para la solución madre de estándares.....	81
Cuadro B. Porcentaje de aporte de cada n-alceno en la concentración total de hidrocarburos (C <sub>24</sub> -C <sub>36</sub> ) y la concentración total del perfil en todas las especies analizadas.....	84

## Lista de figuras

	Página
Figura 1. Morfología general de las gramíneas.....	6
Figura 2. Morfología general de las leguminosas.....	7
Figura 3. Zonas ecológicas de México.....	9
Figura 4. Estructura molecular del heptano (C <sub>7</sub> ).....	18
Figura 5. Micrografía de la epidermis de pino blanco ( <i>Pinus strobus</i> ).....	20
Figura 6. Cromatograma.....	23
Figura A. Cromatograma del pasto banderita a las 4 semanas, clima semi-árido.....	79
Figura B. Cromatograma del pasto ryegrass perenne a las 6 semanas, clima templado.....	79
Figura C. Cromatograma del pasto antena a las 4 semanas, clima tropical húmedo.....	80
Figura D. Cromatograma de la leguminosa huamúchil a las 4 semanas, clima tropical seco.....	80
Figura E. Cromatograma de la curva de calibración, dilución $2.5 \times 10^{-5}$ .....	82
Figura F. Cromatograma de la curva de calibración, dilución $4.5 \times 10^{-3}$ .....	83

## RESUMEN

MONTES SÁNCHEZ JUAN JOSÉ. Determinación del perfil de n-alcános en forrajes de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco, en época de lluvias (bajo la dirección de: PhD Silvia Elena Buntinx Dios, M en C Francisco Alejandro Castrejón Pineda y Dra. Elvira Santos Santos).

Es de importancia conocer cuánto (consumo voluntario) y qué consumen (selectividad) los rumiantes en condiciones de pastoreo. Para ello se han realizado investigaciones con el uso de n-alcános como marcadores fecales. Para realizar mediciones de consumo es necesario conocer cuáles n-alcános y cuánto hay de cada uno de ellos en los forrajes involucrados en un área específica de pastoreo y ramoneo, para así determinar los marcadores fecales internos y externos a utilizar. En la literatura se encuentra información de especies vegetales de clima templado y tropical de ciertos países, algunas de las cuales están presentes en nuestro país, pero otras no. Se carece principalmente de información de forrajes de zonas áridas. Debido a esto, mediante la técnica de cromatografía de gases se realizó la determinación cualitativa y cuantitativa de los n-alcános  $C_{20}$ - $C_{36}$ , a las 4 y 6 semanas de rebrote, de 19 forrajes (de las familias *Poaceae* y *Fabaceae*) de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco, en época de lluvias. Se analizó la concentración del n-alcáno  $C_{31}$  a las 4 y 6 semanas de rebrote y no se encontró diferencia estadística. Asimismo, se determinó el perfil de n-alcános de los diferentes forrajes para realizar estimaciones taxonómicas de especie, clima de muestreo y familia. Se observó que dicho perfil fue diferente en cada especie y, por lo tanto, se utilizó para realizar una correlación entre n-alcános, un análisis de componentes principales y un análisis discriminante con función canónica. Se encontró correlación entre los n-alcános  $C_{27}$  y  $C_{29}$  (0.79),

C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub> (0.93). De los cinco componentes principales obtenidos, los dos primeros explicaron el 86% del total de la variación y separaron la información en dos grandes grupos, aquellos forrajes con elevada concentración de C<sub>27</sub>-C<sub>31</sub> y aquellos con elevada concentración de C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub>. Se realizaron predicciones taxonómicas para familia, teniendo una certeza en la clasificación del 86.1% para gramíneas y 88.1% para leguminosas. La predicción de clima de muestreo de los forrajes fue la siguiente: 56.7% en clima semi-árido, 86.7% en clima templado, 91.7% en clima tropical húmedo y 36.7% en clima tropical seco. La predicción por especie fue la que tuvo el mayor acierto (97.4%). En conclusión: (1) en estudios de consumo voluntario en pastoreo, que generalmente abarca unas tres semanas (incluyendo el período de adaptación), es suficiente realizar un muestreo de forraje para determinar la concentración del n-alcano C<sub>31</sub>, en la época de lluvias; (2) los n-alcanos ayudaron a separar a los forrajes por familia, gramíneas y leguminosas; (3) los n-alcanos fueron útiles para identificar a los forrajes de clima templado y tropical húmedo, pero tuvieron una menor efectividad con los forrajes de clima semi-árido y tropical seco, y (4) los n-alcanos funcionaron como una herramienta útil en la identificación ("huella digital") de los forrajes por especie.

## **Determinación del perfil de n-alcenos en forrajes de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco, en época de lluvias.**

### **1. Introducción**

La alimentación más económica en herbívoros es la que se basa en la utilización de forrajes como fuente única o principal de alimento, además de ser éstos un abundante recurso natural.<sup>1, 2, 3</sup>

La interconexión planta-animal es conocida a través del consumo, e involucra la cantidad y composición del alimento ingerido por un animal. El consumo depende de las características del alimento, del animal y de la complejidad de interacciones en un ambiente determinado por tiempo y espacio.<sup>4, 5, 6, 7</sup>

La importancia de medir el consumo radica en: a) conocer las interacciones entre niveles tróficos, b) buscar el bienestar y la producción de herbívoros domésticos, c) aprovechar adecuadamente aquellas áreas donde el uso primario no es agrícola (reservas naturales, áreas desérticas, refugios de vida salvaje, parques naturales y bosques), favoreciendo la presencia de especies, y d) lograr la sostenibilidad de los sistemas.<sup>1, 8, 9, 10</sup>

En México, un poco más de 113 millones de hectáreas son utilizadas para la ganadería extensiva, abarcando el 50% de la superficie nacional. En el país, aproximadamente 51.1 millones de hectáreas tienen potencial para el establecimiento de praderas: 17.2 millones en la zona tropical, 10.9 millones en la zona templada y 23 millones en la zona semi-árida.<sup>11</sup> De aquí la importancia de realizar estudios de consumo en animales bajo condiciones de pastoreo/ramoneo, cuya alimentación resulta mucho más económica que en condiciones de estabulación.

El consumo voluntario se ha estudiado a través del uso de marcadores fecales. Entre éstos se encuentran los n-alcenos, hidrocarburos saturados presentes en la

cera cuticular de los vegetales, que pueden ser utilizados tanto como marcadores internos como externos. En años recientes han cobrado importancia debido a que permiten la estimación del consumo voluntario de los animales en pastoreo de forma individual (lo cual no se puede hacer con otras técnicas de marcación) y tienen el potencial de estimar la composición botánica de la dieta seleccionada.<sup>6</sup>

Para llevar a cabo estas mediciones es necesario conocer el perfil de n-alcános de los forrajes involucrados y la información disponible es básicamente para especies de clima templado y tropical. Además se ha observado que las concentraciones de n-alcános de cada especie no son iguales en todos los lugares.

## 2. Revisión de literatura

### 2.1 Especies forrajeras

Los forrajes son un recurso natural y constituyen la fuente más importante de alimentación de rumiantes, además de producirse a bajo costo y de ayudar en el mantenimiento del ambiente. Las especies forrajeras presentes en el país tienen una gran diversidad, favorecida por la heterogenicidad de medios y la capacidad de respuesta de cada especie para sobrevivir y producir.<sup>1, 3, 10</sup>

Las especies vegetales más utilizadas por el hombre como forraje para los animales son las gramíneas (familia *Poaceae*) y las leguminosas (familia *Fabaceae*) y, en menor grado, especies agrupadas en otras familias.<sup>3</sup> Morfológicamente, las gramíneas se caracterizan por ser plantas de crecimiento herbáceo con una raíz fibrosa, un tallo compuesto por nudos y entrenudos, hojas filiformes, integradas por la vaina, limbo, lígula y aurículas e inflorescencia, que puede ser en forma de espiga, racimo o panícula (Figura 1). De igual forma, las leguminosas presentan un crecimiento herbáceo, arbustivo y arbóreo; en general, cuentan con una raíz pivotante, hojas multifoliales, estípulas, una flor compuesta y vainas como frutos (Figura 2).<sup>12, 13, 14</sup>

### 2.2 Vegetación de México

Es evidente que la principal razón de la riqueza florística de México es su amplia variedad de condiciones fisiográficas y climáticas. En función de estas condiciones, el número de especies presentes en el país es muy grande, contando con vegetación endémica, además de presentar afinidades con toda América y los demás continentes.<sup>15</sup>

La influencia humana sobre la vegetación de México resulta altamente modificadora y destructiva. Los agentes modificadores de mayor importancia han sido el desmonte, el sobrepastoreo, la tala desmedida, los incendios, la alteración

Flósculo

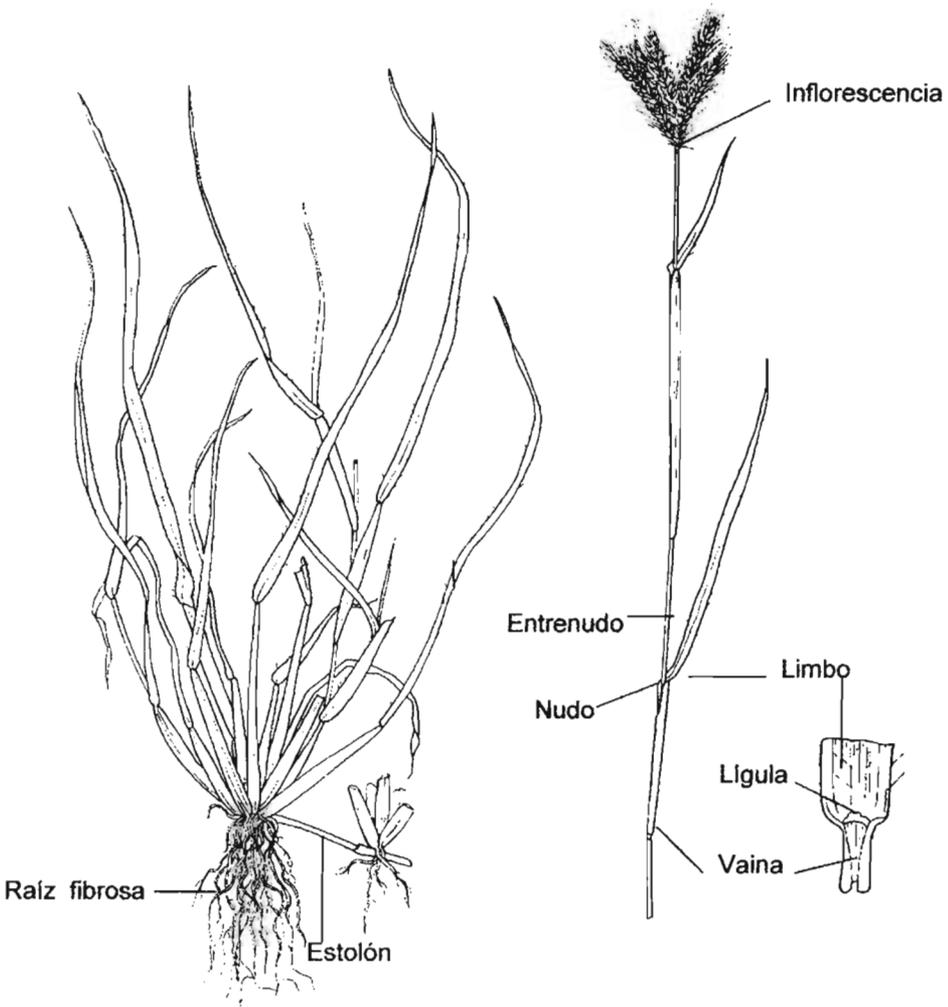
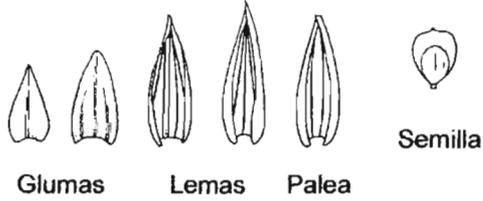


Figura 1. Morfología general de las gramíneas.<sup>16</sup>

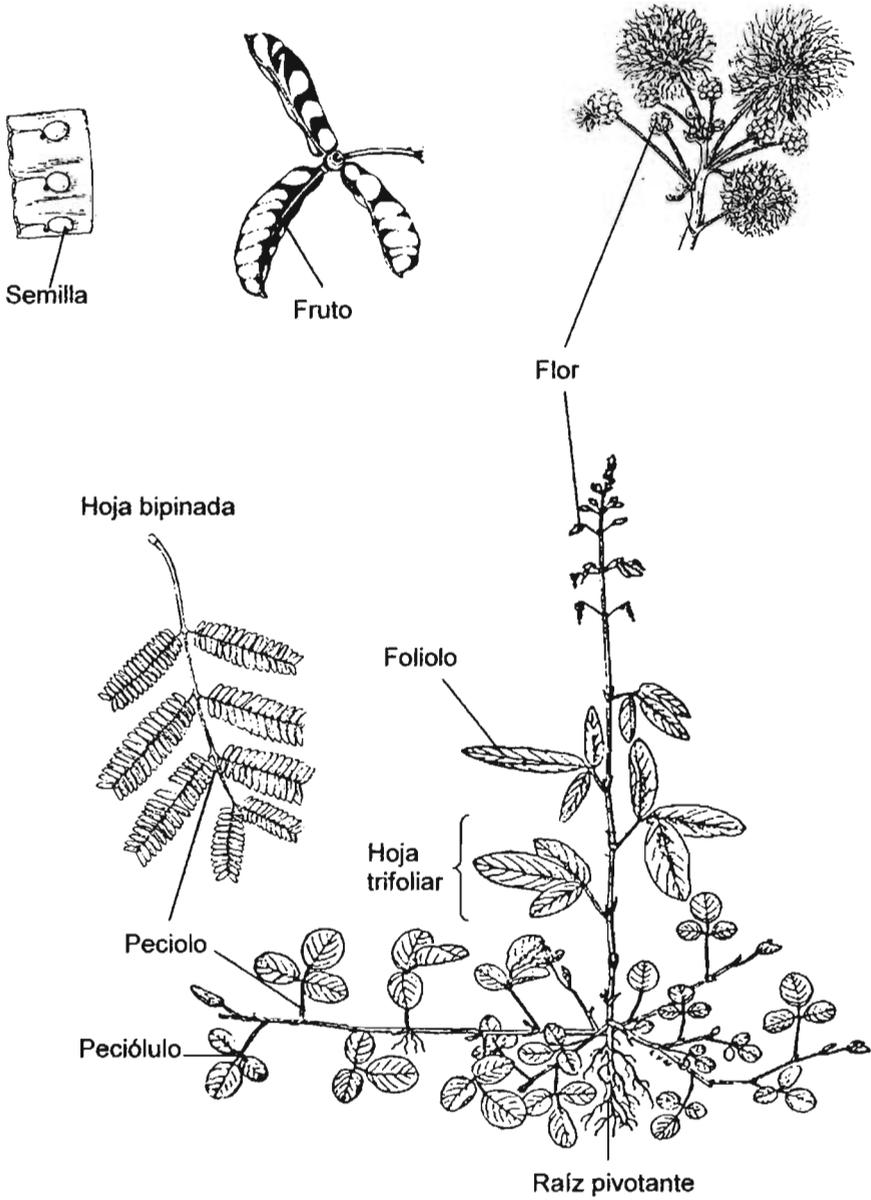


Figura 2. Morfología general de las leguminosas.<sup>17</sup>

del régimen hídrico de la localidad, el cambio de las características del suelo y la contaminación del aire.<sup>15</sup>

La zona ecológica pertenece al nivel más general de la regionalización, donde el clima marca la pauta en la delimitación de las grandes regiones naturales, ya que es determinante para la existencia de los diferentes tipos de vegetación, una fauna particular y una actividad económica específica. Se definen cuatro zonas ecológicas en el país: la árida, la templada, la tropical húmeda y la tropical seca, que cubren el 49.1%, 23.2%, 4.7% y 23%, respectivamente, del territorio nacional.<sup>18, 19</sup>

### **2.2.1 Zona árida**

Ocupa la mayor parte del centro y norte del país (Figura 3), comprendiendo los estados de: Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Zacatecas. Esta zona está determinada por la latitud y, consecuentemente, por la circulación general de los vientos, lo que provoca escasa presencia de lluvias, menor a 600 mm anuales, dando lugar a vegetación xerófita y de matorral. La enorme extensión de masa continental y la presencia de los grandes sistemas montañosos actúan como barrera para los vientos húmedos (sombra orográfica), acentuando la aridez.<sup>18</sup>

El uso del suelo se reduce a cuatro actividades fundamentales: 1) la agricultura de temporal, cuya limitante son las escasas lluvias, provocando bajos rendimientos; 2) la agricultura de riego, que cuenta con actividades agrícolas específicas; 3) la explotación de especies propias del desierto y, 4) la ganadería, fundamentalmente extensiva, que en las últimas décadas ha experimentado un proceso de crecimiento hacia la ganadería especializada.<sup>15, 20</sup>

En la zona árida se puede apreciar un importante deterioro de los sistemas naturales, que se manifiestan a través de la desertificación. Se aprecia también el desaprovechamiento de elementos naturales, que pueden ser útiles como recurso para la alimentación, vestido, etc.<sup>20</sup>

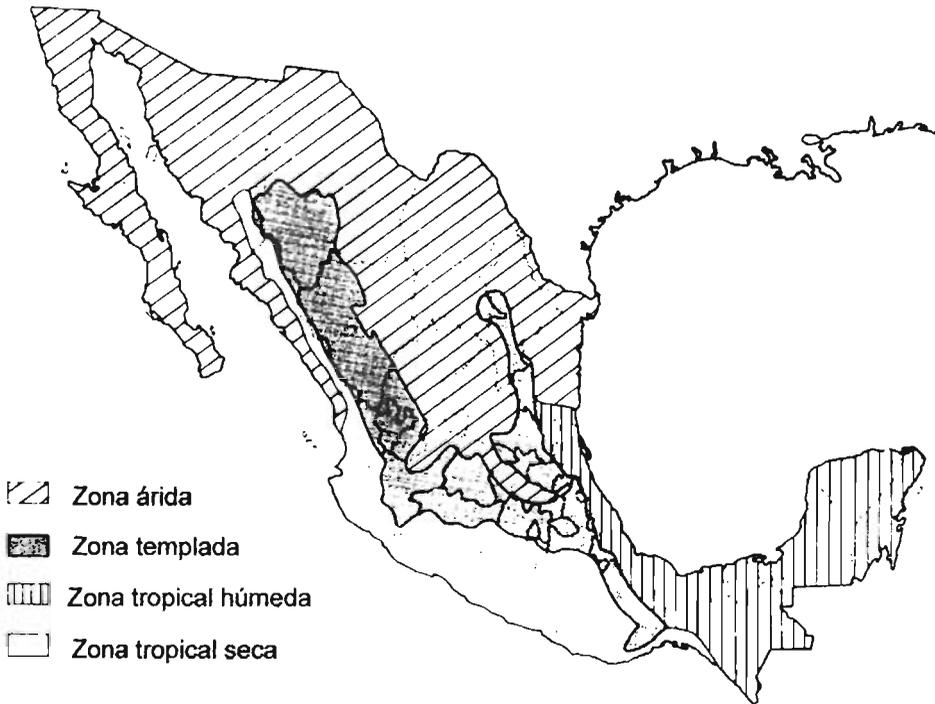


Figura 3. Zonas ecológicas de México.<sup>18</sup>

### 2.2.2 Zona templada

Esta zona se caracteriza por presentar temperaturas superiores a los 18°C en el mes más caluroso y que desciende en la época invernal, en ocasiones a 0°C. Se registran precipitaciones pluviales mayores a 600 mm anuales, concentradas en verano. Esta zona está determinada por grandes sistemas montañosos o llanuras de altitud superior a los 800 m, que suaviza el clima tropical; en ella se desarrolla vegetación de tipo boscoso, principalmente de pino (*Pinus spp*), encino (*Quercus spp*) y sus asociaciones, además de pastizales.<sup>18</sup>

