



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MODIFICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN  
CUANTITATIVA DE n-ALCANOS, DEL n-C20 AL n-C36 EN  
FORRAJE RYEGRASS ORIGINARIO DEL ESTADO DE  
HIDALGO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO**

**P R E S E N T A**

**Flavio Sinaí Barajas Torres**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**MÉXICO, D. F.**

**m351954**

**2005**



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	MARIA LUISA GARCÍA PADILLA
VOCAL	ELVIRA SANTOS SANTOS
SECRETARIO	ROCÍO POZAS HORCASITAS
1er SUPLENTE	GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI
2do SUPLENTE	AGUSTÍN PALMA DE LA CRUZ

FACULTAD DE QUÍMICA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Elvira Santos Santos  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Q. Irma C. Gavilán García  
Supervisor Técnico

  
\_\_\_\_\_  
Flavio Sinal Barajas Torres  
Sustentante

## AGRADECIMIENTOS

A mi Dios por amarme, por salvarme: por una eternidad a su lado. **Jn 14:6**. Gracias.

A mi amada esposa Martha, por sus oraciones que ayudaron en este proyecto, por su compañía y apoyo, y sobre todo por compartir su vida conmigo. Gracias.

A mi pequeña Madian por su dependencia

A mis Padres por su paciencia, apoyo incondicional y confianza en mi. Gracias.

A mis hermanos por su continua contribución a mi carrera.

A Francisco por ser un verdadero amigo. **Pr 17:17**

A mis condiscípulos por su amistad y sus oraciones.

A la Dra. Elvira Santos por su paciencia, apoyo y constante guía en todo mi trabajo, así como por sus consejos.

A la Mtra. Irma, por su paciencia en las constantes revisiones y correcciones, y por adoptarme como un colaborador en su laboratorio, por su confianza y apoyo.

A mis compañeros de trabajo, por su colaboración amistad y constante apoyo.

A la Dra Rocío Pozas, por su ayuda y tiempo en la revisión de esta tesis

A la Mtra Maria Luisa García Padilla, gracias por ayudarme a leer y escribir.

# CONTENIDO

	Página
INDICE DE TABLAS.....	V
INDICE DE FIGURAS .....	VII
INDICE DE CUADROS .....	VIII
INDICE DE GRÁFICAS .....	VIII
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2 ANTECEDENTES .....	7
2.1 Consumo voluntario.....	7
2.1.1 Medidas de consumo de pasto.....	7
2.1.2 Técnica de pesado.....	7
2.1.3 Técnica de marcadores indigestibles.....	7
2.1.4 Técnica de marcadores naturales.....	9
2.2 Marcadores fecales.....	10
2.2.1 Marcadores externos.....	11
2.2.1.1 Oxido de Cromo.....	11
2.2.2 Marcadores internos.....	11
2.2.2.1 n-Alcanos.....	12
2.3 Cera cuticular de plantas.....	12
2.3.1 Descripción.....	12
2.3.2 Composición.....	13
2.4 Alcanos.....	14
2.5 Cromatografía de gases.....	15
2.5.1 Fundamentos.....	15
2.5.2 Cromatografía de gases.....	16
2.5.3 Cromatografía en columna (CC).....	18
2.6 Espectrometría de Infrarrojo.....	18
2.7 Purificación de alcanos en cera cuticular.....	20
3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
3.1 Fase de campo.....	25

	Página
3.1.1 Selección de la muestra .....	25
3.1.2 Recolección .....	25
3.2 Fase de Laboratorio .....	26
3.2.1 Revisión de la técnica de Mayes.....	26
3.2.2 Reproducción de la técnica modificada de Mayes .....	28
3.2.3 Optimización de la etapa de saponificación .....	28
3.2.4 Optimización de la etapa de extracción .....	29
3.2.5 Optimización de la etapa de separación por cromatografía en columna .....	30
3.2.6 Condiciones de análisis instrumental .....	31
3.2.6.1 Análisis cromatográfico.....	31
3.2.6.2 Análisis por espectrometría de infrarrojo .....	32
3.3 Análisis de la información.....	33
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
4.1 Reproducción de la técnica modificada de Mayes .....	35
4.2 Etapa de saponificación .....	37
4.3 Etapa de extracción líquido-líquido.....	41
4.4 Etapa de separación por cromatografía en columna.....	44
4.5 Técnica propuesta .....	50
5 CONCLUSIONES .....	54
6 BIBLIOGRAFÍA .....	56
7. ANEXOS .....	59
7.1 Soluciones preparadas .....	59
7.2 Procedimientos de laboratorio.....	63
7.3 Material y reactivos .....	67

## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 4.1 Concentración de alcanos en ryegrass divididos en alcanos mayoritarios y alcanos de concentración menor.....	36
Tabla 4.2 Perfil de alcanos en la cera cuticular de ryegrass .....	36
Tabla 4.3 Perfil de alcanos en ryegrass a diferentes tiempos de saponificación. Cantidad en mg de alcano/kg MS .....	37
Tabla 4.4 Cantidades en mg/kg MS de los alcanos mayoritarios a diferentes tiempos de saponificación.....	39
Tabla 4.5 Perfil de alcanos en ryegrass a diferentes temperaturas de extracción. Concentraciones dadas en mg alcano / kg de MS. ....	41
Tabla 4.6 Alcanos mayoritarios de ryegrass obtenidos a diferentes temperaturas de extracción. Las concentraciones están dadas en mg de alcano / kg de MS .....	43
Tabla 4.7 Perfil de alcanos de ryegrass al variar la cantidad de gel de sílice en la columna cromatográfica. Las concentraciones están dadas en mg de alcano / kg de muestra. ....	44
Tabla 4.8 Concentraciones y desviación estándar de los alcanos mayoritarios de ryegrass obtenidos al variar la cantidad de gel de sílice en la columna cromatográfica usada para separación. Las concentraciones están expresadas en mg de alcano / kg de MS .....	46

Tabla 4.9 Valores de la proporción existente entre n-C <sub>29</sub> y n-C <sub>31</sub> para 2 y 4 g de gel de sílice usadas en la separación por columna cromatográfica y su porcentaje de desviación respecto a la técnica de Mayes .....	46
Tabla 4.10 Señales existentes en el espectro de infrarrojo del extracto de ryegrass donde se usan 2 g de gel de sílice para la etapa de separación.....	48
Tabla 4.11 Señales existentes en el espectro de infrarrojo del extracto de ryegrass donde se usan 4 g de gel de sílice para la etapa de separación.....	49
Tabla 4.12 Tabla de valores de las concentraciones de n-alcanos obtenidos en la técnica de Mayes y la técnica propuesta. Valores en mg de n-alcano/ kg MS .....	51
Tabla 4.13 Comparación de la concentración de los alcanos mayoritarios entre la técnica de Mayes y la propuesta de modificación. Los valores están dados en mg de alcano / kg de MS .....	53



## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Fotografía de la planta de ryegrass.....	1
Figura 2.1 Microfotografía de la cera cuticular de la superficie de una planta .....	13
Figura 2.2 Modelo molecular de n-heptano. Simulación usando software demo ACDLabs .....	15
Figura 2.3 Foto de cromatógrafo de gases HP modelo 5890 II .....	17
Figura 2.4 Representación gráfica de un cromatograma que contiene 4 analitos mostrando tiempos de retención y área bajo la curva. ....	17
Figura 2.5 Espectro electromagnético y su escala en frecuencia (Hz) y en longitud de onda (cm).....	19
Figura 2.6 Espectro de infrarrojo dividido en zonas según el tipo vibración perteneciente a enlaces entre diversos átomos que corresponden a grupos funcionales. Útil en la interpretación de espectros. ....	20
Figura 4.1 Espectro de infrarrojo de una muestra del extracto de ryegrass usando 4 g de gel de sílice en la etapa de separación por columna cromatográfica .....	47
Figura 4.2 Espectro de infrarrojo del extracto de ryegrass cuando se usaron 4 g de gel de sílice en la columna cromatográfica en la etapa de saponificación. ....	48

## INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 3.1 Esquema del procedimiento de determinación de alcanos según la técnica de Mayes .....	26
Cuadro 3.2 Esquema del procedimiento de determinación de alcanos según la técnica modificada de Mayes .....	27

## INDICE DE GRÁFICAS

Grafica 4.1 Perfil de concentraciones de n-alcanos obtenidos siguiendo la técnica de Mayes .....	35
Grafica 4.2 Perfil de concentraciones de alcanos obtenidos a diferentes tiempos de saponificación de la muestra.....	38
Gráfica 4.3. Variación de la concentración de alcanos n-C <sub>29</sub> y n-C <sub>31</sub> a diferentes tiempos de Saponificación.....	39
Gráfica 4.4 Perfil de concentración de alcanos obtenidos a diferentes tiempos de extracción.....	42
Grafica 4.5. Representación gráfica de los valores de concentración de los n-alcanos n-C <sub>29</sub> y n-C <sub>31</sub> obtenidos a diferentes tiempos de concentración.....	42
Grafica 4.6 Perfil de concentración de alcanos para columnas con diferentes cantidades de gel de sílice. Valores en mg n-alcano/ kg MS.....	45
Gráfica 4.7 Perfil de concentraciones de alcanos obtenidos por dos técnicas diferentes. Las concentraciones están expresadas en mg de n-alcano/ kg de MS.....	52

## 1. INTRODUCCIÓN

La proteína animal, ya sea en forma de carne o de leche y sus derivados, es un importante componente de la dieta de los seres humanos. La leche se obtiene principalmente de la vaca lechera y en menor proporción de la cabra. La carne puede provenir de diferentes especies animales (aves, conejos, cerdos, bovinos, ovinos y caprinos principalmente). Los rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos), al ser herbívoros pueden aprovechar una fuente de nutrientes que otros animales domésticos, como las aves, los cerdos, o el mismo ser humano no pueden utilizar de una manera eficiente: los forrajes.

Se entiende por forraje todo material que se usa para la alimentación de rumiantes, ya sea verde como el o pasto rye (también llamado ryegrass), seco como el heno de alfalfa o ensilado como los ensilados de maíz. El utilizar forrajes en la alimentación de rumiantes, además de ser un imperativo fisiológico, abarata los costos de producción, especialmente si el suministro de forraje es verde y se hace se hace a través del pastoreo. El uso de forrajes disminuye o evita la competencia entre humanos y animales por los granos de cereales.

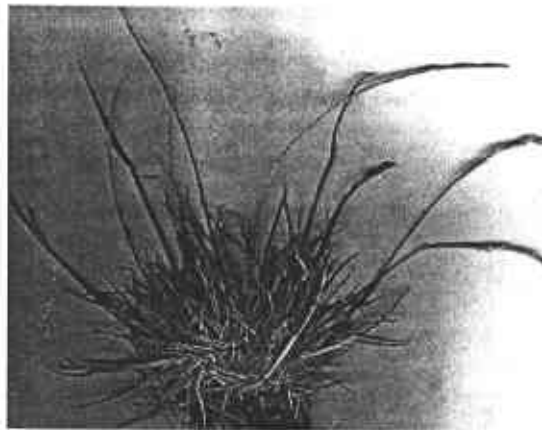


Figura 1.1 Fotografía de la planta de ryegrass. Fuente. National ryegrass alliance; answers.com.

La adecuada alimentación animal depende de conocer y cubrir las necesidades nutrimentales de acuerdo con la especie animal y la finalidad zotécnica (producción de carne, leche, lana, pelo, etc.), además es necesario tener un buen conocimiento de la composición química de los alimentos que constituyen la dieta del animal, de la digestibilidad del alimento (cuánto asimila el organismo), del consumo voluntario y de la composición botánica de la dieta (qué forrajes escoge el animal), los que son factores críticos y desafortunadamente, no fáciles de determinar con precisión.

Con el conocimiento de las plantas que come el animal, la cantidad y lo que asimila de cada planta o mezcla de ellas, se puede calcular el aporte nutricional de la dieta y de ser necesario, mejorarla mediante la formulación de complementos que ayuden a cubrir las necesidades de los animales en pastoreo, así como hacer un mejor uso de los recursos locales.

Para determinar la composición botánica en la dieta, la digestibilidad de los forrajes y el consumo voluntario en animales en pastoreo, se han diseñado métodos de aproximación. En el caso de la composición botánica se realiza una identificación de especies presentes en muestras ruminales, esofágicas (que provienen del esófago del animal), en heces o tomando muestras de pasto de zonas en que el animal haya consumido forraje. Para el caso de la determinación del consumo se realizan desde cálculos por diferencia de peso del animal antes y después de comer, hasta cálculos de diferencia de forraje presente en el área del terreno antes y después de que el animal ha pastoreado. Ya conocido lo que come el animal se realiza un análisis químico de la calidad nutritiva de las plantas que consume. Para el caso de la digestibilidad se han diseñado métodos *in vitro*, que reproducen las condiciones del rumen y del abomaso (parte del estómago del animal), en una cámara donde se introduce una muestra de forraje y se somete al proceso de digestión. Considerando el peso inicial de materia seca y el final, se obtiene por diferencia el porcentaje que fue digerido.

$$\text{DIVMS} = \frac{\text{kg de materia seca inicial} - \text{kg de materia seca después de la digestión}}{\text{kg de materia seca inicial}}$$

Donde,

DIVMS= Digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

Los datos obtenidos de la digestibilidad *in vitro*, junto con los datos del cálculo de la producción fecal, son útiles para ayudar a calcular el consumo voluntario en animales en pastoreo, según la siguiente fórmula:

$$\text{CONSUMO DE MATERIA SECA} = \frac{\text{Producción fecal (g/día)}}{1-\text{DIVMS}}$$