Esta zona ha sido desde tiempos prehispánicos la más densamente poblada del país, ya que abarca una extensa superficie de terrenos útiles para la agricultura y ganadería. En consecuencia, su vegetación natural ha desaparecido en amplios sectores y en otros ha sido intensamente perturbada, conservando bosques sólo en lo alto de las sierras y cerros.<sup>15, 20</sup>

Esta zona involucra los estados de Chiapas, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas y el Distrito Federal (Figura 3).<sup>19</sup>

### 2.2.3 Zona tropical húmeda

En esta zona la temperatura media anual es mayor a los 18°C, con precipitaciones entre 2000 y 3000 mm distribuidos a través del año. Su clima está favorecido por la prolongada llanura costera, es netamente de vegetación de selvas altas, medianas y bajas, que coexisten con pastizales inducidos.<sup>18</sup> Esta zona está formada por los estados de Campeche, Chiapas, Puebla, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Figura 3).<sup>19</sup>

La estructura y función de las zona tropicales dependen de la diversidad ambiental. En esta zona los terrenos planos o poco inclinados, con suelos de características favorables, están generalmente ocupados por explotaciones agrícolas permanentes. Las tierras menos aptas para los cultivos se utilizan con fines ganaderos; con tal propósito, se desmonta totalmente el terreno y se siembran gramíneas adaptadas a las condiciones ecológicas y adecuadas para la alimentación del ganado.<sup>15, 20</sup>

#### **2.2.4 Zona tropical seca**

Se caracteriza por una temperatura media anual superior a los 18°C y una precipitación anual de 800-1200 mm, que se circunscribe al verano. Los tipos de vegetación son muy diversos y varían desde selva mediana y baja hasta sabanas y palmares, e incluso asociaciones de xerófitas, aunque estas últimas no son características de la zona.<sup>18</sup> Los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán forman parte de esta zona (Figura 3).<sup>19</sup>

En los Cuadros 1 y 2 se describen las especies forrajeras que se muestrearon en este estudio y que son comúnmente consumidas por los rumiantes en las distintas zonas climáticas.

Cuadro 1. Gramíneas muestreadas y presentes en diversas zonas de México.<sup>16, 21, 22, 23</sup>

Nombre científico	Nombre común	Procedencia	Clima	Ciclo	Crecimiento
<i>Buchloe dactiloides</i>	Búfalo	Nativo	Semi-árido	Perenne	Macollo estolonífero, de 10-25 cm de altura
<i>Bouteloua curtipendula</i>	Banderita Banderilla	Nativo	Semi-árido	Perenne	Macollo rizomatoso, de 50-100 cm de altura
<i>Chloris virgata</i>	Pata de pájaro Verdillo mata Wooly top	Nativo	Semi-árido	Anual	Macollo estolonífero, de 10-100 cm de altura
<i>Lolium perenne</i>	Ryegrass perenne Ballico perenne	Europa	Templado	Perenne	Macollo erecto de 30-80 cm de altura
<i>Pennisetum clandestinum</i>	Kikuyo Ya-khikhuyo	África	Templado	Perenne	Estolonífero y rizomatoso de 8-30 cm de altura
<i>Dactylis glomerata</i>	Orchard	Europa	Templado	Perenne	Macollo de 50-100 cm de alto, en ocasiones con rizomas

Cuadro 1. Gramíneas muestreadas y presentes en diversas zonas de México (Continuación).

Nombre científico	Nombre común	Procedencia	Clima	Ciclo	Crecimiento
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	Estrella Santo Domingo Estrella	Este y centro de África	Tropical húmedo	Perenne	Estolonífero de 30-70 cm de altura
<i>Paspalum conjugatum</i>	Antena Buffalo grass	América	Tropical húmedo	Perenne	Estolonífera con culmos de 40-100 cm de alto
<i>Bracharia humidicola</i>	Humidícola Ya-humidicola	Este y sur de África	Tropical húmedo	Perenne	Estolonífero y rizomatoso, alcanza una altura de 100 cm
<i>Cynodon plectostachyus</i>	Estrella africana Naivasha star grass	África	Tropical seco	Perenne	Estolonífera, sin rizomas, con una altura de 30-90 cm
<i>Andropogon gayanus</i>	Llanero Gamba grass Batag	África	Tropical seco	Perenne	Macollo de 1-3 m de alto, con pequeños rizomas
<i>Cenchrus ciliaris</i>	Buffel African fox tail	África y Asia	Tropical seco	Perenne	Macollo de 10-150 cm de alto, en ocasiones con rizomas

Cuadro 2. Leguminosas muestreadas y presentes en diversas zonas de México.<sup>17, 22, 24, 25</sup>

Nombre científico	Nombre común	Procedencia	Clima	Ciclo	Crecimiento	Hoja
<i>Acacia farnesiana</i>	Huizache Aromo	Nativo	Semi-árido	Subcaducifolio	Arbusto de 2-6 m	Bipinada
<i>Prosopis juliflora</i>	Mezquite Algarrobo	Nativo	Semi-árido	Subcaducifolio	Arbol de 8-12 m	Bipinada
<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco	Europa y Asia central	Templado	Perenne	Herbácea estolonifera de 1-30 cm	Trifoliar
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Asia central y occidental	Templado	Perenne	Herbácea de 30-120cm	Trifoliar
<i>Arachis pintoi</i>	Cacahuete forrajero	Brasil	Tropical húmedo	Perenne	Herbácea estolonifera de 20 cm	Tetrafoliar
<i>Leucaena leucocephala</i>	Guaje	Nativo	Tropical seco	Subcaducifolio	Arbol de más de 18 m	Bipinada
<i>Pithecellobium dulce</i>	Huamúchil	Nativo	Tropical seco	Subcaducifolio	Arbol de 15-20 m	Tetrafoliar

## **2.3 Consumo voluntario y selectividad**

Los animales tienen la oportunidad de modificar el comportamiento ingestivo manejando dos procesos básicos, el consumo voluntario (CV), que se refiere a la cantidad de alimento ingerido en un período determinado, y la selectividad, que implica la capacidad del animal de escoger componentes del alimento disponible. El principal problema para realizar estudios con respecto a qué y cuánto consume un animal en pastoreo es el dinamismo del sistema, a comparación de lo que sucede en un ambiente estabulado, en donde las condiciones son menos variables.<sup>4, 6, 8, 26, 27, 28, 29</sup>

### **2.3.1 Medición de consumo voluntario en pastoreo**

La medición del CV por medios directos bajo condiciones de pastoreo se basa en el pesaje de animales y/o la medición del forraje presente, ambos antes y después del pastoreo. La utilización de estos métodos trae consigo la modificación del comportamiento de los animales en estudio, errores en la toma de mediciones y la falta de ajustes, además de ser tediosos y laboriosos. Las ventajas que tienen son la relativa rapidez en la obtención de resultados y la mínima necesidad de material y equipo especializado.<sup>8, 9</sup>

También se cuenta con métodos indirectos de medición de CV, que se basan en la medición directa o indirecta de heces y digestibilidad. La medición directa de heces se realiza por colección total de las mismas, con el uso de arnés y bolsa colectoras. Esta técnica tiene como ventaja que sólo se requiere la determinación de MS y cenizas y como desventajas, la modificación del comportamiento y la incompleta colección de heces. La medición indirecta de heces es con la utilización de marcadores fecales.<sup>8, 9</sup>

La digestibilidad se puede estimar *in vivo*, *in situ* o *in vitro*, siendo esta última la más utilizada. Para llevar a cabo la estimación de la digestibilidad *in situ* o *in vitro* es necesario la toma de muestras del forraje, las cuales se obtienen por colección

manual o usando animales intervenidos quirúrgicamente (fistula esofágica y/o ruminal).<sup>8, 9</sup> El método basado en la producción fecal y digestibilidad se resume en la fórmula 1.<sup>26</sup>

$$CV \text{ (g/d)} = \frac{\text{Producción fecal}}{1 - \text{digestibilidad}} \quad (1)$$

### 2.3.2 Medición de la selectividad del alimento en pastoreo

El principal método utilizado para determinar la composición de la dieta es por examen microhistológico de muestras directas del pastizal y extrusa de animales fistulados o contenido estomacal o heces, esta última la de mayor uso; en todos los casos es necesario el monitoreo de los animales y del pastizal. El mayor atributo de esta técnica es la gran cantidad de especies identificables, siendo sus inconvenientes la modificación del comportamiento animal, en ciertos casos la falta de repeticiones, la incapacidad de identificar el componente por su alta digestibilidad, la necesidad de experiencia técnica y la incapacidad de realizar una medición cuantitativa.<sup>6, 8, 26, 30</sup>

Otros métodos para identificar los componentes de la dieta seleccionada por el animal son la relación de los isótopos estables <sup>13</sup>C y <sup>12</sup>C para diferenciar especies vegetales que presenten fotosíntesis por vía C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, y la medición de calcio (Ca) y pinitol para diferenciar leguminosas de gramíneas.<sup>6, 9, 26, 31</sup> A éstos se añan los n-alcenos de la cera cuticular vegetal, que muestran una gran promesa como marcadores para estimar la composición de la dieta.<sup>6</sup>

### 2.3.3 Marcadores fecales

Un marcador fecal puede ser considerado como aquel material encontrado en heces, sea originario de la dieta (interno) o ausente en ella (externo), pero ligado al alimento o administrado diariamente por vía oral o fístulas o por medio de dispositivos de liberación prolongada. Un marcador fecal ideal debe tener una

recuperación total en heces, no tener efecto fisiológico o tóxico, poseer características similares (en términos de tamaño y densidad de partícula) al contenido del tracto digestivo y contar con métodos específicos para medirse cualitativa y cuantitativamente. Los marcadores fecales son especialmente útiles en animales en libre pastoreo.<sup>5, 32</sup>

La estimación de la producción fecal (PF) por medio de marcadores fecales se basa en la relación del marcador consumido o dosificado y su concentración en heces, esto se puede resumir en la fórmula 2.<sup>9</sup>

$$PF \text{ (g/d)} = \frac{\text{marcador administrado (mg/d)}}{\text{marcador en heces (mg/g)}} \quad (2)$$

Para la determinación de producción fecal se han utilizado marcadores internos como: sílica, lignina, N fecal, cromógenos y cenizas ácido insolubles<sup>8, 9</sup>; el marcador externo más utilizado en mamíferos es el óxido de cromo.<sup>5</sup>

Los marcadores internos pueden ser usados para estimar la digestibilidad de la dieta; en la fórmula 3 se muestra cómo se establece la relación entre el marcador en la dieta (Md) y en heces (Mh).<sup>9</sup>

$$\text{Digestibilidad (\%)} = 100 - (100 * (\text{Md/Mh})) \quad (3)$$

En años recientes se ha utilizado a los n-alcenos como marcadores externos e internos en mediciones de selectividad, consumo voluntario y digestibilidad, obteniéndose resultados favorables.<sup>2, 6, 7, 26, 27, 30, 32</sup>

### 2.3.3.1 n-Alcanos

Los n-alcenos son las moléculas orgánicas más sencillas, ya que sólo cuentan con una estructura formada de enlaces sencillos entre carbonos e hidrógenos, siendo

su fórmula molecular general  $C_nH_{2n+2}$ . Los átomos de carbono son tetraédricos, con ángulos de enlace cercanos a  $109^\circ$ , dando a la cadena una disposición en zig-zag, y longitud de enlace entre C-C de 153 picómetros (pm) y entre C-H de 111 pm, siendo estos valores muy constantes; carecen de grupo funcional y, por lo tanto, son sustancias relativamente apolares y poco reactivas (Figura 4). Los n-alcanos se atraen entre sí a través de las fuerzas de Van der Waals.<sup>33, 34</sup>

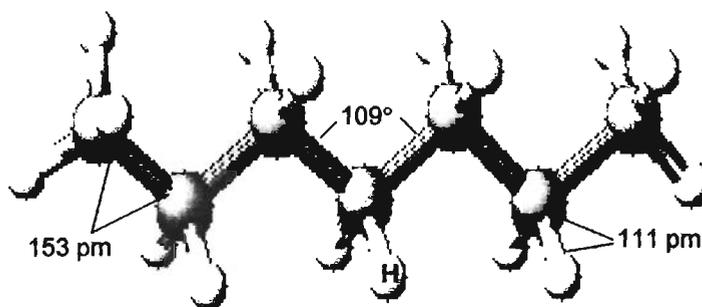


Figura 4. Estructura molecular del heptano ( $C_7$ )

La regularidad en la estructura de los n-alcanos sugiere que sus constantes físicas muestren tendencias predecibles a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) y bajo presión atmosférica. Los homólogos inferiores de la serie son gases (metano, etano, propano y butano) o líquidos incoloros (pentano al heptadecano), mientras que los homólogos superiores son sólidos con apariencia de cera (mayores a octadecano,  $C_{18}$ ). Al aumentar el área de la superficie molecular y la intensidad de las fuerzas de Van der Waals, aumenta el punto de fusión; sin embargo, estas fuerzas son relativamente débiles, por lo que incluso los homólogos de peso molecular elevado tienen puntos de fusión bajos.<sup>33, 35</sup>

Los n-alcanos están universalmente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en la superficie de vegetales, insectos y animales. En los vegetales, los n-alcanos

junto con otros componentes (Cuadro 3) son sintetizados en las células de la epidermis y secretados a la superficie tisular, para formar la cera cuticular que cubre la parte aérea de los vegetales, a excepción de los tallos y ramas maduras de arbustivas y arbóreas. La cera cuticular cumple funciones de barrera mecánica contra desgastes y rasgaduras, refracción de la luz, retención o eliminación de agua y gases, control de temperatura vegetal y previene la invasión por microorganismos.<sup>26, 36, 37</sup> La cera está dispuesta sobre la epidermis en forma de placas, bastones, gránulos y variedades de éstas (Figura 5).<sup>38</sup>

Cuadro 3. Principales componentes de la cera cuticular vegetal.<sup>36, 37, 39</sup>

Componente	Presentación
Hidrocarburos	n-Alcanos (lineales y ramificados) y n-alquenos
Alcoholes	Primarios y secundarios
Ésteres	Monoésteres, diésteres y hidroxí-ésteres
Ácidos grasos	Cadena larga
Cetonas	Cetonas, hidroxicetonas, $\beta$ -dicetonas, hidroxí- $\beta$ -dicetonas, oxo- $\beta$ -dicetonas y acetonas
Aldehídos	

Los n-alcanos más abundantes en la cera cuticular son aquéllos de cadena impar, que van de 21 a 37 carbonos, siendo predominantes el nonacosano ( $C_{29}$ ), el hentriacontano ( $C_{31}$ ) y el tritriacontano ( $C_{33}$ ), mientras los de cadena par tienen una mínima presencia.<sup>2, 36, 37</sup>

En revisiones realizadas por Dove *et al.*<sup>26</sup>, encontraron que en una investigación realizada con borregos, se observaron mínimas pérdidas de n-alcanos naturales a través de los compartimentos gástricos, mientras que la pérdida de n-alcanos utilizados como marcadores externos fue variada; por lo tanto, los n-alcanos son substancialmente indigestibles, teniendo pérdidas del 0.05-17%. La mayor

desaparición de n-alcanos sucede entre el duodeno e ileon y la secreción de n-alcanos por el intestino tal vez sea insignificante. También se han marcado n-alcanos con  $^{14}\text{C}$ , encontrando del 16-18% de los n-alcanos como  $\text{CO}_2$  respiratorio, y en ratas se han encontrado como fosfolípidos en hígado. Se ha sugerido que la microflora ruminal sintetiza una insignificante cantidad de n-alcanos ( $\sim 0.0004\%$ ) a partir de acetato.

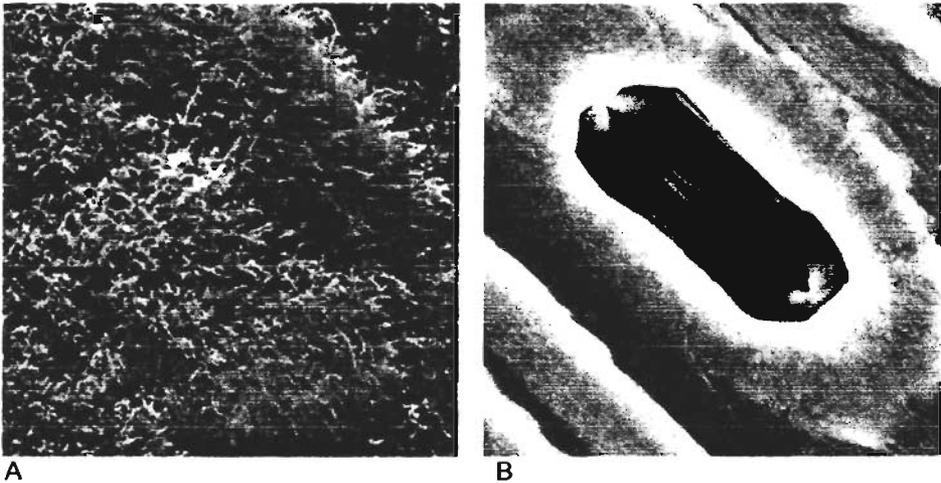


Figura 5. Micrografía de la epidermis de pino blanco (*Pinus strobus*):  
 A) superficie foliar cubierta con la cera cuticular en forma de bastones.  
 B) Misma superficie con la eliminación de la cera.<sup>38</sup>

En teoría, el número máximo de componentes de la dieta que se puede determinar es igual al número de n-alcanos presentes en la cera, pero muchos de ellos pueden estar presentes en bajas cantidades, lo que puede reducir la cantidad de componentes susceptibles de ser determinados.<sup>6</sup>

La determinación de la composición botánica de la dieta mediante la utilización de n-alcanos se realiza utilizando cuadrados mínimos o ecuaciones simultáneas. La fórmula 4 muestra un ejemplo de ecuaciones simultáneas:

$$a_{i-j} W + b_{i-j} X + c_{i-j} Y + d_{i-j} Z = e_{i-j} \quad (4)$$

donde  $W - Z$  son las proporciones de cada especie en la dieta,  $a - d$  son las concentraciones de n-alcenos  $i - j$  por especie y  $e_{i-j}$ , las concentraciones de n-alcenos en las heces después de la corrección de recuperación fecal.<sup>18</sup>

El CV se puede medir con la utilización de n-alcenos como marcadores fecales de dos formas. La más común es establecer una relación entre un n-alceno dosificado (externo) y uno presente en la cera cuticular (interno). El externo debe ser de mínima presencia o estar ausente en la cera, mientras que el interno debe ser el más abundante, además de que ambos deben tener una longitud parecida para tener una recuperación similar en heces.<sup>2, 31, 40, 41</sup> Los n-alcenos utilizados como marcadores internos son el  $C_{29}$ , el  $C_{31}$  o el  $C_{33}$  y como marcadores externos se usan el octacosano ( $C_{28}$ ) o el ditriacontano ( $C_{32}$ ). La relación se establece entre los homólogos más cercanos. Se utiliza la siguiente fórmula:

$$CV \text{ (kg MS/día)} = \frac{\frac{Hi}{Hj} \times Dj}{\left[ Fi - \frac{Hi}{Hj} \times Fj \right]} \quad (5)$$

donde  $Dj$  es la relación de liberación del n-alceno administrado,  $Hi$  y  $Fi$  son las concentraciones del n-alceno natural (interno) de heces ( $H$ ) y forraje ( $F$ ), y  $Hj$  y  $Fj$  las concentraciones del n-alceno dosificado (externo) de heces y forraje, respectivamente.<sup>7</sup>

La otra forma es por la dosificación de hexatriacontano ( $C_{36}$ ), para determinar la producción fecal, que junto con la determinación de digestibilidad (generalmente *in vitro*) da el CV, utilizando la fórmula 1.<sup>40</sup>

La herramienta de laboratorio que se utiliza para la medición de n-alcenos es la cromatografía de gases.<sup>32, 34</sup>

## 2.4 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es una técnica analítica utilizada en la separación, identificación y medición de los componentes de una mezcla. Para conocer la cantidad de cada componente es necesario adicionar a la muestra un estándar interno a una concentración conocida. La CG se ve apoyada por la utilización de la espectroscopía de masas (EM) para conocer la estructura de cada componente.<sup>42</sup>

El método analítico de CG se basa en tomar una mínima cantidad de la muestra procesada, la cual se inyecta en la cabeza de puerto o inyector del cromatógrafo, en donde es vaporizada y arrastrada por el flujo de un gas inerte (los más comunes son nitrógeno y helio) dentro de una columna capilar.<sup>42</sup>

La columna capilar es un tubo de 10-30 m de longitud y 0.1-0.5 mm de diámetro; su superficie interna se encuentra cubierta por una "fase estacionaria", que usualmente es un polímero líquido, con un alto punto de ebullición, no polar y basado generalmente en silicón. La columna está dentro de una cámara (horno), con una temperatura dependiente de la volatilidad de la muestra (0-450°C).<sup>43</sup>

Los componentes de la muestra son arrastrados por el gas a diferente velocidad a través de la columna, dependiendo del punto de ebullición y el grado de afinidad por la fase estacionaria. Al período que tarda la muestra en pasar por la columna se le llama tiempo de retención, que varía de 1-30 minutos.<sup>42</sup> El gas de arrastre

fluye a un detector, que registra el paso de cada molécula; los detectores más usados son el de conductividad térmica y de ionización de flama.<sup>43</sup>

Mediante el software del cromatógrafo, se obtiene una grafica de la muestra, llamada cromatograma, en donde se muestran picos representativos de cada molécula presente en la extracción. Los picos presentan un área y un tiempo de retención, los cuales indican qué n-alcano es y su concentración (Figura 6).

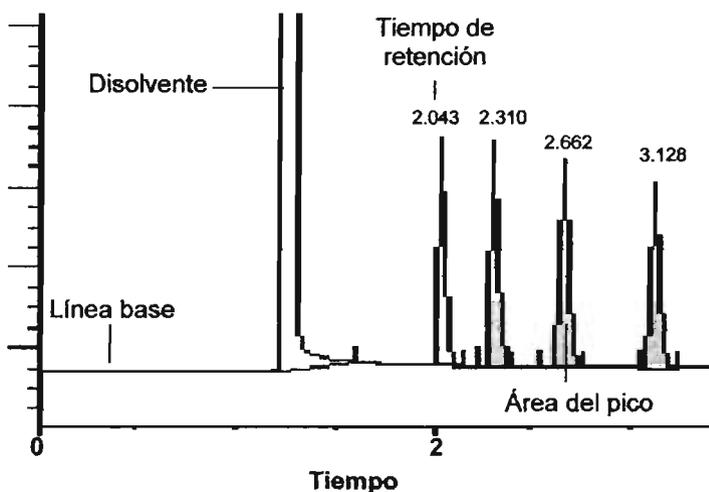


Figura 6. Cromatograma

## 2.5 Análisis multivariado

El análisis multivariado se refiere a todo método estadístico que analiza simultáneamente múltiples mediciones de cada individuo u objeto bajo investigación. Para ser considerado realmente un análisis multivariado, todas las variables (más de dos) deben ser aleatorias y estar interrelacionadas. Algunos

métodos multivariados transforman y presentan de una forma nueva los datos, sin perder mucha información inicial.<sup>44, 45</sup>

Entre las técnicas multivariadas más conocidas se encuentran: 1) la regresión múltiple y la correlación múltiple; 2) el análisis discriminante múltiple; 3) los componentes principales y el análisis de factor común; 4) el análisis multivariado de varianza y covarianza; 5) la correlación canónica; 6) el análisis de conglomerados; 7) la transformación multidimensional, y 8) el análisis de conjunto.<sup>45</sup>

### **2.5.1 Componentes principales**

El análisis de componentes principales consiste en una técnica de reducción de la información disponible sobre un conjunto de individuos, de los cuales se han tomado diversas observaciones de varias de sus características. El objetivo del método consiste en reducir las dimensiones de las variables  $X$ , construyendo un número menor de variables, de manera que expliquen una proporción grande de la dispersión total contenida en los datos originales. Es frecuente que unos pocos componentes principales expliquen una proporción elevada de la varianza, con lo que la reducción de dimensionalidad es considerable.<sup>45</sup>

### **2.5.2 Análisis discriminante**

El análisis discriminante es la técnica estadística apropiada cuando la variable dependiente es categórica (nominal) y las variables independientes son numéricas. Esta es una técnica de clasificación y asignación de un individuo a un grupo definido *a priori*, con características conocidas.<sup>44, 45</sup>

Un análisis discriminante conlleva a encontrar una o varias funciones discriminantes, que son una combinación lineal de las variables originales, que discriminen mejor entre los grupos definidos. La discriminación se logra por el

establecimiento de ponderaciones para cada variable con objeto de maximizar la relativa variación entre grupos, más que la variación dentro del grupo. La función discriminante deriva de la fórmula 6,<sup>45</sup>

$$Z = W_1X_1 + W_2X_2 + W_3X_3 + \dots + W_pX_p \quad (6)$$

donde  $Z$  es el puntaje discriminante,  $W_p$  es el ponderador discriminante para la variable  $p$ , y  $X_p$  es la variable independiente  $p$ . El análisis discriminante multiplica cada variable independiente por su correspondiente ponderador y realiza la sumatoria de estos productos. El resultado es un valor por cada individuo con capacidad de identificar la pertenencia al grupo.<sup>45</sup> Al aplicar la función discriminante a los promedios del grupo se obtienen los centroides. Se calcula la distancia de un valor de la función discriminante de una observación en particular para cada uno de los centroides y se asigna al grupo más cercano (Jorge Lecumberri, comunicación personal).

### **3. Justificación**

Es de importancia el conocimiento de qué y cuánto consumen los rumiantes en condiciones de estabulación y pastoreo, siendo de mayor dificultad realizar estudios con animales que se encuentran en agostaderos o praderas. Por ello se han realizado investigaciones con el uso de marcadores fecales. Entre ellos se encuentran los n-alcenos, hidrocarburos saturados que sirven para estimaciones de CV y de composición botánica de la dieta seleccionada de forma individual (por animal), además de permitir realizar otras mediciones indirectas, como digestibilidad.

Para realizar dichas mediciones de consumo con hidrocarburos saturados es necesario tener el conocimiento de cómo se comporta el perfil de n-alcenos de las diferentes especies vegetales que son disponibles para un rumiante en pastoreo/ramoneo, para así determinar cuáles son los n-alcenos factibles a usarse en las fórmulas de CV y composición botánica de la dieta. En la literatura se encuentra información básicamente de especies vegetales de clima templado y tropical de ciertos países, de las cuales algunas están presentes en nuestro país, pero otras no. Se carece principalmente de información de forrajes de zonas áridas.

#### **4. Hipótesis**

- El perfil de n-alcanos es diferente entre gramíneas y leguminosas de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco, en época de lluvias.
- El perfil de n-alcanos es diferente en forrajes de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco, en época de lluvias.
- La concentración del n-alcanos  $C_{31}$  es similar a las 4 y 6 semanas de rebrote en forrajes de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco, en época de lluvias.

## 5. Objetivos

- Medir cualitativa y cuantitativamente a los n-alcenos  $C_{20}$ - $C_{36}$  de forrajes de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco, en época de lluvias.
- Determinar un perfil de n-alcenos que permita realizar estimaciones taxonómicas de especie, clima de muestreo y familia, en forrajes de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco, en época de lluvias.
- Establecer si existe diferencia en la concentración del n-alceno  $C_{31}$  a las 4 y 6 semanas de rebrote en la época de lluvias en forrajes de clima semi-árido, templado, tropical húmedo y tropical seco.

## **6. Material y Métodos**

Para el presente estudio se muestrearon 19 forrajes, cinco de clima semiárido, cinco de clima templado, cuatro de clima tropical húmedo y cinco de clima tropical seco, que fueron congelados, liofilizados, molidos y sometidos al procedimiento de extracción y medición de n-alcenos. Los forrajes están descritos en los Cuadros 1 y 2.

### **6.1 Sitios de muestreo**

Los pastos banderita, búfalo y pata de pájaro y las leguminosas arbóreas mezquite y huizache se muestrearon en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA), ubicado en Calle Pino No. 20, municipio de Santillán, Tequisquiapan, Querétaro, a 20°31' latitud norte, 99°14' longitud oeste y a 1880 msnm. El municipio presenta un clima semiseco templado (BS1k), con una temperatura promedio de 17.2°C y una precipitación anual de 560.8 mm.<sup>46</sup>

Los pastos ryegrass perenne, orchard y kikuyo y las leguminosas alfalfa y trébol blanco se muestrearon en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Bovina y Caprina (CEIEPByC), ubicado en el km 44.5 de la Autopista México-Querétaro, Tepetzotlán, Edo. de México, a 19°43' latitud norte, 99°13' longitud oeste y a 2300 msnm. El área presenta un clima templado subhúmedo, con lluvias en verano (Cw), con temperatura promedio entre 14 a 18°C y una precipitación pluvial de 600-700 mm.<sup>47</sup>

En el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) se realizó el muestreo de los pastos antena, estrella de Santo Domingo y humidícola y de la leguminosa cacahuate forrajero. El Centro está ubicado en el km 5.5 de la Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Tlapacoyan, Veracruz, a 19°58' latitud norte, 97°13' longitud oeste y a 430 msnm. En la zona, el clima es cálido húmedo, con lluvias todo el año (Af), con

una precipitación anual de 1840 mm y una temperatura promedio de 23.4°C.<sup>48</sup>

En el municipio de Miacatlán, Mor., se realizó el muestreo de los pastos buffel, estrella africana y llanero y de las leguminosas arbóreas guaje y huamúchil. El municipio se localiza a 18°46' latitud norte, 99°22' longitud oeste y a una altitud de 1000 msnm. Presenta un clima cálido subhúmedo, con lluvias en verano (Aw), una temperatura promedio de 22°C y una precipitación pluvial de 1112 mm.<sup>49</sup>

## 6.2 Muestreo

En las especies de los climas templado y tropical húmedo (ryegrass perenne, orchard, kikuyo, alfalfa, trébol blanco, antena, estrella de Santo Domingo, humidícola y cacahuate forrajero) y en las gramíneas de clima tropical seco (buffel, estrella africana y llanero), se realizó un corte de homogenización con tijera, a una altura de 5 cm y en una superficie de 0.5 m<sup>2</sup>. Se prosiguió a colocar una jaula de exclusión por especie, elaborada con varilla y malla gallinera, que cubría un área de 0.25 m<sup>2</sup> y una altura de 0.5 m, con el fin de evitar el pastoreo. Se realizaron dos muestreos de los forrajes durante la época de lluvias, a las 4 y 6 semanas de rebrote. El calendario de muestreo se presenta en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Calendario de muestreo de los forrajes en estudio

Clima	Fecha de muestreo	
	Primer corte	Segundo corte
Semi-árido	1-Agosto-2002	12-Septiembre-2002
Templado	26-Julio-2002	6-Septiembre-2002
Tropical húmedo	15-Agosto-2002	28-Agosto-2002
Tropical seco	16-Julio-2002	1-Agosto-2002

Para los forrajes de clima semi-árido y las leguminosas arbóreas de tropical seco no se recurrió al uso de jaulas de exclusión. Los pastos pata de pájaro, búfalo y banderita y los árboles mezquite, huizache, guaje y huamúchil se muestrearon a las 4 y 6 semanas de haber iniciado la época de lluvias (Cuadro 4). El pasto pata de pájaro fue muestreado en un sólo sitio, mientras que los pastos búfalo y banderita se muestrearon en varios sitios del agostadero.

En las fechas de muestreo, las plantas de crecimiento herbáceo fueron cortadas con tijera a una altura del suelo de 5 cm; posteriormente, a las plantas se les retiró la inflorescencia o flor y materia muerta; los tallos y hojas se empaquetaron en plástico y se identificaron. Los paquetes se hicieron de un tamaño de 13 cm de largo x 3 cm de ancho, se sujetaron con hilo cáñamo, dejando un cordón de 1 m, y se sumergieron en un tanque con nitrógeno líquido durante 5 minutos.<sup>26</sup>

En el caso de las arbóreas se muestrearon las ramas de un árbol de cada especie. El muestreo de huizache se hizo a una altura de 1.3 a 2.5 m; el de mezquite entre 1.5 y 3 m; el de huamúchil, a una altura entre 1.8 y 3 m, y el de guaje, entre 2 y 3 m. A las ramas se les desfolió y los foliolos se empaquetaron y congelaron en nitrógeno líquido.

Los paquetes, una vez congelados, se colocaron en una hielera con hielo común, a una temperatura promedio de 4°C, para ser llevados al laboratorio de Bromatología del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde se mantuvieron congelados a -20°C hasta su liofilización.

### **6.3 Liofilización y molido**

A los paquetes se les retiró el hilo cáñamo y se perforaron para que al momento de ser colocados en la liofilizadora, la muestra se secase adecuadamente. La liofilización se llevó a cabo durante 18 hrs, a una temperatura de -47°C y una presión de vacío de 1 a 0 psi. Las muestras secas

se molieron, con un tamaño de partícula menor a 1 mm y se realizó una homogenización final.

#### **6.4 Medición de n-alcenos**

Para la determinación del perfil de n-alcenos de cada especie, se procesó por triplicado cada muestra, tomando 1 g para cada extracción.

Para la extracción de los n-alcenos, la muestra se depositó junto con el estándar interno ( $C_{34}$ ) (Anexo I) y el KOH etanólico (Anexo II) en un matraz para su saponificación (en baño de agua); se prosiguió a realizar tres lavados con heptano para obtener la fase orgánica y ésta se purificó a través de una columna de gel de sílica (Anexo III). El eluyente se evaporó y se rediluyó a una concentración conocida. La descripción completa del método se encuentra en el Anexo IV.

Cada extracto se inyectó una vez en el cromatógrafo de gases (Anexo V), obteniendo un cromatograma, que indica el tiempo de retención y el área bajo el pico de cada n-alceno, de  $C_{20}$  a  $C_{36}$  (Anexo VI). Dichos datos se procesaron junto con los datos obtenidos de la inyección de la curva de calibración (Anexo VII) y del estándar interno de la muestra, para la determinación cualitativa y cuantitativa de cada n-alceno.

Esta fase del estudio se realizó en el laboratorio de Diseño de Experimentos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, UNAM.

#### **6.5 Análisis estadístico**

Las concentraciones de los n-alcenos impares de  $C_{27}$  a  $C_{35}$  no presentaron una distribución normal; por lo tanto, se les sometió a una transformación Box Cox, para acercarlos a la normalidad.

Con los datos transformados se llevó a cabo un análisis de varianza, mediante la utilización de un diseño de parcelas divididas, para encontrar si existía

diferencia estadística de la concentración de  $C_{31}$ , entre las edades de rebrote (4 y 6 semanas). Se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + F_j + (CF)_{ij} + M_k + (CM)_{ik} + (FM)_{jk} + (CMF)_{ijk} + E_{ijkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$  =  $i$ -ésima concentración de  $C_{31}$  en el  $k$ -ésimo muestreo para el  $j$ -ésimo forraje en el  $i$ -ésimo clima

$\mu$  = media de la concentración de  $C_{31}$  en los forrajes

$C_i$  = efecto del  $i$ -ésimo clima.  $i = 1, \dots, 4$

$F_j$  = efecto del  $j$ -ésimo tipo de forraje,  $j = 1, 2$

$(CF)_{ij}$  = error A

$M_k$  = efecto del  $k$ -ésimo muestreo,  $k = 1, 2$

$(CM)_{ik}$  = efecto de la interacción clima x muestreo

$(FM)_{jk}$  = efecto de la interacción tipo de forraje x muestreo

$(CMF)_{ijk}$  = efecto de la triple interacción

$E_{ijkl}$  = error experimental

La transformación Box Cox y el análisis de varianza de parcelas divididas se realizó con el programa JMP.<sup>50</sup>

Asimismo, los datos transformados fueron utilizados para: 1) calcular la matriz de correlación entre los n-alcanos  $C_{27}$ ,  $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ,  $C_{33}$  y  $C_{35}$ ; 2) realizar un análisis de componentes principales, y 3) llevar a cabo un análisis discriminante con función canónica, para determinar la capacidad que tienen los n-alcanos de distinguir entre las 19 especies muestreadas, el clima de muestreo y familia a la que pertenecen las especies. Esta parte del análisis estadístico se realizó con el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versión 8.0.<sup>51</sup>

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Perfil por especie

En los Cuadros 5-8 se muestra el perfil de los n-alcanos más abundantes de cada especie vegetal muestreada a las 4 y 6 semanas de rebrote. Esos n-alcanos fueron el C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub>, lo que coincide con los n-alcanos más abundantes consignados en la literatura para los forrajes de clima templado y tropical, que son impares y van del C<sub>25</sub> al C<sub>35</sub>.<sup>52, 53, 54, 55, 56</sup>

Como puede observarse en los cuadros, cada especie presentó concentraciones de n-alcanos diferentes, en rangos que variaron de 3.1 a 954.2 mg/kg de MS. En los cuadros se han resaltado los n-alcanos más abundantes de cada forraje.