Para el cálculo de la producción fecal se requiere de una sustancia no digerible de concentración conocida la cual nos pueda dar una medida indirecta de la cantidad de materia seca producida, a estas sustancias se les denomina marcadores fecales y la fórmula que los relaciona es la siguiente:

$$\text{PRODUCCIÓN FECAL (g/día)} = \frac{\text{mg de marcador administrado (mg/día)}}{\text{mg de marcador en heces (mg/g)}}$$

Este marcador fecal se administra una o dos veces por día en cápsulas de gelatina y su dosis debe ser constante. Los marcadores fecales deben tener las siguientes características: ser inertes, (es decir que la cantidad digerida sea nula y pueda ser cuantificada), tener una elevada recuperación, poder cuantificarse exactamente y de ser físicamente similares, en cuanto a tamaño y densidad de partícula, al material que se encuentra en el tracto digestivo. Estos marcadores son llamados internos si se encuentran como compuesto químico que sea parte de la dieta y externos si son compuestos suministrados oralmente.

Uno de los marcadores fecales externos más usados es el óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), el cual da resultados muy precisos y cuyo análisis no es complicado, pero tiene la desventaja que es tóxico para los humanos y en ocasiones los resultados se ven afectados por suelos que están contaminados por este elemento. En los últimos años se ha comenzado a usar los alcanos como marcadores internos y externos, ya que presentan muchas ventajas así como aplicaciones.

Por otro lado, se sabe que la mayoría de las plantas poseen en toda su superficie una capa de cera que contiene, entre otras cosas, ácidos grasos y alcanos de alto masa molecular (de 20 hasta 40 átomos de carbono), que en ocasiones alcanzan más del 90 % de la cera cuticular. Los alcanos de número de carbono pares en ocasiones no se encuentran, predominando así los alcanos impares. Éstos son también en su mayoría de estructura lineal. Existe además, una proporción definida entre los alcanos mayoritarios que varía en función de la parte de la planta, de la edad y de la especie, haciendo posible que, por el análisis de alcanos en una muestra, se pueda conocer la parte de la planta así como la especie, también se ha conseguido, mediante el análisis químico y herramientas estadísticas, reconocer diferentes plantas pertenecientes a una mezcla, así como su proporción y cantidad en la mezcla. Esto ha hecho de los alcanos buenos candidatos para determinar la composición botánica de las mezclas de plantas que consumen los herbívoros.

Una característica de estos alcanos es que, al ser compuestos que muy difícilmente reaccionan, son pobremente digeridos y su absorción en el tracto digestivo no es significativa por lo que se han comenzado a usar como marcadores internos. Al usar estos alcanos de número de carbono impares junto con alcanos pares dosificados como marcadores externos se puede obtener además, la producción fecal, el consumo voluntario y con estos dos, un cálculo de la digestibilidad, conociendo así a partir de los alcanos todos los datos deseados. Incluso, mediante métodos matemáticos es posible identificar la composición de la dieta.

Debido a la cantidad de información que aportan, el uso de los alcanos se ha comenzado a generalizar en esta área de investigación, por lo que la técnica de purificación y análisis también ha requerido un mejoramiento continuo.

La técnica de determinación de alcanos ha tenido varias modificaciones desde que comenzó a usarse en 1986 por Mayes y colaboradores<sup>19</sup>, principalmente, debido a que el tiempo de análisis por muestra y su costo son muy altos. En resumen la técnica consistía en tomar la muestra, liofilizarla, molerla, realizar una extracción de la cera cuticular de la planta con hexano, saponificarla para romper las cadenas de ésteres de masa molecular similar a los alcanos, realizar una extracción líquido-líquido, purificar por columna, y por último analizar por cromatografía de gases. Todo este procedimiento demoraba hasta 24 horas por muestra y, en ocasiones, la mitad del tiempo era de saponificación. En trabajos posteriores se realizaron modificaciones, de manera que disminuyeran el tiempo y los materiales, sin perder la precisión y exactitud que ya se había ganado. Se ha realizado, también, la validación de la técnica<sup>28</sup>, pero hasta ahora el tiempo de análisis por muestra sigue siendo de varias horas.

En México existen una gran variedad de pastos que se usan en el pastoreo, sin que se conozca muchos sobre ellos, por lo que este trabajo tiene como objetivo general el realizar un estudio de la técnica de Mayes, aplicada al caso del pasto llamado ryegrass originario del estado de Hidalgo.

Y como objetivos específicos se pretende:

- a) Estudiar la etapa de saponificación
- b) Estudiar la etapa de extracción líquido-líquido
- c) Estudiar la etapa de separación

El objetivo secundario de este trabajo es modificar la técnica de preparación de la muestra para hacerla aún más rápida y menos cara, pero manteniendo los resultados obtenidos con respecto al perfil de alcanos.

#### Alcances y limitaciones

No se considera dentro del estudio la etapa de recolección y pulverización de la muestra.

La muestra del forraje no es diferenciada, es decir, es una muestra que contiene hojas, tallos y flores, y que están mezcladas en una proporción desconocida, pero la mezcla ha sido homogeneizada.

El estudio de cada etapa depende del avance logrado en la etapa anterior, por lo que el estudio general está limitado a los logros obtenidos en cada etapa, por esta razón no se han considerado todas las combinaciones posibles entre las variables modificadas.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CONSUMO VOLUNTARIO (CV)

El consumo voluntario se refiere a la cantidad de alimento consumida por un animal dada en kg de materia seca. Esta cantidad es importante debido a que es necesaria para calcular los nutrientes que ha consumido el animal y de esta manera determinar su estado nutricional y la cantidad de complementos que necesita para su óptima alimentación<sup>10</sup>.

Existen varias formas de calcular el consumo voluntario:

#### 2.1.1 Medidas de consumo de pasto<sup>33</sup>

Dentro del área en el que el animal va a pastorear, se realiza un muestreo al azar del pasto, tanto antes como después de que el animal haya comido. Se determina el peso de las muestras por área y se extrapola para determinar la cantidad de materia seca del campo de pastoreo antes y después. La diferencia es lo que el animal consumió. Esta técnica sirve para realizar una aproximación muy limitada del consumo.

#### 2.1.2 Técnica de pesado<sup>10</sup>

Consiste en pesar a los animales antes y después de pastar. Aquí se consideran las pérdidas por excretas y orina, recolectándolas en bolsas. Las pérdidas por evaporación se calculan a partir de períodos de control donde el animal no ingiere alimento. Este método provee valores aproximados a los valores reales de consumo, comparados con aquellos que no están en pastoreo. Pero estas actividades perturban al animal y se desconoce los efectos sobre su comportamiento alimenticio.

#### 2.1.3 Técnica de marcadores indigeribles.<sup>10</sup>

En principio, para determinar el CV de un animal es necesario saber

- i) la producción fecal (PF), es decir, lo que el animal consumió pero no conservó, y

ii) la digestibilidad (DIV) que es la cantidad de alimento que fue asimilada<sup>19</sup>. La relación existente entre estos está dada por:

$$CV = PF / (1-DIV) \quad (1)$$

Respecto a la recolección de heces, como debe recuperarse todo, es necesario colocar dispositivos en los animales de manera que no se pierda materia fecal, esto termina incomodando al animal de manera que afecta su comportamiento normal, generando esto un error en los resultados<sup>6, 22</sup>. Para resolver este problema, la producción fecal se calcula indirectamente suministrando oralmente un compuesto como el óxido de cromo<sup>23</sup>, también llamado marcador fecal y recolectando solamente una muestra de las heces en donde se determina la concentración del marcador y con estos datos el PF se obtiene de la siguiente forma:

$$PF \text{ (kg MS/día)} = \frac{\text{Marcador administrado (mg/día)}}{\text{Concentración de marcador en heces (mg/kg MS)}} \quad (2)$$

Donde kg MS corresponde a kilogramos de materia seca.

La digestibilidad *in vitro* se realiza tomando una muestra representativa del forraje que come el animal y se somete a condiciones similares al tracto digestivo para su digestión. Para lograr esto se toma una muestra del líquido ruminal, este líquido contiene entre otras cosas la flora bacteriana que tiene el animal en el estómago y que es la que se encarga de digerir la materia orgánica. En una cámara se coloca la muestra del alimento del animal, se coloca el líquido ruminal y se mantiene a una temperatura entre 38 y 40 °C durante 48 horas, posteriormente se sumerge en una solución de ácido clorhídrico durante otras 48 horas<sup>27</sup>, al final se determina la cantidad que no se digirió y se obtiene el porcentaje de digestión de la mezcla, considerando que lo que comió el animal es el 100%. Existen algunas desventajas al usar esta técnica, la primera de ellas

es que este valor sólo representa la digestibilidad de un animal y de una sola mezcla de plantas y se usa para extrapolarlo a varios; la segunda es que no es apropiado para animales que reciben suplementos de cereales y la última es que la relación entre los valores de digestibilidad *in vitro* / *in vivo* es tal que el error en su determinación multiplica el error en el cálculo de consumo. Además de resultar una técnica muy cara<sup>6</sup>

#### 2.1.4 Técnica de marcadores naturales

En este caso se usa algún constituyente de la comida, como la lignina, para determinar el CV, pero presenta algunos problemas. El primero es que la muestra de forraje consumido por el animal es diferente a la que es seleccionado por el investigador para el análisis; la manera de resolver esto es tomando una muestra de lo que el animal ha comido y analizarla, la muestra proviene de animales fistulados, es decir que tienen un orificio en el estómago de donde se puede tomar la muestra. Otro problema es que la cantidad de lignina aumenta con la edad de la planta, teniendo una cantidad muy pequeña, que no se puede detectar, en las plantas más jóvenes y en los retoños de las plantas, que es lo que más se comen los animales.

Otra posibilidad es medir la relación existente entre la cantidad de materia orgánica consumida y la concentración fecal de nitrógeno, y esto funciona muy bien para diferentes niveles de consumo de animales similares en pasturas similares, pero al variar alguno de estos factores los resultados no se pueden extrapolar y en diferentes situaciones no funciona, por lo que hay que repetirlo para cada experimento. Debido a este problema es una técnica que se usa para determinar digestibilidad, pero no consumo. Se han tratado de usar otros marcadores fecales naturales, pero los resultados no han sido tan buenos como los obtenidos al usar n-alcenos<sup>14, 16</sup>.

La ventaja que presentan los alcanos respecto al cálculo de consumo de forraje se debe principalmente a que éstos tienen un patrón característico en donde predominan alcanos impares<sup>6,9,13,15,17,26</sup>. Cuando se obtiene el patrón de alcanos impares de una mezcla de plantas, al ser indigeribles, se espera el mismo antes de consumir el forraje y

en las excretas<sup>19</sup>. Si se suministra un alcano artificial par como el n-C32 y se compara con el impar n-C31 que es propio del forraje, entonces se puede saber, por la relación existente entre ellos en la heces, que cantidad de esa mezcla de forrajes consumió el animal. La relación usada para el cálculo es la siguiente:

$$\text{Consumo de forraje (kg MS/día)} = \frac{(F_i/F_j) (D_j + I_c * C_j) - I_c * C_i}{H_i - (F_i/F_j) * H_j} \quad (3)$$

Donde MS es materia seca,  $H_i$ ,  $C_i$  y  $F_i$  son las concentraciones en mg/kg MS de alcanos impares en hierba, concentrado y heces respectivamente; y  $H_j$ ,  $C_j$  y  $F_j$  son las concentraciones en mg/kg MS de alcanos pares en hierba, concentrado y heces respectivamente;  $I_c$  es el consumo de concentrado en kg MS/ día y  $D_j$  es la cantidad de alcano j dosificado en mg / día

## 2.2. MARCADORES FECALES

Para estas dos últimas técnicas se requieren de compuestos con características específicas llamados marcadores fecales. Estos son aquellos materiales que se encuentran en las heces y que pueden ser originados por la dieta (marcadores internos) o que pueden ser administrados oralmente (marcadores externos).<sup>14</sup>

Algunas de las principales características que debe cumplir un marcador fecal son: que se pueda realizar su recuperación completa en heces, que su medición sea cuantitativamente exacta, que sea inerte respecto a su paso por el tracto digestivo, que no tenga efectos tóxicos o fisiológicos y que tenga características similares al contenido del tracto digestivo, como son el tamaño y la densidad de partícula.<sup>14</sup>.

Su principal uso es para determinar la *producción fecal*, la cual es un dato necesario, junto con el estimado de digestibilidad, para estimar el *consumo* de forraje de

algún herbívoro. Pueden ser usados también para estimar la *velocidad de paso de la digesta* (alimento) en el tracto digestivo y para determinar la digestibilidad de la dieta.

### 2.2.1 Marcadores externos

Algunos de los marcadores sólidos que se han usado son partículas plásticas, fibra indigerible de detergente ácido (IADF) y otros cromógenos, pero su análisis es empírico, es decir, no puede cuantificarse exactamente. El óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) es uno de los marcadores más usados y últimamente los compuestos pertenecientes a la cera cuticular de las plantas se han incluido a esta lista y con más ventajas que otros<sup>17,5</sup>.

#### 2.2.1.1 Óxido de cromo

Es uno de los marcadores más usados. Sus resultados en cuanto al cálculo del consumo voluntario son muy precisos<sup>23</sup>, aunque tiene el inconveniente de que es muy tóxico para los seres humanos.