#### 7.1.1 Factores que influyen en el perfil de n-alcanos

Muchos factores afectan la concentración de los n-alcanos en un forraje, tales como la especie, la parte de la planta, la edad y el ambiente.<sup>2, 57, 58, 59, 60</sup>

##### 7.1.1.1 Efecto de la especie vegetal

Englinton *et al.*<sup>61</sup> y Dyson *et al.*<sup>62</sup> señalaron que la especie contribuye con más del 90% de la variación en la concentración de n-alcanos. Dove *et al.*<sup>52</sup> encontraron que la especie vegetal contribuye con el 85% de la variación en la concentración de hidrocarburos, en comparación con el mínimo efecto que tienen la edad (6%) y la parte vegetal. Chen *et al.*<sup>57</sup> realizaron tres muestreos de forrajes de clima templado y encontraron que el efecto de especie fue altamente significativo con relación a momento y sitio de muestreo y contribuía con 87-93% del total de la variación en la concentración de n-alcanos.

Cuadro 5. Perfil de n-alcános (mg/kg MS) de forrajes de clima semi-árido.

Especie	Rebrote (semanas)		n-Alcano				
			C <sub>27</sub>	C <sub>29</sub>	C <sub>31</sub>	C <sub>33</sub>	C <sub>35</sub>
<b>Gramíneas</b>							
Banderita	4	Media	5.76	<b>24.99</b>	<b>54.69</b>	<b>10.36</b>	3.26
		D.E	0.56	5.17	4.89	1.28	0.23
	6	Media	8.25	<b>31.12</b>	<b>49.98</b>	<b>9.50</b>	4.22
		D.E	0.70	4.08	2.07	1.66	0.94
Búfalo	4	Media	<b>11.25</b>	<b>32.63</b>	<b>23.29</b>	7.99	4.20
		D.E	1.93	1.26	1.62	0.31	2.16
	6	Media	<b>24.04</b>	<b>55.39</b>	<b>39.50</b>	17.52	11.00
		D.E	7.28	12.27	6.10	3.88	3.21
Pata de pájaro	4	Media	<b>43.35</b>	<b>64.49</b>	<b>97.82</b>	37.95	15.80
		D.E	8.16	12.39	7.77	0.86	8.93
	6	Media	58.75	<b>88.68</b>	<b>137.61</b>	<b>92.31</b>	25.01
		D.E	5.60	5.59	4.07	1.01	4.70
<b>Leguminosas</b>							
Huizache	4	Media	<b>60.83</b>	<b>229.77</b>	<b>11.93</b>	7.20	3.67
		D.E	3.88	15.87	2.38	0.42	0.44
	6	Media	<b>61.43</b>	<b>215.42</b>	<b>18.50</b>	8.20	4.25
		D.E	10.64	15.38	0.85	0.85	0.20
Mezquite	4	Media	<b>91.72</b>	<b>450.18</b>	<b>18.79</b>	7.19	4.10
		D.E	6.48	45.76	6.81	2.32	0.97
	6	Media	<b>96.43</b>	<b>469.19</b>	<b>13.84</b>	6.21	3.56
		D.E	25.28	85.97	2.51	0.71	0.58

D.E = Desviación estándar

Cuadro 6. Perfil de n-alcanos (mg/kg MS) de forrajes de clima templado.

Especie	Rebrote (semanas)		n-Alcano				
			C <sub>27</sub>	C <sub>29</sub>	C <sub>31</sub>	C <sub>33</sub>	C <sub>35</sub>
<b>Gramíneas</b>							
Ryegrass perenne	4	Media	24.66	<b>76.99</b>	<b>138.21</b>	<b>113.32</b>	20.89
		D.E	1.33	1.29	2.69	6.84	3.65
	6	Media	23.85	<b>88.28</b>	<b>168.39</b>	<b>126.49</b>	19.78
		D.E	3.65	2.89	3.43	1.48	1.07
Orchard	4	Media	17.12	<b>18.54</b>	<b>33.46</b>	<b>30.23</b>	8.84
		D.E	0.65	0.59	7.95	2.14	0.34
	6	Media	17.85	<b>23.45</b>	<b>38.10</b>	<b>37.73</b>	13.71
		D.E	1.04	1.24	3.02	4.04	2.25
Kikuyo	4	Media	33.47	47.79	<b>169.76</b>	<b>172.72</b>	<b>73.90</b>
		D.E	1.13	1.09	1.32	5.01	3.06
	6	Media	24.85	33.98	<b>149.09</b>	<b>246.80</b>	<b>160.96</b>
		D.E	1.23	1.50	2.33	2.16	1.76
<b>Leguminosas</b>							
Alfalfa	4	Media	<b>38.13</b>	<b>133.25</b>	<b>230.11</b>	19.33	4.54
		D.E	12.43	4.19	9.51	0.84	0.29
	6	Media	<b>27.90</b>	<b>106.81</b>	<b>185.75</b>	13.96	3.75
		D.E	0.99	0.81	3.87	0.45	0.39
Trébol blanco	4	Media	<b>30.93</b>	<b>46.61</b>	<b>34.48</b>	13.94	5.92
		D.E	1.13	0.59	4.11	3.27	0.40
	6	Media	25.04	<b>47.41</b>	<b>56.61</b>	<b>37.81</b>	6.01
		D.E	0.71	0.70	1.68	1.14	0.17

D.E = Desviación estándar

Cuadro 7. Perfil de n-alcános (mg/kg MS) de forrajes de clima tropical húmedo.

Especie	Rebrote (semanas)		n-Alcano				
			C <sub>27</sub>	C <sub>29</sub>	C <sub>31</sub>	C <sub>33</sub>	C <sub>35</sub>
<b>Gramíneas</b>							
Estrella Santo Domingo	4	Media	15.82	34.88	<b>115.48</b>	<b>180.10</b>	<b>45.42</b>
		D.E	6.46	6.39	12.98	13.09	1.74
	6	Media	18.98	<b>36.79</b>	<b>95.73</b>	<b>146.88</b>	35.27
		D.E	0.44	1.26	3.17	4.45	2.55
Antena	4	Media	10.16	19.91	<b>74.21</b>	<b>244.89</b>	<b>210.58</b>
		D.E	2.83	5.59	11.61	5.59	2.97
	6	Media	5.21	13.39	<b>61.26</b>	<b>239.37</b>	<b>203.80</b>
		D.E	1.32	3.00	10.76	11.05	6.36
Humidícola	4	Media	9.26	23.76	<b>98.66</b>	<b>186.58</b>	<b>80.28</b>
		D.E	0.37	1.22	6.44	6.50	3.13
	6	Media	8.92	22.81	<b>86.59</b>	<b>159.79</b>	<b>71.65</b>
		D.E	0.66	1.51	10.13	3.70	1.91
<b>Leguminosa</b>							
Cacahuete forrajero	4	Media	5.32	<b>22.49</b>	<b>52.88</b>	<b>95.28</b>	14.61
		D.E	0.43	0.97	2.25	11.20	4.58
	6	Media	5.29	<b>18.47</b>	<b>48.51</b>	<b>85.53</b>	12.05
		D.E	0.32	0.33	2.86	2.05	1.03

D.E = Desviación estándar

Cuadro 8. Perfil de n-alcenos (mg/kg MS) de forrajes de clima tropical seco.

Especie	Rebrote (semanas)		n-Alcano				
			C <sub>27</sub>	C <sub>29</sub>	C <sub>31</sub>	C <sub>33</sub>	C <sub>35</sub>
<b>Gramíneas</b>							
Estrella Africana	4	Media	9.84	27.52	<b>96.04</b>	<b>152.20</b>	<b>32.52</b>
		D.E	0.35	0.53	1.56	4.07	2.92
	6	Media	10.30	27.47	<b>108.03</b>	<b>168.70</b>	<b>31.31</b>
		D.E	0.34	3.17	5.76	1.88	2.97
Buffel	4	Media	8.75	<b>45.08</b>	<b>180.96</b>	<b>183.28</b>	43.87
		D.E	0.06	4.42	0.82	1.51	1.37
	6	Media	9.44	<b>54.78</b>	<b>199.21</b>	<b>200.87</b>	47.71
		D.E	0.63	3.52	1.19	2.36	0.73
Llanero	4	Media	12.88	<b>27.47</b>	<b>61.66</b>	<b>16.86</b>	10.27
		D.E	0.73	0.73	4.61	2.61	0.23
	6	Media	12.98	<b>24.78</b>	<b>47.04</b>	<b>15.90</b>	11.44
		D.E	1.83	2.15	3.40	6.28	0.17
<b>Leguminosas</b>							
Guaje	4	Media	<b>24.63</b>	<b>27.10</b>	<b>14.85</b>	5.00	3.14
		D.E	0.20	1.07	2.92	0.35	0.07
	6	Media	<b>34.11</b>	<b>40.17</b>	<b>26.98</b>	12.19	3.24
		D.E	1.26	2.27	2.22	2.01	0.24
Huamúchil	4	Media	<b>24.58</b>	<b>557.97</b>	<b>316.72</b>	21.99	4.78
		D.E	0.85	14.89	5.80	1.11	0.24
	6	Media	29.46	<b>954.24</b>	<b>486.83</b>	<b>30.84</b>	5.99
		D.E	2.75	29.21	20.19	4.82	1.59

D.E = Desviación estándar

### 7.1.1.2 Efecto de la parte anatómica

Smith *et al.*<sup>58</sup> estudiaron el efecto de la parte anatómica de la gramínea (tallo, hoja e inflorescencia) en el perfil de n-alcános de la planta completa. Al realizar muestreos durante la época de lluvias encontraron que la concentración de los n-alcános C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub> y C<sub>29</sub> era mayor en las inflorescencias que en las hojas y en las hojas que en los tallos. No hubo diferencia significativa en las concentraciones de C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub> entre inflorescencias y hojas, estos n-alcános sí fueron significativamente más abundantes en estas estructuras que en los tallos. En la época de lluvias, cuando predominan las hojas e inflorescencias, las concentraciones de C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub> de la planta completa fueron similares a las de las hojas/inflorescencias. Laredo *et al.*<sup>63</sup> también encontraron diferencias en las concentraciones de C<sub>27</sub> a C<sub>35</sub> en forrajes de clima tropical, observando valores mucho mayores en las hojas que en los tallos.

De acuerdo con esos investigadores (Smith *et al.*<sup>58</sup> y Laredo *et al.*<sup>63</sup>), se puede suponer que las concentraciones de los n-alcános de las especies vegetales analizadas en el presente estudio estuvieron altamente influidas por las concentraciones de las hojas y, por lo tanto, en aquellos forrajes que en proporción tuvieran mayor cantidad de hojas que de tallos, se podría esperar que el perfil de n-alcános de la planta completa fuera semejante al de la hoja. Sin embargo, esto no fue lo que sucedió en el presente estudio con ryegrass perenne y kikuyo. El primero tiene más hojas que tallos que el segundo, pero kikuyo presentó una mayor concentración de los n-alcános impares C<sub>27</sub>-C<sub>35</sub> (excepto C<sub>29</sub>) que el ryegrass perenne (Cuadro 6). Por lo tanto, no todas las especies que tienen mayor cantidad de hojas presentan mayor concentración de n-alcános. Por tal motivo, es necesario separar a las plantas en sus componentes estructurales para observar el efecto real en el perfil de n-alcános de la planta completa. Otro estudio importante sería establecer la relación entre número de hojas y la concentración de n-alcános, ya que puede suceder que mientras más hojas haya,

menor sea la concentración de hidrocarburos saturados en cada hoja y mientras menos hojas, más se concentre el contenido de n-alcanos en cada una de ellas.

### 7.1.1.3 Efecto del ambiente

Existen referencias acerca del efecto que puede tener el ambiente sobre las características de la cera cuticular de diferentes especies vegetales. Wilkinson *et al.*<sup>59</sup> encontraron que las interacciones de temperatura y fotoperíodo afectan la cantidad de cera cuticular y la concentración de n-alcanos en la planta del tabaco, lo cual podría suceder en las especies analizadas en este trabajo. Shelvey *et al.*<sup>56</sup> observaron que la cantidad de cera cuticular en ryegrass perenne se vio modificada por la cantidad de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en el ambiente, pero su composición fue la misma. Especies que crecen con alta intensidad de luz o con reducida humedad desarrollan cutículas gruesas, también se halló que el xeromorfismo no tiene nada que ver con el grosor de la cutícula. Trabajos con avena y cebada, bajo condiciones controladas, encontraron que la deposición de cera fue directamente proporcional a la intensidad de la luz e inversamente proporcional a la humedad relativa.<sup>60</sup>

Herbin *et al.*<sup>64</sup> mencionan que las características ambientales pueden afectar el perfil de n-alcanos de algunas plantas, pero otras especies vegetales tienen concentraciones muy estables de n-alcanos, que no se afectan por influencias externas. Esto significa que las plantas poseen una gran variedad de respuestas a las condiciones ambientales, entre las que destacan las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares. Referente a esto se puede citar la presencia de estomas, la suberina, el tamaño y la forma de las hojas, los movimientos de la planta, la rapidez en la utilización de agua, las fitohormonas y las proteínas de choque térmico.<sup>65, 66</sup>

### 7.1.2 Relaciones entre los n-alcenos

De las 19 especies muestreadas, para 10 existe información en la literatura con respecto a la composición de la cera cuticular: pata de pájaro, orchard, ryegrass perenne, kikuyo, trébol blanco, alfalfa, estrella Santo Domingo, buffel, llanero y guaje. Las especies de clima templado y tropical han sido las más estudiadas.

En forma general, las concentraciones de los n-alcenos obtenidas en el presente estudio fueron muy diferentes a las publicadas, aunque se debe aclarar que tampoco se encuentra mucha correspondencia entre los valores consignados en la literatura. Dove, en su serie de publicaciones, ha mencionado que es importante considerar las relaciones entre las concentraciones de los n-alcenos para las estimaciones de CV y composición botánica de la dieta, por ejemplo la relación de  $C_{29}:C_{31}$  y  $C_{29}:C_{33}$ .<sup>26, 27, 32, 40</sup> Puede existir variación en las concentraciones mientras las relaciones entre n-alcenos se mantengan constantes.

Siguiendo esta recomendación, se calcularon algunas relaciones con los datos del presente estudio y se compararon con relaciones publicadas. Se encontró que las relaciones calculadas fueron similares a las publicadas, pero no en todas las especies. En los pastos ryegrass perenne, kikuyo y buffel las relaciones  $C_{29}:C_{31}$ ,  $C_{31}:C_{33}$  y  $C_{33}:C_{35}$  fueron muy semejantes.<sup>26, 40, 58, 67, 68</sup> En trébol blanco la relación  $C_{29}:C_{31}$  consignada en la literatura varía de 0.84 a 1.6 y aquí fue de 1 (Cuadro 9).<sup>25, 29, 31, 56, 67, 69, 70</sup>

Asimismo, las relaciones calculadas de los n-alcenos más abundantes en pata de pájaro, orchard, alfalfa, estrella Santo Domingo, llanero y guaje fueron muy similares a las relaciones consignadas en la literatura, como se muestra en el Cuadro 9.<sup>2, 27, 54, 58</sup>

Con esto se pudo observar que los n-alcenos siguen un patrón, ya que al aumentar un n-alceno otro puede aumentar o disminuir en la misma proporción,

según sea el caso, no importando donde haya sido tomada la muestra vegetal, sobre todo se observo con los dos n-alcenos más abundantes en cada especie.

Cuadro 9. Relaciones entre las concentraciones de los n-alcenos más importantes en algunas especies.

Especie	Relación C <sub>29</sub> :C <sub>31</sub>		Relación C <sub>31</sub> :C <sub>33</sub>		Relación C <sub>33</sub> :C <sub>35</sub>	
	Presente estudio	Otros estudios	Presente estudio	Otros estudios	Presente estudio	Otros estudios
Pata de pájaro	<b>0.64</b>	<b>0.68<sup>25*</sup></b>	1.49	0.68 <sup>25</sup>	3.2	1.9 <sup>25</sup>
Ryegrass perenne	<b>0.5</b>	<b>0.5<sup>40</sup></b>	<b>1.2</b>	<b>1.1<sup>40</sup></b>	<b>5.9</b>	<b>6.9<sup>40</sup></b>
Orchard	<b>1.7</b>	<b>1.5<sup>54</sup></b>	1.1	2.7 <sup>54</sup>	3.0	-
Kikuyo	<b>0.3</b>	<b>0.3<sup>58</sup></b>	<b>0.7</b>	<b>0.6<sup>58</sup></b>	<b>1.7</b>	<b>1.4<sup>58</sup></b>
Alfalfa	<b>0.5</b>	<b>0.6<sup>54</sup></b>	12.4	15.4 <sup>54</sup>	4.0	-
Trébol blanco	<b>1.0</b>	<b>1.0<sup>69</sup></b>	1.7	97.1 <sup>69</sup>	5.8	8.0 <sup>70</sup>
Estrella Sto. Domingo	1.6	2.2 <sup>2</sup>	<b>0.6</b>	<b>0.4<sup>2</sup></b>	4.2	6.4 <sup>2</sup>
Buffel	<b>1.0</b>	<b>0.7<sup>25</sup></b>	<b>1.0</b>	<b>1.4<sup>25</sup></b>	<b>4.2</b>	<b>4.4<sup>25</sup></b>
Llanero	<b>0.5</b>	<b>0.8<sup>25</sup></b>	3.0	1.5 <sup>25</sup>	1.4	2.9 <sup>25</sup>
Guaje	<b>1.6</b>	<b>1.2<sup>2</sup></b>	2.4	1.3 <sup>2</sup>	2.7	10.0 <sup>2</sup>

\*Indica la referencia del artículo donde se consigna la información

### 7.1.3 Contribución de cada n-alceno en el perfil de n-alceno C<sub>24</sub>-C<sub>36</sub>

La información hasta aquí presentada señala a los n-alcenos impares C<sub>27</sub> a C<sub>35</sub> como los más abundantes. Sin embargo, los cromatogramas de cada especie

identificaron n-alcanos de cadena más corta, desde  $C_{20}$  (Anexo VI). El análisis de los cromatogramas indicó que el n-alcano a partir del cual se obtenía una mayor exactitud en la determinación era el  $C_{24}$ . Por lo tanto, para tratar de conocer el grado de influencia de cada n-alcano en el perfil de hidrocarburos saturados, se calculó el porcentaje de cada n-alcano, tanto de cadena par como impar, a partir de la concentración total ( $C_{24}$ - $C_{36}$ , excepto  $C_{34}$ ). Se hizo esto para todas las especies estudiadas (Anexo VIII), pero sólo se incluyen seis (Cuadro 10), que ayudan a esquematizar el fenómeno que a continuación se describe.

Puede observarse que en aquellas especies con un contenido menor a 210 mg/kg de MS (por ejemplo orchard y guaje, gramínea y leguminosa, respectivamente), los diferentes n-alcanos contribuyeron más o menos de manera equitativa a la concentración total. En el pasto orchard los n-alcanos más abundantes,  $C_{31}$ ,  $C_{33}$  y  $C_{29}$ , en orden decreciente, solo contribuyeron con 18.6%, 17.7% y 10.9%, respectivamente, (menos del 50%) a la concentración total. En el guaje, los dos n-alcanos más abundantes,  $C_{29}$  y  $C_{27}$ , contribuyeron en menos del 45% a la concentración total de n-alcanos (Cuadro 10). De esta misma forma se comportaron los pastos búfalo y llanero y la leguminosa trébol blanco (Cuadro B, Anexo VIII).

Por otro lado, en las especies con mayor concentración total de n-alcanos, como el ryegrass perenne (475 mg/kg de MS) y el mezquite (678 mg/kg de MS), la influencia de los n-alcanos más abundantes fue elevada. Por ejemplo, en el caso de ryegrass perenne, el 75% de la concentración total se debió a la contribución de  $C_{31}$ ,  $C_{33}$  y  $C_{29}$ , los n-alcanos más abundantes; mientras que en el mezquite, el 68% de la concentración total se debió a un solo n-alcano ( $C_{29}$ ). Los forrajes que siguieron el mismo patrón fueron: huizache, kikuyo, alfalfa, estrella Santo Domingo, húmedicola, antena, cacahuete forrajero, buffel, estrella africana y huamúchil (Cuadro B, Anexo VIII).

Sin embargo, hubo algunas excepciones a este hallazgo. En el caso del forraje banderita, con una concentración total menor a 140 mg/kg de MS, los dos n-alcenos más abundantes ( $C_{31}$  y  $C_{29}$ ) contribuyeron en 60% a la concentración total, mientras que en el pasto pata de pájaro, con una concentración total de más de 400 mg/kg de MS, la contribución de los tres n-alcenos más abundantes no llegó al 60%.

Cuadro 10. Porcentaje de aporte de cada n-alceno a la concentración total de hidrocarburos ( $C_{24}$ - $C_{36}$ ) y la concentración total del perfil.

n-Alcano	Banderita	Guaje	Orchard	Pata de pájaro	Ryegrass perenne	Mezquite
$C_{24}$	0.7	1.3	6.2	3.4	1.3	0.4
$C_{25}$	2.8	4.6	10.5	6.5	2.2	2.4
$C_{26}$	2.1	7.3	6.4	3.8	2.0	1.6
$C_{27}$	5.1	20.4	9.1	11.2	5.1	13.8
$C_{28}$	4.8	11.7	4.8	3.9	2.8	7.4
$C_{29}$	20.7	23.4	10.9	16.9	17.4	67.8
$C_{30}$	7.8	3.4	3.9	4.1	3.5	1.1
$C_{31}$	38.6	14.5	18.5	26.0	32.2	2.4
$C_{32}$	3.9	2.6	3.4	3.2	2.8	0.6
$C_{33}$	7.3	5.9	17.6	14.4	25.2	0.9
$C_{35}$	2.7	2.2	5.8	4.5	4.2	0.5
$C_{36}$	3.1	2.2	2.5	1.6	0.7	0.5
Concentración total del perfil (mg/kg de MS)	135.5	143.6	199.4	452.2	475.1	677.8

Herbin *et al.*<sup>64</sup>, al analizar 36 especies de diferentes familias a las de este estudio, encontraron que en aquellas plantas con alta concentración de n-alcános por superficie foliar, el perfil está casi exclusivamente compuesto por C<sub>33</sub>, C<sub>31</sub> y C<sub>29</sub>, con dominio de C<sub>31</sub> y con muy poco contenido de los otros n-alcános impares. En contraste, las especies con baja concentración de n-alcános tienen un perfil más complejo, incluso involucrando en mayor proporción a los n-alcános pares.

#### **7.1.4 Errores en la medición de n-alcános en los forrajes**

Los Cuadros 5-8, además de mostrar el perfil de n-alcános de cada especie, también indican la variación o error, en términos de desviación estándar, que existió en las determinaciones. De un total de 190 medias calculadas a partir de triplicados por muestra, 23 (14%) presentaron una desviación estándar superior al 20% del valor de la media. De esos 23 valores, 15 (65%) estuvieron en el rango de 20-29% del valor de la media, la mayoría en los forrajes de clima semi-árido; 5 (22%) estuvieron en el rango de 30-39% del valor de la media, principalmente en los forrajes de clima semi-árido; una media presentó una desviación estándar del 41% de su valor (C<sub>27</sub> en estrella de Santo Domingo a las 4 semanas de rebrote, Cuadro 7) y dos medias presentaron desviaciones estándar por arriba del 50% (n-alcáno C<sub>35</sub> a las 4 semanas de rebrote en búfalo y pata de pájaro, Cuadro 5). Las demás desviaciones estándar oscilaron entre 0.1 y 19 % del valor de la media.

De acuerdo a Newman *et al.*<sup>71</sup> el error en la medición de la concentración de n-alcános en las plantas tiene dos fuentes principales. La primera se manifiesta cuando se realiza un muestreo inadecuado del material vegetal. La segunda es el error analítico, es decir, el error en las extracciones.

##### **7.1.4.1 Efecto del sitio de muestreo y manejo de la muestra**

La mayoría de las desviaciones estándar grandes se presentaron en las gramíneas de clima semi-árido, cuyas muestras se obtuvieron de varios puntos en

el sitio de muestreo, en comparación con las especies de los demás climas, que se obtuvieron de un solo punto del sitio de muestreo. Lee *et al.*<sup>69</sup>, estudiando la fuente de variación en la concentración de n-alcanos de la cera cuticular de trébol blanco y ryegrass, observaron que la variación entre muestras de un mismo sitio de muestreo para trébol blanco fue de 50-72% de la variación, mientras en las muestras de ryegrass la variación fue del 39-59%. La variación entre muestras de un mismo sitio de muestreo fue mayor a la variación entre sitios de muestreo (11-34%) y a la variación dentro de muestra (4-38%). Por el contrario, Chen *et al.*<sup>57</sup>, investigando también el efecto de sitio de muestreo (praderas perennes y "degradadas") para *Phalaris aquatica*, *Danthonia spp* y *Trifolium repens* var. Huia, encontraron que no había efecto significativo en la concentración de n-alcanos individuales en estas tres especies por efecto de los diferentes sitios.

Dentro del error en el manejo de la muestra, se encuentra el tamaño de partícula. No todas las plantas se lograron moler de igual tamaño. Se obtuvo un molido más homogéneo, con un tamaño de partícula más pequeño en las leguminosas en comparación con las gramíneas. Algo similar sucedió con las diferentes partes de la planta, siendo más homogénea la partícula para los folíolos u hojas y más heterogénea para los tallos. Vallente *et al.*<sup>72</sup> mencionan que los n-alcanos están estrechamente ligados a la cutina y pectina, que a su vez están íntimamente asociadas a la pared celular de la epidermis, a través de la formación de compuestos metil-ésteres con algunos compuestos fenólicos. Estos autores indican que puede necesitarse una extensa destrucción (molido) de los tejidos vegetales para lograr la extracción efectiva de los n-alcanos. Al trabajar con paja de avena (alto contenido de compuestos fenólicos), Valiente *et al.* realizaron molidos de 1 mm y de 0.75 mm y lograron una mayor extracción de n-alcanos con la partícula más pequeña.

La amplia desviación estándar de algunos n-alcanos puede ser el reflejo del muestreo y del manejo de la muestra, pero una adecuada homogenización debe disminuir el error en la determinación de la concentración de n-alcanos entre

replicas. Si todas las partículas dentro de la muestra se distribuyen de forma homogénea, entonces el tamaño de la partícula no influirá en la cantidad de los n-alcános extraídos. Sin embargo, el tamaño de partícula sí tendrá un mayor efecto cuando se realicen estimaciones de CV y composición botánica de la dieta, ya que en las partículas grandes no se extraerán por completo los n-alcános de las plantas y heces y, por lo tanto, habrá errores en las mediciones.

#### 7.1.4.2 Efecto del proceso de extracción

Asimismo, se han investigado varias posibles fuentes de variación en los resultados de extracción de n-alcános entre repeticiones. Se han revisado: la utilización del sistema Soxhlet para la extracción de los lípidos de las muestras, la utilización de diferentes disolventes (cloroformo, hexano y heptano), la duración de la saponificación, la temperatura del disolvente para la extracción de la fase orgánica (mejores extracciones a altas temperaturas, mínimo a 65° C), la evaporación de la fase orgánica para su posterior purificación y la cantidad de disolvente utilizado en la purificación.<sup>26, 41, 73, 74</sup>

Dentro de estas posibles causas de variación, la que pudo tener consecuencias en la extracción de n-alcános en este estudio fue la temperatura del disolvente para extraer la fase orgánica de la muestra. En el presente trabajo el heptano siempre se usó a temperatura ambiente, pero prácticamente la mitad de las muestras fue procesada inmediatamente después de la saponificación, cuando aún estaban calientes, mientras que la otra mitad se trabajó a temperatura ambiente, debido a que fueron procesadas al día siguiente de la saponificación.

En el aspecto de la variación entre réplicas de la muestra, Vulich *et al.*<sup>73</sup> no encontraron variación alguna, mientras que Lee *et al.*<sup>69</sup> encontraron un rango de variación del 4-38% en la concentración de los n-alcános detectables y la repetibilidad de las mediciones de cada n-alcáno fue de moderada a alta (64-91%).

### 7.1.5 Importancia de la concentración de cada n-alcano en las estimaciones de consumo voluntario y selectividad

Los usos más importantes de los n-alcanos en la investigación animal radican en la posibilidad de utilizarlos para estimar el CV de animales en pastoreo y para determinar la composición botánica de la dieta seleccionada por los animales. Con respecto al primer uso, Casson sugirió que la concentración de los n-alcanos de cadena impar en cada especie analizada debe exceder los 50 mg/kg de MS, aunque esta concentración dependerá de la precisión del análisis en el laboratorio y de la exactitud requerida para la estimación de CV.<sup>63</sup>

Con respecto al segundo uso, Dove<sup>27</sup> hizo mezclas con diferentes forrajes en diferentes cantidades y después estimó la proporción de cada especie mediante la utilización de n-alcanos. En una mezcla formada por las especies *Lolium rigidum*, *Trifolium subterraneum* var. Dinninup y *Phalaris aquatica*, obtuvo subestimaciones para la última especie. El error fue atribuido a que dicha especie presentó bajas concentraciones de hidrocarburos (< 50 mg/kg de MS), pero esta especie fue estimada de forma correcta en otras mezclas, donde estaban involucradas las especies ya mencionadas más *Lolium perenne* o *Medicago sativa*. En otro grupo de mezclas, que involucraba dos leguminosas, se estimó correctamente la cantidad de leguminosas, pero no se pudo distinguir entre ellas, a pesar de tener n-alcanos que sobrepasaban la concentración ya mencionada.

Valiente *et al.*<sup>72</sup> lograron estimar con exactitud el CV y la composición botánica de la dieta con concentraciones de n-alcanos menores a 50 mg/kg de MS, gracias en gran medida a una mejoría en el análisis cromatográfico en la última década. En la determinación de CV utilizaron al C<sub>31</sub>, que se encontraba en concentraciones de 7, 170, 50 y 64 mg/kg de MS en los diferentes componentes de la dieta. Para el análisis de composición botánica de la dieta fueron utilizados los n-alcanos impares de C<sub>25</sub> a C<sub>33</sub> y en un segundo caso incluso utilizaron n-alcanos pares (C<sub>28</sub> y C<sub>30</sub>), de los cuales de 21 datos, 14 no excedían los 50 mg/kg de MS.

De las 190 medias calculadas (Cuadros 5-8) en el presente estudio, 124 (65.2%) no rebasaron la concentración de 50 mg/kg de MS y, por lo tanto, se tiene la posibilidad de tener errores al ser utilizadas en mediciones de CV y composición de la dieta. Sin embargo, de acuerdo con los investigadores citados, aun con mínimas concentraciones se han logrado estimaciones correctas y con concentraciones moderadas a altas se han tenido errores en las mediciones.

## **7.2 Perfil por clima**

Se ha consignado que hay mayor producción de cera en especies que se encuentran en zonas tropicales que en zonas templadas y que las especies xerófitas y suculentas contienen pequeñas cantidades de cera. Esto coincide con lo obtenido en el presente estudio.<sup>60</sup>

Al revisar la concentración del perfil ( $C_{27}$ - $C_{35}$ ) por clima se encontró que las especies de clima tropical húmedo tuvieron mayor concentración de n-alcanos, con un promedio de 450.4 mg/kg de MS, seguidas por las especies de los climas tropical seco, templado y semi-árido, con 364.6, 322.1 y 287.3 mg/kg de MS, respectivamente.

### **7.2.1 Clima semi-árido**

El perfil de n-alcanos de los forrajes de clima semi-árido estuvo en el orden de  $C_{29} > C_{31} = C_{27} > C_{33} > C_{35}$  (Cuadro 11). Este perfil estuvo influido en gran medida por las leguminosas arbóreas (Cuadro 5).

Los pastos pata de pájaro y banderita tuvieron como n-alcano más abundante al  $C_{31}$  y el pasto búfalo, al  $C_{29}$ . Los pastos banderita y búfalo fueron las especies con la menor concentración de n-alcanos en este clima, presentando una concentración media del n-alcano más abundante de 48.1 mg/kg de MS. Pata de pájaro fue la especie con mayor concentración de  $C_{31}$  (promedio = 118 mg/kg de MS) en este clima. Los n-alcanos  $C_{35}$  y  $C_{33}$  se encontraron en escasa cantidad en

todas las especies, a excepción del pasto pata de pájaro, que presentó en promedio 65 mg/kg de MS de C<sub>33</sub> (Cuadro 5).

Cuadro 11. Perfil de n-alcenos (mg/kg MS) en los diferentes climas.

n-Alcano		Semi-árido	Templado	Tropical húmedo	Tropical seco
C <sub>27</sub>	Media	<b>46.18</b>	26.38	9.87	17.70
	D.E	33.32	6.53	5.12	9.51
C <sub>29</sub>	Media	<b>166.19</b>	<b>62.31</b>	24.06	<b>178.66</b>
	D.E	171.13	37.73	7.98	318.5
C <sub>31</sub>	Media	<b>46.60</b>	<b>120.39</b>	<b>79.16</b>	<b>153.83</b>
	D.E	41.38	73.01	23.92	149.43
C <sub>33</sub>	Media	20.44	<b>81.23</b>	<b>167.30</b>	<b>80.78</b>
	D.E	27.00	80.36	58.67	83.30
C <sub>35</sub>	Media	7.91	31.83	<b>84.21</b>	19.43
	D.E	7.29	49.93	79.64	17.58

D.E = Desviación estándar

En condiciones de clima semi-árido no se han realizado estudios específicos de CV y selectividad, por lo tanto no hay referencia alguna sobre qué marcadores utilizar. Con los resultados del presente estudio, se puede decir que el n-alceno más factible para usarse como marcador interno por su alta concentración sería el C<sub>29</sub>, siguiéndole el C<sub>31</sub> o C<sub>27</sub>, y el marcador externo sería el más próximo al n-alceno impar que se decidiera utilizar. El problema que se encuentra con C<sub>29</sub> es la menor recuperación en heces y, por consiguiente, el posible aumento del error en la estimación del CV.

### 7.2.2 Clima templado

En este clima el orden de importancia de los n-alcános fue  $C_{31} > C_{33} > C_{29} > C_{35} > C_{27}$  (Cuadro 11). La concentración de  $C_{31}$  fue elevada en alfalfa, kikuyo y ryegrass perenne. La concentración del n-alcáno  $C_{33}$  fue elevada en ryegrass perenne y kikuyo; del  $C_{29}$ , en alfalfa y ryegrass perenne. El pasto kikuyo presentó la mayor concentración de  $C_{35}$ . El trébol blanco y el orchard fueron las especies con menor concentración de n-alcános en este clima, no rebasando los 50 mg/kg de MS (Cuadro 6).

En el caso de las especies de clima templado se confirma que tanto  $C_{31}$  como  $C_{33}$  son los n-alcános a utilizar como marcadores internos, a excepción de lo que podría suceder con mediciones de CV en praderas de kikuyo. Reeves *et al.*<sup>68</sup> determinaron el CV en vacas lecheras pastoreando kikuyo, utilizando las relaciones de los n-alcános  $C_{33}:C_{32}$  y  $C_{35}:C_{36}$ . Decidieron usar esta última relación porque consideraron que habría una mayor exactitud en la determinación de CV, ya que mientras más grande es la cadena de n-alcános mayor es su recuperación y la diferencia en el porcentaje de recuperación entre el marcador externo y el interno disminuye. Sin embargo, estos autores lograron una mejor estimación de CV utilizando la relación  $C_{33}:C_{32}$ , ya que encontraron un mayor porcentaje de recuperación de  $C_{35}$  que de  $C_{36}$  y que trajo consigo una incorrecta estimación de CV. En la literatura se comenta que la recuperación del marcador interno y del externo es similar cuando el externo posee un carbono menos que el interno.<sup>53</sup> En teoría podría estimarse el CV mediante la relación  $C_{35}:C_{34}$ , pero ésta tendría el inconveniente de que el  $C_{34}$  se utiliza como estándar interno en la extracción de n-alcános. Por lo tanto, si se deseara emplear al  $C_{34}$  como marcador externo, se tendría que escoger otro n-alcáno como estándar interno.

### 7.2.3 Clima tropical húmedo

Los n-alcenos más importantes, en orden de mayor a menor concentración, en los forrajes de clima tropical húmedo fueron  $C_{33} > C_{35} > C_{31} > C_{29}$  y  $C_{27}$  (Cuadro 11). Las especies vegetales de este clima fueron las únicas en presentar a un solo n-alceno ( $C_{33}$ ) como el más abundante. Los n-alcenos  $C_{35}$  y  $C_{31}$  tuvieron una concentración media similar (Cuadro 11), aunque el  $C_{31}$  fue más abundante que el  $C_{35}$  en estrella Santo Domingo, humidícola y cacahuate forrajero, mientras que en antena pasó a tercer término, pero su concentración no fue baja (Cuadro 7).

En todas las gramíneas, la presencia de  $C_{35}$  fue de moderada a alta (Cuadro 7), pero sobresale su concentración en el pasto antena (207.1 mg/kg de MS, en promedio) y su baja presencia en cacahuate forrajero (13.3 mg/kg de MS, en promedio), la única leguminosa de clima tropical húmedo investigada. Debido al efecto de las gramíneas que presentaron una elevada concentración de  $C_{35}$ , éste fue el único clima en el cual el  $C_{35}$  tuvo una concentración media de 84.2 mg/kg de MS.

### 7.2.4 Clima tropical seco

El perfil de n-alcenos de los forrajes de este clima fue el siguiente:  $C_{29} > C_{31} > C_{33} > C_{35} > C_{27}$  (Cuadro 11). La mayor concentración de  $C_{29}$  se debió a la influencia del huamúchil, ya que fue la planta con la mayor concentración de este n-alceno en particular (Cuadro 8).

El  $C_{31}$  fue el segundo n-alceno más abundante, como resultado de sus concentraciones en estrella africana, buffel y, nuevamente, huamúchil. El  $C_{33}$  fue el más abundante en estrella africana y buffel. El pasto llanero presentó menores concentraciones de n-alcenos en comparación con las demás gramíneas de este clima; el n-alceno más abundante en este pasto fue el  $C_{31}$ , que no rebasó los 61 mg/kg de MS (Cuadro 8). Los n-alcenos de mayor abundancia en el guaje fueron

C<sub>27</sub> y C<sub>29</sub>, pero sus concentraciones fueron muy bajas, menor a 35 mg/kg de MS (Cuadro 8).