### 2.2.2 Marcadores internos

Otros posibles marcadores son los constituyentes del alimento, especialmente los no digeribles como es el caso de los constituyentes de la cera cuticular, los cuales son llamados marcadores internos. El estudio de estos compuestos comenzó con Chibnall en 1934<sup>2</sup> y a la fecha se han encontrado varios candidatos a marcadores internos fecales<sup>9</sup> como son:

- Hidrocarburos: Alquenos y alcanos de cadenas lineales y ramificadas
- Ésteres de cera: que son ésteres de cadena larga
- Ácidos grasos,
- Alcoholes grasos de cadenas largas
- Aldehídos y cetonas de cadena larga
- Beta-dicetonas
- Esteroles

Cada uno de estos compuestos son potenciales marcadores fecales, pero de entre ellos, los que se han estudiado más debido a su carácter inerte son los hidrocarburos, especialmente los alcanos lineales de alta masa molecular. El resto de ellos no se han estudiado a profundidad, pues la cantidad en que se encuentran es muy baja. Los que se encuentran en concentración suficientemente alta son los alcanos.

#### 2.2.2.1 n-Alcanos

Los alcanos tienen la ventaja de ser sustancias que muy difícilmente reaccionan y que dentro del tracto digestivo, su digestión por parte de las bacterias y su absorción en el intestino es tan pequeña, que pueden ser usados como marcadores fecales, especialmente los alcanos lineales o n-alcenos de cadena superior a los 19 átomos de carbono <sup>7,5, 13</sup>.

La evidencia indica que los cálculos estimados de consumo de hierbas usando el par de alcanos C33/C32 es más exacto que usando los alcanos de cadena menos larga y es más exacto que el procedimiento basado en cromo *in vitro*. En cuanto a los cálculos de producción fecal, ambos métodos resultaron estadísticamente idénticos <sup>8</sup>

### 2.3 CERA CUTICULAR DE LAS PLANTAS

#### 2.3.1 Descripción

La cutícula es una capa cerosa que cubre los tejidos de una planta. Se encuentra en la superficie de tallos, hojas, raíces, flores y semillas. Es la primera barrera de protección de la planta contra cualquier daño causado por patógenos o acción mecánica. Su principal función es la de conservar la cantidad de agua en la planta así como sus constituyentes dentro de ella. Esta capa es sintetizada por la epidermis y secretada a la superficie. Esta cera al ser sólida se cristaliza en diversos patrones, propios de cada planta.

Se ha encontrado que la cantidad de cutícula presente en una planta es directamente proporcional a la intensidad de la luz que recibe y es inversamente proporcional a la humedad relativa del medio donde crece, pues al remover la capa de cera sobre una hoja o fruto, la transpiración aumenta considerablemente<sup>24,18</sup>.

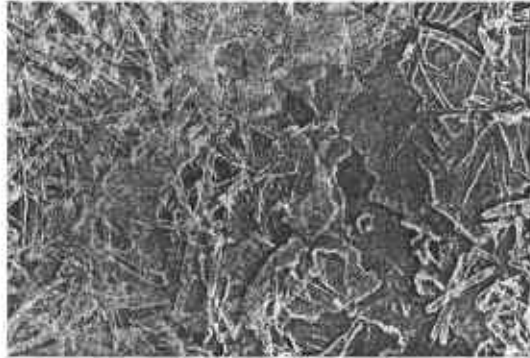


Figura 2.1 Microfotografía de la cera cuticular de la superficie de una planta

### 2.3.2 Composición

La cera cuticular contiene principalmente ésteres, alcoholes, ácidos grasos y parafinas (alcenos); es sólida debido a que la mayoría de sus constituyentes son de alta masa molecular y como consecuencia sólidos. Su composición total es compleja, pero se puede dividir en dos grandes grupos que son los compuestos de cadena larga y los compuestos cíclicos<sup>18</sup>.

El primer grupo consta principalmente de ésteres e hidrocarburos, además de contar con aldehídos de entre 21 y 35 átomos de carbono, alcenos de cadenas lineales y ramificadas<sup>2</sup>, alquenos, alcoholes primarios y secundarios,  $\alpha,\omega$ -dioles, cetonas (monocetonas y  $\beta$ -dicetonas), ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos, también se encuentran cadenas de grupos multifuncionales como alcoholes-ácidos, ésteres-cetonas, etc.; y el segundo grupo, además de compuestos de cadena larga, contiene compuestos cíclicos como los terpenoides, flavonoides y esteroides<sup>18</sup>

La composición de esta cera varía en función de la edad de la planta y también es variable en las diferentes partes de la planta, y aún en diferentes zonas de la cutícula<sup>7</sup>. De manera similar existen plantas con una gran cantidad de esta y otras con muy poca cantidad encontrándose una gran gama de composiciones diferentes entre especies, haciéndola de esta manera una gran ayuda para estudios taxonómicos, ya que es característica para cada especie<sup>9</sup>.

#### 2.4. ALCANOS

De entre los compuestos químicos, los que tienen el grupo funcional más sencillo son los alcanos. Están constituidos por grupos de átomos con uniones sencillas (enlaces) entre átomos de carbono (C) C-C y entre átomos de carbono de hidrógeno (H) C-H. Por lo que son llamados hidrocarburos.

Pueden ser clasificados por su estructura en alcanos de cadena lineal o ramificada, y cuando todos los enlaces son sencillos se llaman hidrocarburos saturados. Sus propiedades varían en función de su masa molecular<sup>20</sup>. Para el caso de los alcanos lineales, las moléculas menores a 5 átomos de carbono son gases, mientras que los de 5 a 18 son líquidos y los de mayor número de carbonos son sólidos a temperatura ambiente. Estos compuestos son químicamente poco reactivos en condiciones normales y se requieren condiciones especiales para hacerlos reaccionar.

Los hidrocarburos son moléculas no polares y la atracción que tienen entre sí es debida a las fuerzas de van der Waals, que es la fuerza de atracción que se genera por la polarización de la densidad electrónica en las moléculas<sup>20</sup>, aunque la magnitud de esta fuerza es muy pequeña, es suficiente para mantener agregadas a las moléculas de manera que estén en estado líquido o sólido. Los alcanos son solubles en otras sustancias no polares o de polaridad baja como el éter, cloroformo, diclorometano, etcétera. Son insolubles en agua y por lo general menos densos que ella.