Laredo *et al.*<sup>62</sup>, teniendo en mente la utilización de los n-alcános C<sub>33</sub> y C<sub>32</sub> para estimar el CV bajo condiciones de clima tropical, determinaron que el C<sub>33</sub> no se encontraba en suficiente concentración en los forrajes analizados y concluyeron que no se podía emplear la técnica del doble n-alcáno (fórmula 5) con este par. Sin embargo, hay que considerar que estos investigadores realizaron mediciones de hojas y tallos por separado y que tomaban como requisito indispensable que se rebasara la cantidad de 50 mg/kg de MS de n-alcáno. Por otro lado, hacen la recomendación de que es posible utilizar en algunas especies los n-alcános C<sub>27</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>35</sub> como marcadores internos, dependiendo de la precisión que se desee en la estimación de CV.

Delgado *et al.*<sup>2</sup>, analizando forrajes de clima tropical, encontraron que los n-alcános C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> y C<sub>33</sub> tenían una concentración promedio arriba de los 90 mg/kg de MS. El C<sub>35</sub> sólo fue importante en algunas especies de pastos, encontrándose en promedio 40 mg/kg de MS.

Los resultados del presente trabajo indicaron que el C<sub>33</sub> se encontró en altas cantidades en los forrajes de clima tropical húmedo y en estrella africana y buffel del clima tropical seco, mientras en el pasto llanero el n-alcáno más abundante fue C<sub>31</sub> y en guaje y huamúchil, fue C<sub>29</sub>. En las gramíneas de clima tropical húmedo el C<sub>35</sub> se halló en abundancia. Por lo tanto, con esta información se puede decir que tanto el n-alcáno C<sub>31</sub> como el C<sub>33</sub> se pueden utilizar como marcadores internos e incluso se puede investigar el funcionamiento del C<sub>35</sub> como marcador interno.

### 7.3 Perfil por familia

En las gramíneas se puede observar que el orden de importancia de los n-alcános fue C<sub>33</sub> > C<sub>31</sub> > C<sub>35</sub> > C<sub>29</sub> > C<sub>27</sub> y en las leguminosa fue C<sub>29</sub> > C<sub>31</sub> > C<sub>27</sub> > C<sub>33</sub> > C<sub>35</sub>

(Cuadro 12). La concentración promedio de  $C_{31}$  fue similar en ambas familias. Por otro lado, las gramíneas presentaron una menor concentración de n-alcenos que las leguminosas (320 vs. 417 mg/kg de MS, respectivamente).

Cuadro 12. Perfil de n-alcenos (mg/kg de MS) por familia.

n-Alcano	Gramíneas		Leguminosas	
	Media	D.E	Media	D.E
$C_{27}$	17.74	12.72	<b>39.70</b>	28.06
$C_{29}$	39.37	21.61	<b>237.08</b>	276.49
$C_{31}$	<b>96.86</b>	51.21	<b>108.34</b>	144.64
$C_{33}$	<b>116.60</b>	84.42	26.05	28.96
$C_{35}$	<b>49.40</b>	59.77	5.69	3.42

D.E = Desviación estándar

En las gramíneas, el n-alceno más abundante fue el  $C_{33}$ , por efecto de los pastos tropicales, siendo principalmente las especies estrella de Santo Domingo, humidícola y estrella africana las que presentaron un perfil similar al promedio de la familia (Cuadros 7 y 8), mientras que en los pastos banderita, pata de pájaro, ryegrass perenne y orchard el  $C_{31}$  fue el n-alceno más abundante (Cuadros 5 y 6). El  $C_{35}$  presentó una alta concentración en los pastos kikuyo, antena, humidícola, estrella Santo Domingo, estrella africana y buffel (Cuadros 6-8).

El  $C_{29}$  fue de importancia en los pastos buffel, pata de pájaro, búfalo, ryegrass perenne y kikuyo, en los cuales rebasó los 40 mg/kg de MS, mientras que el  $C_{27}$  fue de escasa presencia, excepto en el pasto pata de pájaro (Cuadros 5, 6 y 8).

El dominio de  $C_{29}$  en la familia de las leguminosas (Cuadro 12) se debió al efecto de su alta concentración en el huizache, el mezquite, el huamúchil (Cuadros 5 y 8) y, en menor grado, en la alfalfa (Cuadro 6). El  $C_{31}$  fue importante por su alta concentración en huamúchil (401 mg/kg de MS) y en alfalfa, que fue la única leguminosa que presentó al  $C_{31}$  como n-alcano principal. El  $C_{27}$  fue de importancia en las arbóreas de clima semi-árido; el  $C_{33}$  fue el principal n-alcano en el cacahuate forrajero, pero su concentración fue muy baja en las demás leguminosas y la concentración de  $C_{35}$  fue insignificante en toda esta familia. La única leguminosa que presentó un perfil de n-alcanos idéntico al de la familia fue el huamúchil.

Delgado *et al.*<sup>2</sup>, Dove<sup>27</sup>, Dove *et al.*<sup>52</sup> y Chen *et al.*<sup>57</sup> encontraron una marcada diferencia entre familias en las relaciones  $C_{29}:C_{31}$  y  $C_{29}:C_{33}$ , siendo menores en pastos y mucho mayores en las leguminosas, principalmente la relación  $C_{29}:C_{33}$ . Dove<sup>27</sup> incluso sugirió que dichas relaciones se podrían utilizar para estimar la proporción de gramíneas y leguminosas en una mezcla de forrajes. Al calcular las relaciones  $C_{29}:C_{31}$  y  $C_{29}:C_{33}$  con las medias por familia (Cuadro 12), en gramíneas las relaciones fueron de 0.4 y 0.3, respectivamente, mientras que en leguminosas fueron de 2 y 9, respectivamente. Haciendo el cálculo por especie, en el caso de leguminosas se encontraron dos especies que no siguieron este comportamiento, la alfalfa, abundante en  $C_{31}$ , y el cacahuate forrajero, que tuvo mayores concentraciones de los n-alcanos  $C_{33}$  y  $C_{31}$  que de  $C_{29}$ , siendo similar su perfil al de una gramínea.

## 7.4 Análisis estadísticos

### 7.4.1 Análisis de varianza de parcelas divididas

El ANDEVA para determinar diferencias entre rebrotes se muestra en el Cuadro 13. Estadísticamente no se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) para el n-alcano  $C_{31}$  entre las dos edades de crecimiento de la planta ( $96 \pm 81$  y  $102 \pm 108$  mg/kg de

MS para 4 y 6 semanas de rebrote, respectivamente). Por lo tanto, se podrá hacer un solo muestreo de forraje en aquella pradera que tenga una edad de crecimiento entre 4 y 6 semanas, para hacer estimaciones de CV con base a dicho n-alcano. Debe de resaltarse que la concentración del n-alcano  $C_{31}$  de los diferentes forrajes fue muy variada, lo que determinó medias con desviaciones estándar muy altas.

Cuadro 13. Análisis de varianza de parcelas divididas para la concentración del n-alcano  $C_{31}$ .

Fuente de variación	GL	CM	F	P
Familia	1	18814.960	1.72	NS
Clima	3	40997.16	3.76	NS
Error A (familia x clima)	3	10907.4637		
<b>Rebrote</b>	<b>1</b>	<b>1041.3636</b>	<b>0.35</b>	<b>NS</b>
Familia x rebrote	1	432.96253	0.15	NS
Clima x rebrote	3	725.5788	0.24	NS
Familia x clima x rebrote	3	810.7075	0.27	NS
Error experimental	98	2965.8		
Total	113			

CM = cuadrado medio  
NS= no significativo

Una serie de investigadores ha estudiado el efecto de varios factores inherentes a la planta sobre el perfil de n-alcanos. Dove *et al.*<sup>52</sup> sembraron seis especies de forrajes de clima templado en invernadero, realizando el primer muestreo a los 40 días de crecimiento y después a intervalos semanales hasta los 89 días. Encontraron que la edad de corte tuvo efecto significativo en la concentración de  $C_{31}$ , pero este factor contribuyó en menos del 6% a la variación de la concentración de n-alcanos, en comparación con la especie vegetal (85%) y la parte de la planta. Chen *et al.*<sup>57</sup> realizaron muestreos de gramíneas y leguminosas

en febrero y diciembre de 1995 y febrero de 1996 no encontraron efecto significativo de la edad sobre la concentración de  $C_{31}$ .

#### 7.4.2 Matriz de correlación entre los n-alcános

En el Cuadro 14 se presenta la matriz de correlación entre los diferentes n-alcános, obteniéndose correlaciones elevadas entre  $C_{27}$  y  $C_{29}$  (0.79) y  $C_{33}$  y  $C_{35}$  (0.93). El  $C_{31}$  tuvo una correlación intermedia con  $C_{33}$  (0.58). Estas asociaciones se pueden explicar apoyándose en las concentraciones de n-alcános por familia (Cuadro 12). En las leguminosas se observó que los n-alcános de menor longitud ( $C_{27}$  y  $C_{29}$ ) se encontraron en mayor cantidad y los de mayor longitud en menor cantidad ( $C_{33}$  y  $C_{35}$ ); lo contrario sucedió con las gramíneas. En el caso de  $C_{31}$ , este n-alcáno guardó una relación más estrecha con  $C_{33}$  en las gramíneas.

Cuadro 14. Matriz de correlación entre los n-alcános.

n-Alcano	$C_{27}$	$C_{29}$	$C_{31}$	$C_{33}$	$C_{35}$
$C_{27}$	1.000	<b>0.796</b>	-0.159	-0.449	-0.407
$C_{29}$		1.000	0.162	-0.399	-0.465
$C_{31}$			1.000	<b>0.583</b>	0.440
$C_{33}$				1.000	<b>0.931</b>
$C_{35}$					1.000

#### 7.4.3 Componentes principales

La base de datos completa (utilizando los n-alcános impares de  $C_{27}$ - $C_{35}$ ,  $n = 190$ ) se examinó por medio de la técnica de componentes principales. Como había cinco variables numéricas (los cinco n-alcános de mayor concentración), se obtuvieron cinco componentes principales (Cuadro 15).

Cuadro 15. Vectores característicos de los dos primeros componentes principales.

n-Alcano	Primer componente	Segundo componente
C <sub>27</sub>	<b>-0.739</b>	<b>0.497</b>
C <sub>29</sub>	<b>-0.682</b>	<b>0.695</b>
C <sub>31</sub>	0.494	<b>0.739</b>
C <sub>33</sub>	<b>0.913</b>	0.311
C <sub>35</sub>	<b>0.893</b>	0.215
Proporción de la varianza	0.577	0.284

Los dos primeros componentes principales proporcionaron un buen resumen de los datos, explicando 86.1% de la variación en la concentración de todos los n-alcanos. El primer componente principal dio un peso positivo muy elevado a los n-alcanos de mayor longitud (C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub>) y un peso negativo alto también a los n-alcanos de menor longitud en el grupo de variables (C<sub>27</sub> y C<sub>29</sub>). El segundo componente principal tuvo coeficientes elevados para C<sub>31</sub> y C<sub>29</sub> e intermedio para C<sub>27</sub>, todos positivos. En consecuencia, el valor del primer componente será grande en aquellas observaciones que tengan altas concentraciones de C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub> y pequeño si los n-alcanos que abundan son el C<sub>27</sub> o C<sub>29</sub>. Por el contrario, el valor del segundo componente principal será grande en aquellas observaciones en las que abunden los n-alcanos C<sub>31</sub> y C<sub>29</sub>. Es decir, el análisis de componentes principales separó a las observaciones en dos grandes grupos, aquéllas con concentraciones elevadas de los n-alcanos más pesados (C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub>) y aquéllas con concentraciones elevadas de los n-alcanos C<sub>27</sub> a C<sub>31</sub>. Como indicó el análisis de correlación (Cuadro 14), hubo una fuerte asociación entre los n-alcanos de cadena más larga (C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub>,  $r = 0.93$ ) y los n-alcanos de cadena menos larga (C<sub>27</sub> y C<sub>29</sub>,  $r = 0.80$ )

#### 7.4.4 Análisis multivariado discriminante

##### 7.4.4.1 Discriminación entre familias

En el análisis multivariado, se obtuvo una función canónica discriminante para familia, con una correlación canónica de 0.73 (Cuadro 16).

Cuadro 16. Capacidad discriminante de la función canónica para familia.

Función	Valor característico	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulativo	Correlación canónica
1	1.125	<b>100.000</b>	100.000	0.728

Al realizar una correlación entre esa función y cada n-alcano, se obtuvo la capacidad de cada uno de los n-alcanos para poder diferenciar entre familias (Cuadro 17). Puede observarse que  $C_{35}$  y  $C_{33}$  tuvieron la mayor capacidad discriminante entre familias, seguidos por  $C_{29}$  y  $C_{27}$ .

Cuadro 17. Correlación entre los n-alcanos y la función canónica para familia.

n-Alcano	Correlación
$C_{27}$	<b>0.589</b>
$C_{29}$	<b>0.632</b>
$C_{31}$	-0.338
$C_{33}$	<b>-0.752</b>
$C_{35}$	<b>-0.901</b>

Con esta función canónica se realizó una predicción de familia, utilizando los datos originales (transformados), que se muestra en el Cuadro 18. De las 72 extracciones que se realizaron de gramíneas (cada extracción se consideró como independiente, aunque en realidad de cada muestra se hicieron tres extracciones), 62 fueron clasificadas correctamente (86.1%) y 10 se clasificaron como leguminosas (13.9%). Para las leguminosas se llevaron a cabo 42 extracciones, 37 de las cuales se clasificaron de forma correcta (88.1%) y 5 como gramíneas (11.9%). Es decir, que la función canónica encontrada logró clasificar correctamente casi el 90% de las extracciones realizadas como pertenecientes a gramíneas o leguminosas, basándose en el perfil de  $C_{27}-C_{35}$ .

Aquellas extracciones asignadas en la familia a la que no correspondían fueron las siguientes: se identificaron como leguminosas tres extracciones del pasto ryegrass perenne; las tres extracciones del pasto estrella africana de cuatro semanas y una extracción del pasto buffel. Cinco extracciones de la leguminosa cacahuate forrajero fueron identificadas como gramíneas.

Cuadro 18. Predicción de familia utilizando la función canónica encontrada.

Familia	Gramínea	Leguminosa	Total
Predicción			
Gramínea	62	10	72
Leguminosa	5	37	42
Porcentaje			
Gramínea	86.1	13.9	100
Leguminosa	11.9	88.1	100

#### 7.4.4.2 Discriminación entre climas

Se obtuvieron tres funciones canónicas discriminantes para los climas (Cuadro 19). De la capacidad discriminante de las variables, la primera función canónica discriminante explicó el 63% de la variación; la segunda función explicó 30% y la tercera función tuvo una mínima capacidad discriminante.

Cuadro 19. Capacidad discriminante de las funciones canónicas para clima.

Función	Valor característico	Porcentaje varianza	Porcentaje acumulativo	Correlación canónica
1	1.278	62.891	62.891	0.749
2	0.602	29.636	92.527	0.613
3	0.152	7.473	100.000	0.363

La correlación entre las funciones canónicas y los n-alcenos indica la capacidad discriminatoria de cada uno de ellos (Cuadro 20). La primera función se asoció fuerte y positivamente con los n-alcenos C<sub>33</sub> y C<sub>35</sub>, y negativamente con C<sub>29</sub> y C<sub>27</sub>. La segunda función se asoció fuerte y negativamente con C<sub>35</sub> y de manera moderada con C<sub>27</sub> y C<sub>31</sub>. La tercera función se asoció moderada y negativamente con C<sub>31</sub>.

Cuadro 20. Correlación entre las funciones canónicas y los n-alcenos.

n-Alcano	Función 1	Función 2	Función 3
C <sub>27</sub>	<b>-0.690</b>	<b>0.459</b>	0.438
C <sub>29</sub>	<b>-0.705</b>	0.299	-0.066
C <sub>31</sub>	0.454	<b>0.459</b>	<b>-0.550</b>
C <sub>33</sub>	<b>0.889</b>	-0.050	0.065
C <sub>35</sub>	<b>0.793</b>	<b>-0.751</b>	0.000

Con estas funciones canónicas se realizó la predicción de clima, tomando la información del perfil de n-alcenos de cada especie. En el Cuadro 21 se muestra que para los forrajes de clima semi-árido, de las 30 extracciones realizadas, 17 (56.7%) fueron clasificadas correctamente, 7 (23.3%) se clasificaron como forrajes de clima tropical seco y 6 (20%) como de clima templado. Para los forrajes de clima templado se hicieron 30 extracciones, 26 (86.7%) de las cuales fueron clasificadas correctamente, 2 (6.7%) como forrajes de clima semi-árido y 2 (6.7%) como de tropical seco. Para los forrajes de clima tropical húmedo se realizaron 24 extracciones, 22 (91.7%) se clasificaron correctamente y 2 (8.3%) como forrajes de clima templado. Se llevaron a cabo 30 extracciones para los forrajes de clima tropical seco, de las cuales 11 (36.7%) fueron clasificadas como pertenecientes a ese clima, 4 (13.3%) como forrajes de clima semi-árido, 3 (10%) como de clima templado y 12 (40%) como de clima tropical húmedo.

Cuadro 21. Predicción de cada especie dentro de su clima de muestreo.

Clima	Semi-árido	Templado	Tropical húmedo	Tropical seco	Total
Predicción					
Semi-árido	<b>17</b>	6	0	7	<b>30</b>
Templado	2	<b>26</b>	0	2	<b>30</b>
Tropical húmedo	0	2	<b>22</b>	0	<b>24</b>
Tropical seco	4	3	12	<b>11</b>	<b>30</b>
Porcentaje					
Semi-árido	<b>56.7</b>	20.0	0.0	23.3	100
Templado	6.7	<b>86.7</b>	0.0	6.7	100
Tropical húmedo	0.0	8.3	<b>91.7</b>	0.0	100
Tropical seco	13.3	10.0	40.0	<b>36.7</b>	100

Por lo tanto, las especies que se clasificaron con mayor certeza fueron las de clima tropical húmedo, seguidas de las de clima templado y semi-árido. La predicción fue mala para los forrajes de clima tropical seco, muchos de los cuales se clasificaron como forrajes de clima tropical húmedo. El elevado porcentaje de predicción que presentaron las especies de clima tropical húmedo se puede atribuir al n-alcano C<sub>35</sub>. En el Cuadro 22 se muestran las extracciones que se clasificaron en un clima al cual no pertenecieron. Los forrajes en el Cuadro 22 tuvieron un perfil de n-alcanos que no correspondía al promedio del clima de muestreo. Sin embargo, los perfiles de los forrajes pata de pájaro, banderita, estrella africana y guaje francamente presentaban más semejanza con el perfil del clima identificado incorrectamente que con el perfil de su propio clima.