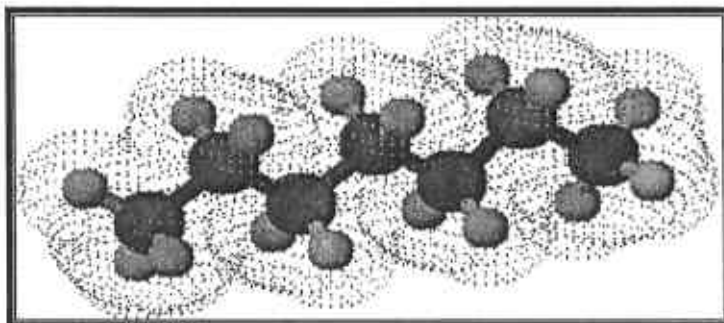


Figura 2.2. Modelo molecular de n-heptano. Simulación usando software demo ACDLabs®

Los alcanos se han encontrado entre los constituyentes más abundantes en la cera cuticular en las plantas analizadas<sup>26</sup>. La composición de los alcanos encontrada es usualmente entre  $C_{25}$  y  $C_{35}$  en su mayoría y son cadenas lineales impares. De entre estos los más abundantes son  $C_{29}$ ,  $C_{31}$  y  $C_{33}$ <sup>5, 6,7</sup>. Tienen la ventaja de ser muy fáciles de analizar debido a su localización fuera de la célula vegetal, además de ser compuestos que una vez formados no se vuelven a metabolizar por estar en estado sólido y en el exterior de las células.<sup>15,24</sup>

Los alcanos han sido propuestos como marcadores internos para medir consumo de forrajes<sup>19</sup>. Son prácticamente inertes en el sistema digestivo y su medición es relativamente fácil y muy precisa y exacta<sup>19, 30</sup>. Su análisis se realiza por cromatografía de gases previa purificación. También se pueden determinar por Espectrofotometría de infrarrojo<sup>2, 9</sup>.

## 2.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)<sup>32,12</sup>

### 2.5.1 Fundamentos

Esta técnica consiste principalmente en hacer interactuar dos fases mutuamente inmiscibles, una móvil que puede ser líquido o gas, donde se encuentra el soluto y una estacionaria que puede ser líquido o sólido, por donde pasa la fase móvil y que también entra en contacto con el soluto. Dentro de este sistema cada compuesto o analito contenido en la fase móvil experimenta una serie de interacciones o reparto con la fase estacionaria. A la relación existente entre estas interacciones se le llama constante de reparto  $k$  y depende de condiciones tales como el área superficial de la fase estacionaria, el volumen y flujo de la fase móvil y la naturaleza química de la fase móvil, de la fase estacionaria y del analito. Esta constante de reparto es propia para cada compuesto, lo que hace posible que en condiciones óptimas de operación la diferencia del valor de reparto entre varios compuestos permita separarlos en un sistema cromatográfico. Esta característica la hace una técnica muy útil para la purificación y análisis de compuestos.

### 2.5.2 Cromatografía de gases (CG)

Existen varios tipos de cromatografía, y su uso depende de la muestra a analizar. En el caso del análisis de la cera cuticular de las plantas la cromatografía más usada es la CG cuya fase estacionaria es un líquido soportado químicamente sobre un sólido y su fase móvil es un gas.

Esta técnica se usa principalmente para separar compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles, pero existen casos en los que el compuesto puede ser volátil pero no térmicamente estable y que aún así, mediante ciertas estrategias este tipo de cromatografía puede ser usada para la determinación de estos compuestos; también se puede usar para separar muestras no volátiles pero térmicamente estables y un ejemplo de esto son los alcanos de alta masa molecular. Estos casos han dejado de ser la excepción pues su uso es cada vez más frecuente.



Figura 2.3. Foto de cromatógrafo de gases HP modelo 5890 II. (Foto F. Barajas)

Un equipo de CG presenta como resultado del análisis un cromatograma, que es un registro continuo de la masa del soluto eluido (arrastrado) en la columna en función del tiempo (Figura 2.4). Un cromatograma es la representación gráfica de los procesos que ocurren en la columna, contiene esencialmente señales (bandas o picos) con la forma de una curva de distribución gaussiana y donde cada señal, cuando hay una correcta separación, representa la presencia de un compuesto y su área bajo la curva representa la cantidad de producto registrada.

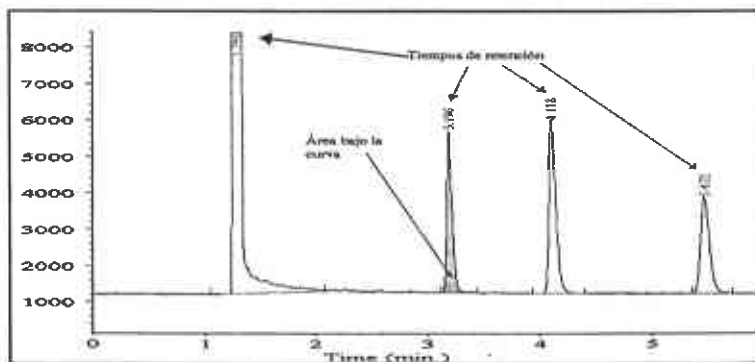


Figura 2.4. Representación gráfica de un cromatograma que contiene 4 analitos mostrando tiempos de retención y área bajo la curva.

### 2.5.3 Cromatografía en columna (CC)

Esta técnica es una de las formas de cromatografía de líquidos, originalmente fue usada para la separación de mezclas coloridas, pero se halló su utilidad en la separación y purificación de una gran variedad de compuestos. Consiste, básicamente en hacer pasar una cantidad de muestra contaminada o una mezcla de compuestos, por una columna de vidrio empacada con un material soporte (fase estacionaria) que puede ser alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), gel de sílice, óxido de magnesio, etc., el cual interactúa con el soluto por polaridad. Este soluto es arrastrado (eluido) por un disolvente que actúa como la fase móvil, y en el cual es soluble la muestra. Los compuestos se separan por la diferente polaridad y se recolectan en fracciones. Esta cromatografía es parte de la obtención de alcanos de las plantas puesto que es una técnica no destructiva que permite recuperar los compuestos en cuestión en cantidades mayores que las cromatografías instrumentales.

### 2.6 ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO<sup>32</sup>.

La radiación infrarroja es una radiación que forma parte del espectro electromagnético. Esta radiación genera, al aplicarse sobre alguna sustancia, la vibración de los átomos de una molécula respecto a otros. La frecuencia de esta radiación abarca entre  $4000$  a  $650\text{ cm}^{-1}$  (Figura 2.5)

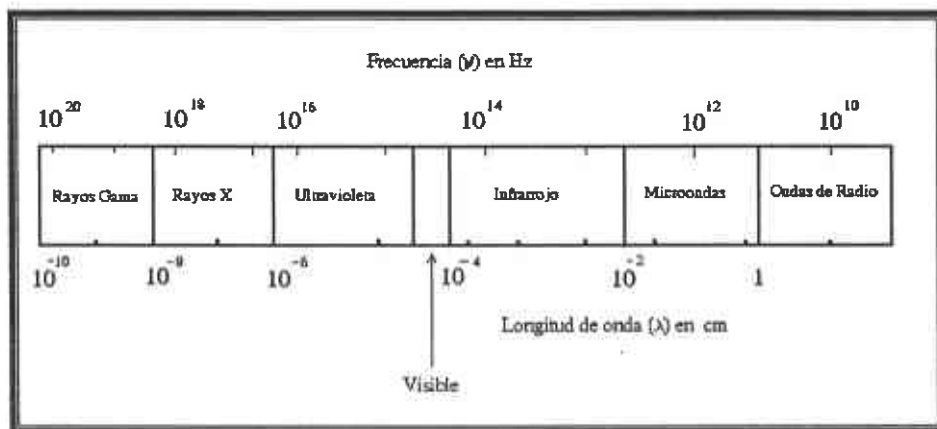


Figura 2.5. Espectro electromagnético y su escala en frecuencia (Hz) y en longitud de onda (cm)

La técnica de espectrometría de infrarrojo consiste esencialmente en aplicar radiación perteneciente al intervalo infrarrojo sobre una muestra y registrar en un espectro de infrarrojo la frecuencia y la intensidad de absorción de la muestra. En un espectro de infrarrojo aparecen señales que nos dan información del compuesto en estudio. Un espectrograma de infrarrojo nos muestra la suma de las absorciones de los diferentes movimientos vibracionales en cada frecuencia. Algunas de estas señales aparecen lo suficientemente intensas para asignarlas a un solo tipo de movimiento. La relación entre el movimiento de vibración y las frecuencias e intensidad a las que aparecen las señales ya han sido estudiadas y se han realizado tablas (Figura 2.6) para identificar, con estos datos, los grupos funcionales a que pertenece, facilitando así su interpretación.

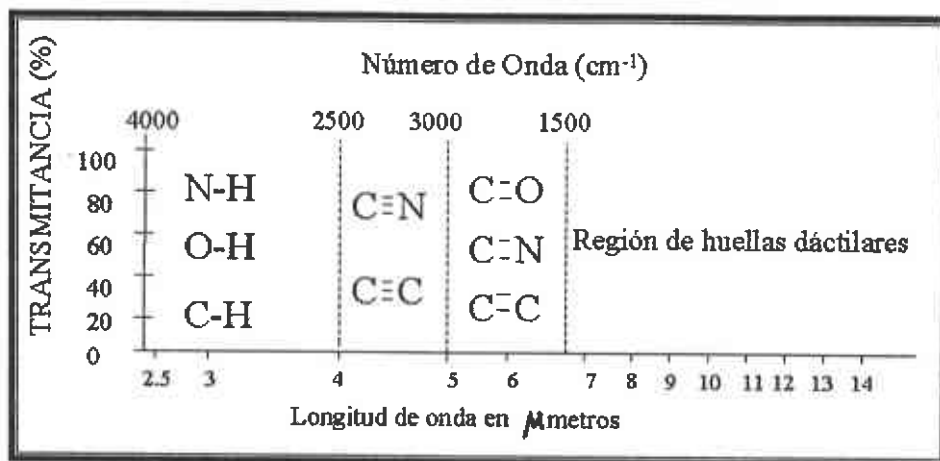


Figura 2.6. Espectro de infrarrojo dividido en zonas según el tipo vibración pertenecientes a enlaces entre diversos átomos que corresponden a grupos funcionales. Útil en la interpretación de espectros.

En el análisis de los alcanos las señales de interés son las presentes alrededor de  $3000\text{ cm}^{-1}$  pertenecientes a hidrocarburos saturados y las que se encuentran en alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$  que indican la presencia de grupos carbonilo presentes en los ésteres y aldehídos.

## 2.7. PURIFICACIÓN DE ALCANOS EN CERA CUTICULAR.

La determinación de constituyentes de la cera de las plantas comenzó con evidencias más sólidas en 1930 en los trabajos de Chibnall y sus colaboradores donde se aislaron algunos de sus compuestos usando cristalización fraccionada y se determinaron por puntos de fusión y rayos X<sup>2</sup>. Posteriormente Eglinton en 1962<sup>9</sup> realiza un análisis quimiotaxonómico de varias especies en donde cuantifica la cantidad de diversos alcanos presentes en sus muestras. El procedimiento usado para extraer los alcanos de la cera se realizó sumergiendo las hojas en tres fracciones sucesivas de cloroformo. A estas fracciones se les realizó una saponificación y posterior extracción con hexano para después realizar el análisis por cromatografía de gases. La saponificación se omitió en

dos de sus muestras dando resultados similares que con aquellas saponificadas. Para 1976 Tulloch<sup>26</sup> y Kolattukudy<sup>15</sup> realizan estudios químicos y bioquímicos de la cera cuticular y continúan usando esta técnica para aislar e identificar los componentes de la cera de algunas especies, y en este caso encuentran que no en todas las especies los alcanos son mayoritarios. A partir de la publicación realizada por Mayes y Lamb en 1984<sup>19</sup>, donde se propone usar n-alcenos como marcadores fecales y donde resulta que su recuperación en heces es muy alta, surge un trabajo por parte de los mismos autores<sup>19</sup> para usar estos marcadores en el cálculo de la producción fecal a partir de la proporción de alcanos naturales y dosificados en las heces, así como de una estimación directa del consumo sin la necesidad de usar los cálculos de digestibilidad. De esta forma se establece la técnica de purificación de alcanos para su análisis por cromatografía de gases, quedando de la siguiente forma<sup>19</sup>:

- a) Extracción soxhlet 6 horas
- b) Saponificación con KOH toda la noche ( Aproximadamente 16 horas)
- c) Extracción líquido-líquido
- d) Evaporación a sequedad
- e) Redisolución
- f) Purificación en columna de gel de sílice
- g) Análisis por cromatografía de gases

Todo el proceso se realiza usando hexano como disolvente.

La extracción consiste en pasar un soluto de una fase a otra, y es la primera parte del proceso, Consiste en colocar la muestra pulverizada en un disolvente orgánico como el hexano en un sistema soxhlet, en esta etapa todos los constituyentes de la cera cuticular pasan de la fase sólida, sobre los tejidos, a la fase orgánica.

Posteriormente se realiza la saponificación, este término proviene del proceso de hidrólisis de ésteres de la grasa animal para la formación de jabón y consiste en colocar

grasa animal en un medio básico y someterla a calentamiento. La reacción principal que ocurre es la siguiente:



La reacción de saponificación también se puede realizar con los ésteres de las ceras vegetales, obteniendo el mismo resultado. Cuando se realiza esta reacción con una cera vegetal todos los grupos éster pertenecientes a diversas moléculas generan un alcohol y la sal del ácido carboxílico correspondiente, los cuales son solubles en agua e insolubles en medios orgánicos, a diferencia de los ésteres<sup>20</sup>. El objetivo de esta reacción en este proceso es el separar los ésteres de los alcanos, puesto que en la cera existen ésteres y alcanos del mismo número de átomos de carbono con propiedades similares haciendo más complicada su separación.