Cuadro 22. Especies forrajeras clasificadas incorrectamente en otro clima al del muestreo de acuerdo con las funciones canónicas

Clima/Especie	Rebrote (semanas)	Número de extracciones	Predicción de clima
<b>Semi-árido</b>			
Pata de pájaro	4	3	Templado
	6	3	
Banderita	4	3	Tropical seco
	6	3	
Búfalo	4	1	Tropical seco
<b>Templado</b>			
Ryegrass perenne	6	1	Tropical seco
Trébol blanco	4	2	Semi-árido
Alfalfa	6	1	Tropical seco
<b>Tropical húmedo</b>			
Estrella Santo Domingo	4	1	Templado
	6	1	
<b>Tropical seco</b>			
Llanero	6	1	Semi-árido
Buffel	4	1	Tropical húmedo
	6	1	
Estrella africana	4	3	Tropical húmedo
	6	3	
Guaje	4	3	Semi-árido
	6	3	

#### 7.4.4.3 Discriminación entre especies

Para detectar la capacidad que tienen los n-alcanos de discriminar entre las 19 especies muestreadas, se realizó un análisis discriminante de los cinco n-alcanos que componen el perfil, obteniéndose cinco funciones canónicas (Cuadro 23). Todas resultaron significativas ( $P = 0.0000$ ), por lo tanto todas tuvieron la capacidad de separar entre especies. Las dos primeras funciones explicaron el 82.5% de la variación entre especies; las demás funciones canónicas, aunque significativas, no fueron importantes.

Cuadro 23. Capacidad discriminante de las funciones canónicas para especie.

Función canónica	Valor característico	Porcentaje de varianza	Acumulativo	Correlación canónica
1	59.973	49.2	49.2	0.992
2	40.531	33.3	82.5	0.988
3	11.889	9.8	92.2	0.960
4	8.027	6.6	98.2	0.943
5	1.468	1.2	100.0	0.771

Como se hizo en el caso de clima y familia, una forma de evaluar estos resultados fue reutilizar las observaciones con fines predictivos, para clasificarlas en alguna especie y, de esta forma, determinar qué porcentaje se clasificaba de forma correcta. Al realizar esto, de las 114 extracciones, sólo 3 fueron clasificadas de forma errónea. El 97.4% de las extracciones se clasificaron correctamente en su especie, semejante a lo obtenido por Chen *et al.*<sup>57</sup> (97.1, 98.3 y 100%) para especies de clima templado y con un perfil de seis n-alcanos impares ( $C_{25}$ - $C_{35}$ ).

Esto implica que el perfil de n-alcenos de cada forraje es particular para cada uno de ellos, convirtiendo a los n-alcenos en un factor de clasificación taxonómica. La capacidad de predicción fue mejor por especie que por familia o clima.

## 8. Conclusiones

- No hubo diferencia en la concentración del n-alcano  $C_{31}$  a las 4 y 6 semanas de rebrote en los diferentes forrajes durante la época de lluvias, por lo tanto, se puede realizar un solo muestreo de forraje durante dicho período en el mismo lugar, para realizar estimaciones de CV con base en el  $C_{31}$ .
- El perfil de n-alcanos fue diferente entre gramíneas y leguminosas. Las leguminosas presentaron altas concentraciones de los n-alcanos  $C_{27}$ ,  $C_{29}$  y  $C_{31}$  y las gramíneas de  $C_{31}$ ,  $C_{33}$  y  $C_{35}$ .
- Los n-alcanos más abundantes en las especies forrajeras de clima semi-árido fueron  $C_{27}$ ,  $C_{29}$  y  $C_{31}$ , en las de clima templado y tropical seco fueron  $C_{29}$ ,  $C_{31}$  y  $C_{33}$  y para las de tropical húmedo fueron  $C_{31}$ ,  $C_{33}$  y  $C_{35}$ .
- En todos los climas estudiados se puede utilizar al n-alcano  $C_{31}$  como marcador interno en estimaciones de CV. Si se desea una mayor concentración y recuperación del n-alcano en heces, se puede utilizar el  $C_{33}$  en condiciones templadas y tropicales y al  $C_{35}$  en el clima tropical, principalmente tropical húmedo. Para el caso de las especies de clima semi-árido se puede utilizar el  $C_{29}$ , tomando en cuenta la posibilidad de errores en las estimaciones con este n-alcano
- El perfil de n-alcanos permitió agrupar a los forrajes de acuerdo a clima de muestreo, obteniéndose mayor precisión en las especies de clima templado y tropical húmedo, una precisión moderada en las especies de clima semi-árido y una precisión baja en las especies de clima tropical seco.
- La concentración y contribución de cada n-alcano en el perfil de cada especie es diferente, dando un perfil característico a cada forraje en la época de lluvias en los diferentes climas.
- El perfil tiene una alta capacidad para discriminar entre las especies en la época de lluvias y, por lo tanto, es factible el uso de n-alcanos como marcadores para hacer estimaciones cualitativas y cuantitativas de la composición botánica del alimento seleccionado por herbívoros en pastoreo en dicha época.

## 9. Recomendaciones

- Tomar en cuenta los siguientes factores que tienen efecto en la obtención total de n-alcenos: 1) el tamaño de partícula; 2) la homogeneidad de la muestra y 3) la temperatura del disolvente para la extracción de la fase orgánica. Estos factores pueden afectar la repetibilidad de los resultados y/o las mediciones de consumo.
- Usar muestras más pequeñas para la extracción de n-alcenos y posiblemente disminuir los pasos en el procesamiento, para disminuir la cantidad de material y reactivos utilizados. Revisar también la reutilización del disolvente para disminuir los costos y el tiempo de procesamiento de cada muestra.
- El objetivo último de la metodología de los n-alcenos es poder realizar estimaciones de CV y de la composición botánica de la dieta de los animales en pastoreo. Para poder lograr esto con éxito es necesario tener un conocimiento previo de los n-alcenos y sus concentraciones en un área determinada de estudio, para lo cual es requerido realizar una delimitación precisa de las superficies de estudio, que sea lo más representativo posible de lo que se desee investigar.

## 10. Literatura citada

1. Laca EA, Demmont MW. Foraging Strategies of Grazing Animals. In: Hodgson J, Illius AW, editors. The ecology and management of grazing systems. Oxon: CABI, 1998:137-158.
2. Delgado DC, Olivera MC, Navarro A. Composición de n-alcanos cuticulares en plantas tropicales. Su potencialidad como marcadores para estimar consumo y selectividad en rumiantes en pastizales. Rev Cubana Cienc Agríc 2000; 34: 151-156.
3. Givens DI, Owers E, Axford RF, Omed HM, Editors. Forage evaluation in ruminant nutrition. London: CABI, 2000.
4. Forbes JM. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. Oxon: CABI, 1995.
5. Marais JP. Use of Markers. In: D'Mello JP, editor. Farm animal metabolism and nutrition. New York: CABI, 2000: 255-277.
6. Mayes RW, Dove H. Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores. Nutr Res Reviews 2000; 13: 107-138.
7. Chen W, Scott J, Blair G, Lefroy R, Hutchinson K, King K, *et al.* Diet selection and productivity of sheep grazing contrasting pastures. Aust J Agric Res 2002; 53: 529-539.
8. Gutiérrez JL. Nutrición de rumiantes en pastoreo. Chihuahua: Universidad Autónoma de Chihuahua, 1991.
9. Burns JC, Pond KR, Fisher DS. Measurement forage intake. In: Fahey GC, editor. Forage Quality, Evaluation and Utilization. Wisconsin: ASA, CSSA, SSSA, 1994: 492-532.
10. Minson DJ. Forage in ruminant nutrition. California: Academic Press, 1990.
11. Programa de Fomento Agrícola, Fomento Ganadero, Sanidad Agropecuaria y Transferencia de Tecnología. Evaluación de la alianza para el campo 2000. FAO-SAGARPA, 2000.  
Disponible en: <http://www.evalalianza.org.mx/eval2000/Programas%5CN19.pdf>

12. Hughes HD, Heath ME, Metcalfe DS. Forrajes. La ciencia de la agricultura basada en la producción de pastos. México: Continental, 1980.
13. Flores JA. Bromatología. México (DF): Limusa, 1977.
14. Howard-Duclos B. Las plantas forrajeras tropicales. Barcelona: Blume, 1968.
15. Rzedowsky J. Vegetación de México. México (DF): Limusa, 1994.
16. Skerman PJ, Rivero F. Gramíneas tropicales. Roma: FAO, 1992.
17. Skerman P. Leguminosas forrajeras tropicales. Roma: FAO, 1991.
18. Comisión Nacional de Ecología. Informe de la situación general en materia de Equilibrio Ecológico y Protección del Ambiente, 1989-1990. México (DF): Comisión Nacional de Ecología, 1992.
19. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario Estadístico Estados Unidos Mexicanos. Aguascalientes: INEGI, 2003.
20. Sánchez V, Castillejos M, Rojas L. Poblaciones, recursos y medio ambiente en México. México (DF): Fundación Universo Veintiuno, AC, 1989.
21. Morales C. Características de los principales zacates forrajeros de zonas áridas. Chihuahua: CIRNOC-INIFAP, 1994.
22. Mannetje L, Jones R. Plant resources of South-East Asia 4, forages. Prosa: Wageningen, 1992.
23. Gould FW. Common Texas Grasses. An illustrated guide. Texas: Texas A and M University Press, 1978.
24. Bejar M, Valderrábano A, González P. El cultivo de alfalfa en el sur del estado de Chihuahua. Chihuahua: CIRENA, 2000.
25. Niembro A. Árboles y arbustos útiles en México. Naturales o introducidos. México: Limusa, 1990.
26. 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.
27. Dove H. Using the n-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixture. Aust J Agric Res 1992; 43: 1711-1724.

28. Van Soest PJ: Nutrition ecology of the ruminants: Ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forage and plant fiber. New York: Cornell University Press, 1982.
29. Cheeke PR. Applied animal nutrition. Feeds and feeding. New Cork: Mcmillan Publishing Company, 1991.
30. Dove H, Mayes RW. Plant wax components: A new approach to estimate intake and diet composition in herbivores. *J Nutr* 1996; 126: 13-26.
31. García SC, Holmes CW, Hodgson J, Macdonald A. The combination of the n-alkanes and  $^{13}\text{C}$  techniques to estimate individual dry matter intake of herbage and maize silage by grazing dairy cows. *J Agric Sci, Camb* 2000; 135: 47-55.
32. Dove H, Mayes RW. Satellite Meeting: Wild and domestic herbivore diet characterization. 17-19 October 2003. VI International Symposium on the Nutrition of Herbivores 20-24 October 2003; Mérida (Yucatan) México.
33. Vollhard KP, Schore NE. Química Orgánica. 2a. ed. Barcelona: Omena, 1996.
34. Carey F. Organic Chemistry. 5th. ed. New York: McGraw-Hill, 2003.
35. Holum JR. Principios de fisicoquímica, química orgánica y bioquímica. Introducción a las bases moleculares de la vida. México: Limusa, 1986.
36. Fatar S, Rappoport Z. The chemistry of alkanes and cicloalkanes. New York: John Wiley and sons, 1992.
37. Kolattukudy RE. Chemistry and biochemistry of nature waxes. Amsterdam: Elsewer, 1976.
38. Mauseth JD. Plant Anatomy. California: The Benjamin Cumming Publishing Company, 1988.
39. Butter GW, Bailey RW. Chemistry and biochemistry of herbage. Vol. 1. London: Academic Press, 1973.
40. Mayes RW, Lamb CS, Colgrove PM. The use of dose and herbage n-alkanes as markers for determination of herbage intake. *J Agric Sci, Camb* 1986; 107: 161-170.
41. Vulich SA, O'Riordan EG, Hanrahan JP. Use of n-alkanes for the estimation of herbage intake in sheep: accuracy and precision of the estimation. *J Agric Sci, Camb* 1991; 116: 319-323.

42. Solomon G, Fryhle C. *Organic Chemistry*. 7th, ed. New York: John Wiley and Sons, 2000.
43. Fox MA, Whittaker JK. *Organic Chemistry*. 2nd. ed. Massachusetts: Jones and Bartlett Publisher, 1992.
44. Pérez C. *Econometría y análisis estadístico multivariable con Statgrafics, Técnicas avanzadas*. Madrid: RA-MA, 1996.
45. Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. *Multivariate data analysis*. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1995.
46. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. *Anuario Estadístico Querétaro de Arteaga*. Aguascalientes: INEGI, 2002.
47. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. *Anuario Estadístico México*. Aguascalientes: INEGI, 2002.
48. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. *Anuario Estadístico Veracruz-Llave, Tomo I*. Aguascalientes: INEGI, 2002.
49. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. *Anuario Estadístico Morelos*. Aguascalientes: INEGI, 2002.
50. JMP. SAS Institute, Inc. 1988-1996.
51. SPSS version 8.0 for Windows.
52. Dove H, Mayes RW, Freer M. Effects of species, plant part, and plant age on the n-alkanes concentration in the cuticular wax of pasture plants. *Aust J Agric Res* 1996; 47: 1333-1347.
53. Dove H, Freer M, Foot JZ. The nutrition of grazing ewes during pregnancy and lactation: a comparison of alkanes-based and chromium/in vitro-based estimates of herbage intake. *Aust J Agric Res* 2000; 51: 765-777.
54. Malossini F, Piasentier E, Bovolente S. n-Alkane content of some forages, *J Sci Food Agric* 1990; 53: 405-409.
55. Piasentier E, Bovolente S, Malossini F, Susmel P. Comparison of n-alkanes or chromium oxide methods for estimation of herbage intake by sheep. *Small Ruminant Res* 1995; 18: 27-32.
56. Shelvey JD, Koziol JM. Seasonal and SO<sub>2</sub> – induced change in epicuticular wax of rye grass. *Phytochemistry* 1986; 25: 415-426.

57. Chen W, Lefroy RD, Scott JM, Blair GJ. Field variations in alkane signature among plant species in "degraded" and perennial pastures on the Northern Tablelands of the New South Wales. *Aust J Agric Res* 1998; 49: 263-268.
58. Smith DG, Mayes RW, Raats JG. Effect of species, plant part, and season of harvest on n-alkane concentration in the cuticular wax of common rangeland grasses from southern Africa. *Aust J Agric Res* 2001; 52: 875-882.
59. Wilkinson RE, Kosperbauer MJ. Effect of light and temperature on epicuticular fatty acid and fatty alcohol of tobacco. *Phytochemistry* 1980; 19: 1379-1383.
60. Martin JY, Juniper BE. *The cuticle of plants*. Edinburgh: Rand R, 1970.
61. Englinton G, Gonzalez AG, Hamilton RJ, Raphael RA. Hydrocarbons constituents of the wax coatings of plants leaves: a taxonomic survey. *Phytochemistry* 1962; 1: 89-102.
62. Dyson WG, Herbin GA. Leaf wax alkanes as a taxonomic discriminant for cypresses grown in Kenya. *Phytochemistry* 1968; 7: 1339-1344.
63. Laredo MA, Simpson GD, Minson DJ, Orpin CG. The potential for using n-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter by grazing ruminants. *J Agric Sci, Camb* 1991; 117: 355-361.
64. Herbin GA, Robins PA. Pattern of variation and development in leaf wax alkanes, *Phytochemistry* 1969; 8: 1985-1998.
65. Jones HG. *Plants and microclimate: A quantitative approach o environmental plant physiology*. 2nd. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
66. Prasad MN. *Plant Ecophysiology*. New York: John Wiley and Sons, 1999.
67. Hameleers A, Mayes RW. The use of n-alkanes to estimate herbage intake and diet composition by dairy cows offered a perennial rye grass/white clover mixture. *Grass and forage Sci* 1998; 53: 164-169.
68. 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 Experimental Agric* 1996; 36: 23-30.
69. Lee GC, Nolan JV. Sources of variation in n-alkane concentrations in the cuticular wax of two species of pasture plants. *Aust J Agric Res* 2003; 54: 21-26.

70. Gedir JV, Hudson RJ. Seasonal intake determination in reproductive wapiti hinds (*Cervus elaphus canadensis*) using n-alkanes markers. *Can J Anim Sci* 2000; 80: 137-144.
71. Newman JA, Cribari-Neto F, Jensen MJ. The sensitivity of n-alkane to measurement error: implications for use in the study of diet composition. *J Agric Sci, Camb* 1988; 131: 465-476.
72. Valiente OL, Delgado P, De Vega A, Guada JA. Validation of the n-alkane technique to estimate intake, digestibility, and diet composition in sheep consuming mixed grain; roughage diet. *Aust J Agric Res* 2003; 54: 693-702.
73. Vulich SA, Narran JP, Crowley BA. Modification of the analytical procedures for the determination of herbage and faecal n.alakanes used in the estimation of herbage intake. *J Agric Sci, Camb* 1995; 124: 71-77.
74. Oliván M, Osoro K. Effect of temperature on alkane extraction from faeces and herbage. *J Agric Sci, Camb* 1999; 132: 305-312.

## **11. ANEXO**

### **I. Preparación del estándar interno**

Se pesan 7.2 mg de  $C_{34}$  (Fluka Chemic, 97%) y se colocan en un matraz volumétrico de 50 ml y se afora con heptano, quedando a una concentración de  $3 \times 10^{-4}$  M.

### **II. Preparación de la solución hidroalcohólica de KOH etanólico**

Se pesan 57 g de KOH (lentejas J.T. Baker, 98%), se colocan en un matraz de bola de 1 L y se le adicionan 500 ml de agua purificada y 500 ml de alcohol etílico, quedando la solución a una concentración 1 M.

### **III. Preparación de la columna de gel de sílica**

En la punta de una jeringa de plástico de 10 ml se pone un tapón de algodón de 0.5 cm de grosor; después se colocan  $7 \text{ cm}^3$  de cama de gel de sílica (60-200 mallas, J. T.Baker) y se humedece totalmente con heptano.

#### IV. Método de extracción de n-alcános

##### 1. Material y reactivos

###### Material

- Pipeta volumétrica clase A de 1 ml
- Matraz de ebullición de 250 ml con junta esmerilada 24/40
- Rotavapor
- Baño de agua
- Probeta de 10 ml
- Soporte universal
- Condensador Liebig 309 mm
- Pipeta Pasteur de 9"
- Bulbo de hule ámbar
- Matraz de ebullición de 50 ml con junta esmerilada de 24/40
- Jeringa de 10 ml
- Micropipeta con capacidad de 50-1000  $\mu$ l
- Punta de pipeta de 50-1000  $\mu$ l
- Vial de borosilicato de 2 ml con tapa

###### Reactivos

- Heptano (C<sub>7</sub>) (J. T. Baker, 99.5%)
- Estándar interno (C<sub>34</sub>). Anexo I
- Solución hidroalcohólica de KOH etanólico. Anexo II
- Columna de gel de sílica. Anexo III

## **2. Método de extracción**

### **2.1 Saponificación**

Para llevar a cabo la saponificación, se toma un matraz de ebullición de 250 ml, donde se deposita 1 g de materia seca de la muestra, 1 ml de estándar interno (C<sub>34</sub>) y 10 ml de la solución hidroalcohólica de KOH etanólico. El matraz se coloca en un baño de agua a 90° C, junto con un sistema condensador. La saponificación se realiza con el propósito de remover ácidos grasos y tiene una duración de tres horas y media.

### **2.2 Obtención de la fase orgánica**

A la muestra una vez saponificada se le vierten 10 ml de heptano y se agita vigorosamente, para después dejar que se separen la fase acuosa y la orgánica, siendo esta última la que queda en la superficie y que es obtenida con una pipeta Pasteur y colocada en un matraz de ebullición de 50 ml. Este proceso de lavado se realiza tres veces.

El matraz con los 30 ml de fase orgánica se coloca en un rotavapor y se sumerge en baño de agua a 90° C, para realizar la destilación y que la muestra quede con la mínima cantidad de heptano.

### **2.3 Purificación**

El residuo en el matraz se coloca en una columna de gel de sílica y se eluye con 20 ml de heptano. En esta parte se separan básicamente pigmentos y alcoholes de cadena larga de los n-alcános.

El extracto purificado se recibe en un matraz de 50 ml y se destila hasta su concentración; el residuo se pasa con una micropipeta a un vial de 2 ml, se deja secar al ambiente y se tapa.

## **V. Inyección**

Para la inyección de la muestra, ésta se diluye en 300  $\mu$ l de heptano y se inyectan de 1 a 2  $\mu$ l en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Serie II 5890, equipado con una columna capilar HP5 (95 % dimetil polisiloxano, 5 % difenil) de 30 m de largo, 0.32 mm de diámetro y 0.25  $\mu$ m de fase estacionaria y con un detector de ionización de flama (aire comprimido extra seco – INFRA; hidrógeno cromatográfico pureza 99.998% - INFRA). La temperatura del inyector y del detector debe ser de 250°C. La rampa de temperatura de la columna es la siguiente: 250° C por 3 min; 10° C/min hasta 300° C; 8 min a 300° C. Se usa nitrógeno (cromatográfico, pureza 99.998% - INFRA) como gas acarreador a un flujo de 10 psi.

## **VI. Cromatogramas de las extracciones**

Se obtuvieron tres cromatogramas por especie a las 4 y 6 semanas de muestreo, obteniéndose en total 114 gráficos. A continuación se presenta un cromatograma de una especie de cada uno de los climas en los que se realizaron los muestreos. En ellos se encuentran identificados el estándar interno (C<sub>34</sub>) y los n-alcenos de mayor abundancia.

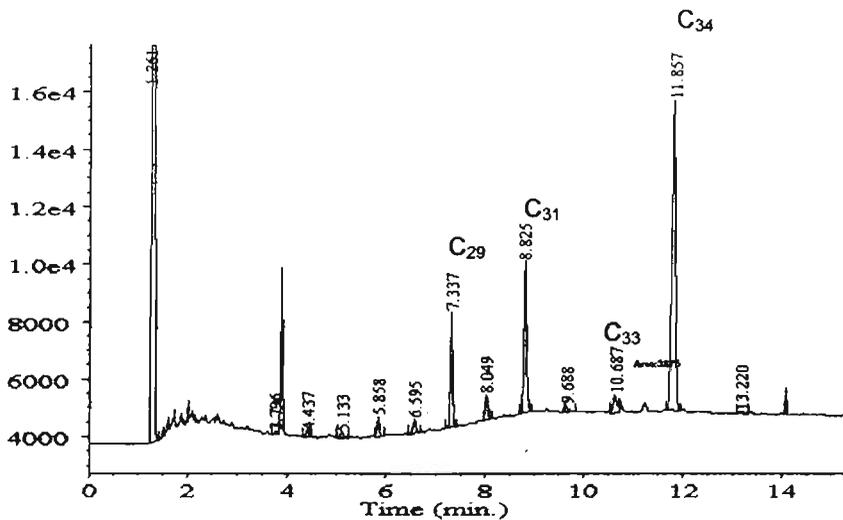


Figura A. Cromatograma del pasto banderita a las 4 semanas, clima semi-árido.

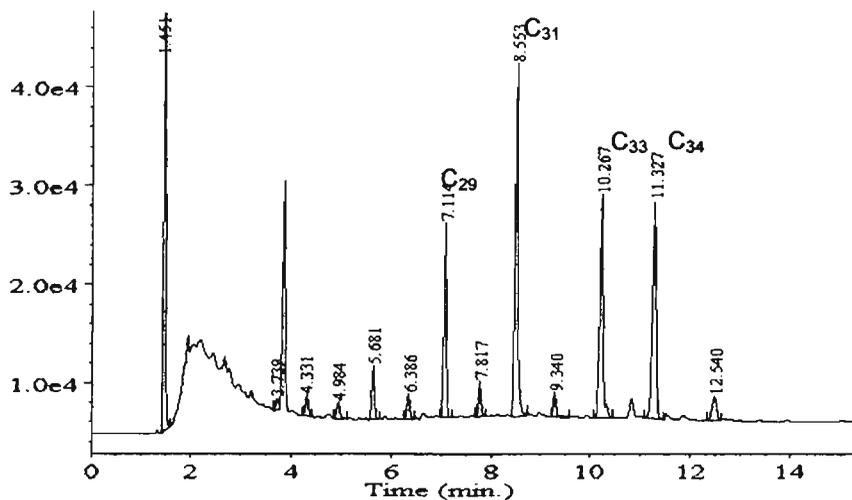


Figura B. Cromatograma del pasto ryegrass perenne a las 6 semanas, clima templado

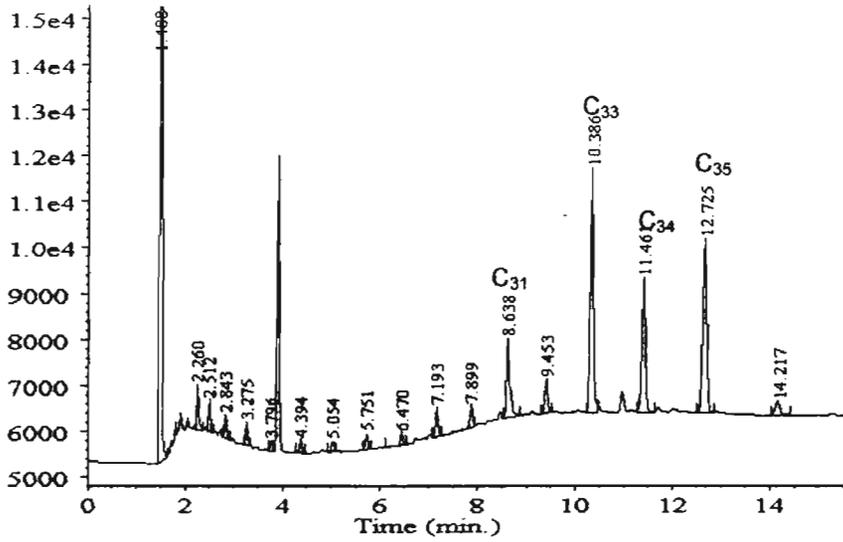
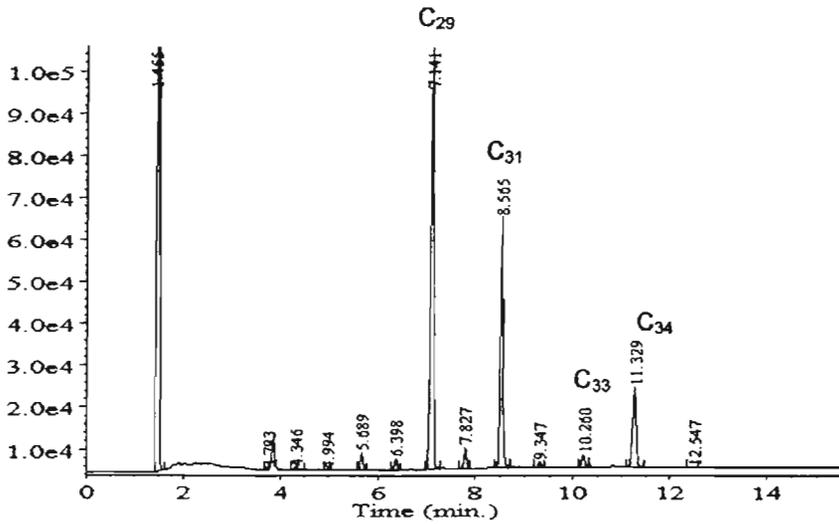


Figura C. Cromatograma del pasto antena a las 4 semanas, clima tropical húmedo.



Figurara D. Cromatograma de la leguminosa huamúchil a las 4 semanas, clima tropical seco.

## VII. Preparación de la curva de calibración de los estándares de n-alcenos

De acuerdo con la concentración de moles (Cuadro A), se pesan del eicosano (C<sub>20</sub>) al hexatriacontano (C<sub>36</sub>), excepto el C<sub>34</sub>, se colocan en un matraz volumétrico de 10 ml y se afora con heptano, quedando una solución madre de estándares a una concentración de  $5 \times 10^{-3}$ .

Cuadro A. Cantidad de n-alcenos (g) para la solución madre de estándares.

n-Alcano	Peso (g)	Pureza (%)	Laboratorio
C <sub>20</sub>	0.0141	99.0	Analytical Standards Stockroom
C <sub>21</sub>	0.0148	99.5	Analytical Standards Stockroom
C <sub>22</sub>	0.0155	99.5	Analytical Standards Stockroom
C <sub>23</sub>	0.0162	99.0	Analytical Standards Stockroom
C <sub>24</sub>	0.0169	99.0	Analytical Standards Stockroom
C <sub>25</sub>	0.0176	99.0	Analytical Standards Stockroom
C <sub>26</sub>	0.0183	99.0	Analytical Standards Stockroom
C <sub>27</sub>	0.0190	99.0	Aldrich Chem
C <sub>28</sub>	0.0197	99.5	Analytical Standards Stockroom
C <sub>29</sub>	0.0204	99.0	Aldrich Chem
C <sub>30</sub>	0.0211	99.4	Analytical Standards Stockroom
C <sub>31</sub>	0.0218	99.5	Fluka Chemic
C <sub>32</sub>	0.0225	99.0	Analytical Standards Stockroom
C <sub>33</sub>	0.0232	97.0	Fluka Chemic
C <sub>35</sub>	0.0246	99.5	Fluka Chemic
C <sub>36</sub>	0.0253	99.1	Analytical Standards Stockroom

Se elabora un estándar interno para la curva de calibración, pesando 0.0478 g de C<sub>34</sub>, se coloca en un matraz volumétrico de 10 ml y se afora con heptano, quedando a una concentración de  $1 \times 10^{-2}$  M.

Para realizar la curva de calibración se toman de la solución madre de estándares las cantidades de 0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 2.5 y 4.5 ml, que se colocan en matraces volumétricos de 5 ml. A cada matraz se le agregan 0.5 ml del estándar interno y se aforan con heptano. Se obtiene una curva de estándares a seis diferentes concentraciones, siendo éstas  $2.5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $2.5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$  y  $4.5 \times 10^{-3}$  M, respectivamente, y el estándar interno se encuentra a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M en todos los matraces.

Esta curva de calibración se inyectó al principio, durante y al final de las inyecciones de las muestras procesadas, obteniéndose al final seis inyecciones de cada concentración. Las figuras E y F muestran los cromatogramas de la dilución menor y mayor de dicha curva, respectivamente.

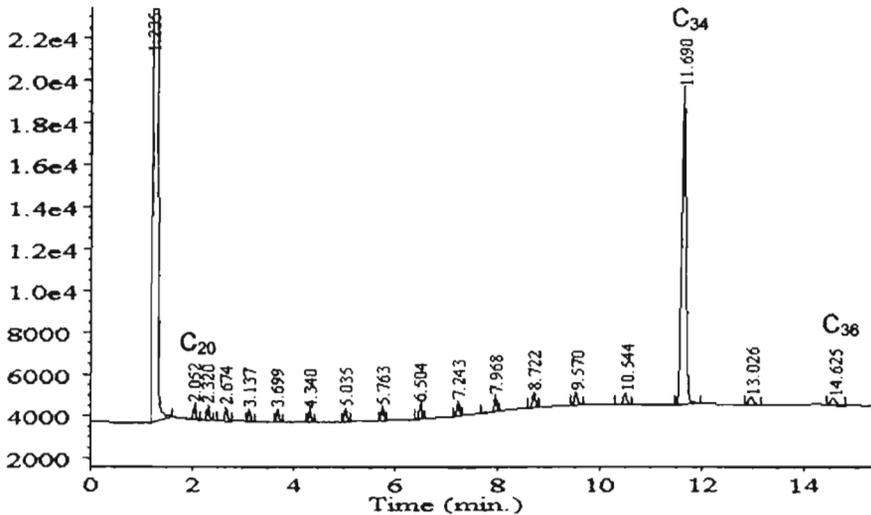


Figura E. Cromatograma de la curva de calibración, dilución  $2.5 \times 10^{-5}$ .

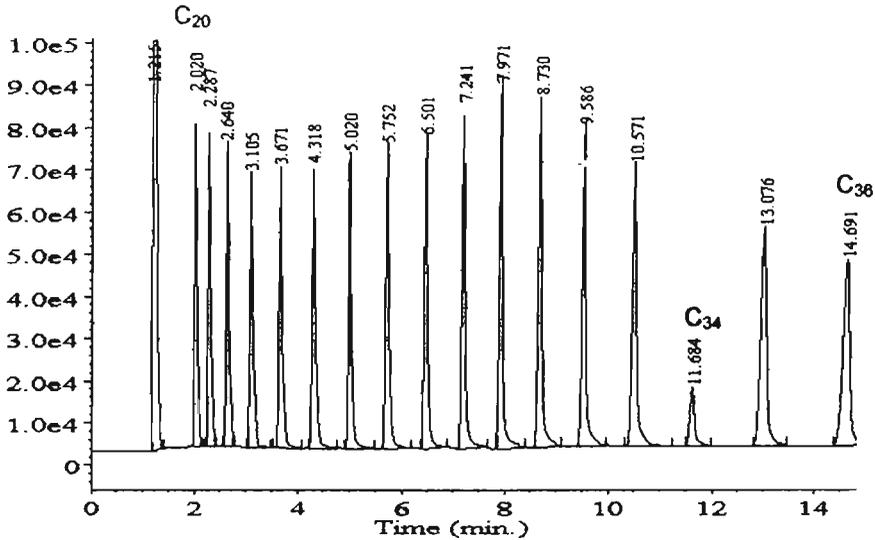


Figura F. Cromatograma de la curva de calibración, dilución  $4.5 \times 10^{-3}$ .

### VIII. Aporte de cada n-alcano a la concentración total de hidrocarburos saturados (C<sub>24</sub>-C<sub>38</sub>) y la concentración total del perfil en todas las especies analizadas

Se logró determinar la concentración de los n-alcenos con mayor exactitud a partir del n-alceno C<sub>24</sub>, a razón de esto, se tomó un perfil compuesto por todos los n-alcenos de C<sub>24</sub> a C<sub>38</sub>, excepto el C<sub>34</sub> (estándar interno). En dicho perfil se calculó el porcentaje de contribución de cada hidrocarburo saturado en relación a la concentración total, esto se muestra en el Cuadro B, en donde las especies se encuentran ordenadas de menor a mayor concentración.

Cuadro B. Porcentaje de aporte de cada n-alcano a la concentración total de hidrocarburos (C<sub>24</sub>-C<sub>36</sub>) y la concentración total del perfil en todas las especies analizadas.

n-Alcano	Banderita	Guaje	Llanero	Orchard	Búfalo	Trébol blanco	Cacahuete forrajero
C <sub>24</sub>	0.7	1.4	0.2	6.2	3.5	2.6	0.8
C <sub>25</sub>	2.8	4.6	4.2	10.5	7.0	5.2	1.3
C <sub>26</sub>	2.1	7.3	1.7	6.4	6.1	4.1	1.3
C <sub>27</sub>	5.1	20.4	8.5	9.1	9.2	13.5	2.3
C <sub>28</sub>	4.8	11.7	3.2	4.8	10.6	5.9	3.6
C <sub>29</sub>	20.7	23.4	17.3	10.9	23.0	22.7	9.0
C <sub>30</sub>	7.8	3.5	5.2	3.9	5.4	3.9	3.9
C <sub>31</sub>	38.6	14.6	35.9	18.5	16.4	21.9	22.3
C <sub>32</sub>	3.9	2.6	3.8	3.4	4.2	3.1	6.2
C <sub>33</sub>	7.3	6.0	10.8	17.6	6.7	12.5	39.8
C <sub>35</sub>	2.7	2.2	7.2	5.8	4.0	2.9	5.9
C <sub>36</sub>	3.1	2.3	1.8	2.5	3.8	1.7	3.5
Concentración total (mg/kg de MS)	135.5	143.7	151.2	199.4	191.5	207.4	227.3

Cuadro B. Porcentaje de aporte de cada n-alcano a la concentración total de hidrocarburos (C<sub>24</sub>-C<sub>36</sub>) y la concentración total del perfil en todas las especies analizadas (Continuación).

n-Alcano	Estrella africana	Huizache	Humidícola	Estrella Sto. Domingo	Alfalfa	Pata de pájaro
C <sub>24</sub>	0.0	1.4	0.2	0.4	0.6	3.4
C <sub>25</sub>	0.1	11.1	1.3	0.8	2.4	6.5
C <sub>26</sub>	0.2	1.8	0.4	0.8	1.3	3.8
C <sub>27</sub>	2.8	15.1	2.2	4.1	7.5	11.2
C <sub>28</sub>	1.9	5.4	1.2	2.3	2.7	3.9
C <sub>29</sub>	7.6	54.9	5.6	8.5	27.5	16.9
C <sub>30</sub>	2.4	1.6	2.5	2.9	3.1	4.1
C <sub>31</sub>	28.3	3.7	22.3	25.1	47.6	26.0
C <sub>32</sub>	2.7	1.1	3.0	3.9	1.8	3.2
C <sub>33</sub>	44.5	1.9	41.7	38.9	3.8	14.4
C <sub>35</sub>	8.8	1.0	18.3	9.6	0.9	4.5
C <sub>36</sub>	0.6	1.0	1.3	2.8	0.7	1.6
Concentración total (mg/kg de MS)	360.8	405.4	415.3	420.5	437.1	452.2

Cuadro B. Porcentaje de aporte de cada n-alcano a la concentración total de hidrocarburos (C<sub>24</sub>-C<sub>36</sub>) y la concentración total del perfil en todas las especies analizadas (Continuación).

n-Alcano	Ryegrass perenne	Buffel	Antena	Kikuyo	Mezquite	Huamúchil
C <sub>24</sub>	1.3	0.4	0.5	1.1	0.4	0.1
C <sub>25</sub>	2.2	1.0	1.2	2.9	2.4	0.5
C <sub>26</sub>	2.0	0.7	0.7	1.3	1.6	0.2
C <sub>27</sub>	5.1	1.7	1.3	4.6	13.8	2.1
C <sub>28</sub>	2.8	1.2	1.0	1.4	7.4	1.7
C <sub>29</sub>	17.4	9.2	2.8	6.5	67.8	58.1
C <sub>30</sub>	3.5	2.9	1.9	1.8	1.1	2.7
C <sub>31</sub>	32.2	35.0	11.4	25.4	2.4	30.9
C <sub>32</sub>	2.8	3.3	2.5	2.0	0.6	1.0
C <sub>33</sub>	25.2	35.4	40.7	33.4	0.9	2.0
C <sub>35</sub>	4.2	8.4	34.8	18.7	0.5	0.4
C <sub>36</sub>	0.7	0.9	1.2	0.7	0.5	0.2
Concentración total (mg/kg de MS)	475.1	542.6	595.1	627.1	677.8	1300.5