Esta diferencia en la solubilidad se aprovecha para realizar otra extracción, en este caso líquido-líquido, donde al agregar n-heptano o hexano al medio de saponificación se forman dos fases inmiscibles, una formada por el hexano y otra por el medio básico acuoso. En esta condición los alcanos se extraen de la fase acuosa a la orgánica junto con algunos alcoholes y ácidos de alto masa molecular, y los alcoholes y ácidos de bajo masa molecular quedan solubles en la fase acuosa.

Después de la extracción se evapora el disolvente a sequedad, ya que se pensaba que la presencia del agua en la fase orgánica aunque fuera muy poca podría intervenir y afectar el resto de los pasos de purificación.<sup>8</sup>

El extracto se disuelve en hexano y se pasa por una columna de gel de sílice, en la cual se quedan el resto de los compuestos extraídos con hexano y que no son hidrocarburos. Se recolecta la fracción con los alcanos obtenidos. Y el disolvente se evapora a sequedad y se disuelve en una cantidad más pequeña con el objetivo de



concentrarla. Después esta solución ya se puede inyectar en el cromatógrafo de gases para su análisis y estos resultados se usan para el cálculo de consumo.

Los experimentos realizados probaron que este método de cálculo de consumo de forraje daba resultados con mucha exactitud, lo que lo convirtió en un método que cada vez se usaba más. Y esto hizo necesario disminuir tanto el tiempo de purificación como el de análisis.

El análisis por cromatografía de gases se optimizó con el uso de columnas capilares en lugar de empacadas. Mientras, la técnica de purificación seguía siendo muy tardada, además de que variaba entre investigadores. En 1991 Vulich<sup>30</sup> estudia y comprueba la precisión y exactitud de los cálculos de consumo usando n-alcamos, realizando además una modificación significativa mediante la supresión de la primera extracción sólido-líquido y realizando la saponificación directa de la muestra durante 4.5 horas y que antes se realizaba toda la noche. Ya en 1995 Vulich y colaboradores<sup>31</sup>, con el objetivo de disminuir el costo y la carga de trabajo por análisis, realizaron estudios en donde se evaluaban parámetros como el cambio de disolvente, de hexano a n-heptano, la necesidad de evaporar a sequedad después de cada proceso, reducción del volumen de disolvente usado, comparación de tiempos de saponificación por toda la noche y 4.5 horas. Los estudios resultaron en las siguientes modificaciones: cambio de disolvente de hexano a n-heptano, por ser menos volátil y tóxico, eliminación de las evaporaciones a sequedad, disminución de la cantidad de muestra a analizar, variaciones en las proporciones de agua-n-heptano en la extracción líquido-líquido, eliminación de la extracción en soxhlet y saponificación directa de la muestra con resultados similares para 4.5 horas o mayor tiempo.

Aunque la precisión y exactitud de la técnica fueron probadas<sup>30</sup> aún existían factores que afectaban al cálculo final de consumo de forraje, lo que llevo a realizar más investigación respecto a los factores que afectan las diferentes etapas del manejo de muestras, desde la recolección, transporte y conservación<sup>34</sup>, hasta los factores que

podrían afectar la recuperación de alcanos en las muestras durante el proceso de análisis. A la fecha se han realizado muchas variaciones a la purificación con el objetivo de hacerla más precisa, y en sacrificio del tiempo, costo y carga de trabajo. Estas modificaciones corresponden en su gran mayoría a investigaciones realizadas por Dove y Mayes<sup>8</sup>.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos propuestos, el trabajo se dividió en la siguiente forma:

#### *Fase de campo*

Recolección de la muestra: En esta fase se describe tanto la forma en que se recolectó la muestra, como el lugar y sus características.

#### *Fase de laboratorio*

Preparación de la muestra: Se describe la forma en que la muestra fue preparada para su análisis así como las diferentes etapas de modificación de la técnica.

Análisis de la muestra: Se describe la realización del análisis por cromatografía de gases y espectrometría de infrarrojo para cada muestra, además de la forma en que se realizaron los cálculos y se analizaron los resultados.

#### 3.1 FASE DE CAMPO

##### 3.1.1 Selección de la muestra.

Existe una gran variedad de pastos que pueden usarse para realizar este estudio, pero entre ellos, las gramíneas y leguminosas son de los forrajes más usados en México para alimentación de ganado. El ryegrass es una gramínea muy común en los pastos mexicanos y ya se han realizado estudios de esta planta en México, por esta razón se decidió efectuar el estudio del método de Mayes sobre esta planta.

##### 3.1.2 Recolección.

Para estos experimentos se usó una muestra de ryegrass proveniente del rancho San Francisco en Tulancingo, Hidalgo, con una localización geográfica de 20° 05' 01''

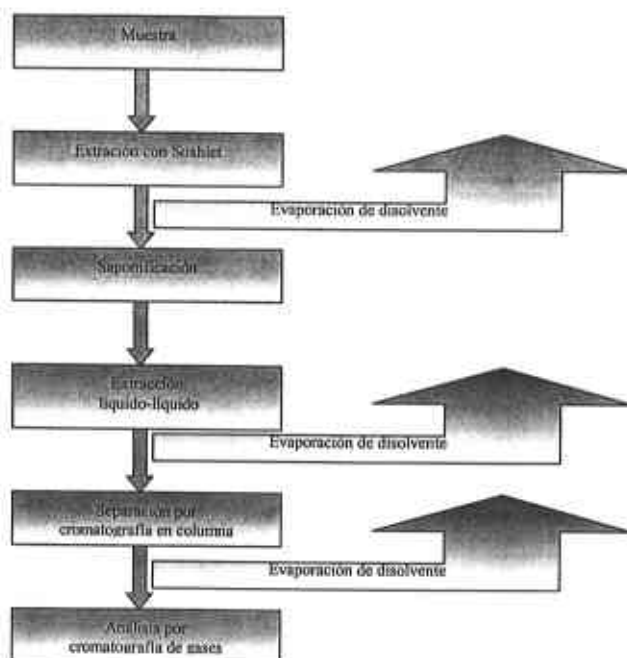
de latitud norte; 0° 02' 19" de latitud este y 98° 21' 59" de latitud oeste del meridiano de Greenwich; a una altura de 2,180 metros sobre el nivel del mar y con un clima templado , semiseco y semifrío, (también llamado Cw) con una temperatura anual promedio de 18°C y una precipitación pluvial anual promedio de 1,600 mm. La muestra se tomó al azar, el corte se realizó con tijeras a 5 cm de la base de la planta que tenía 35 días de rebrote, la muestra incluía hojas y tallo. Esta muestra se empacó en varias bolsas de plástico perforadas que se sumergieron en nitrógeno líquido. Posteriormente la muestra se liofilizó, se pulverizó y se tamizó por malla adecuada hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm . De esta muestra se tomaron 0.5 g para cada ensayo.

### 3.2 FASE DE LABORATORIO

#### 3.2.1 Revisión de la técnica de Mayes

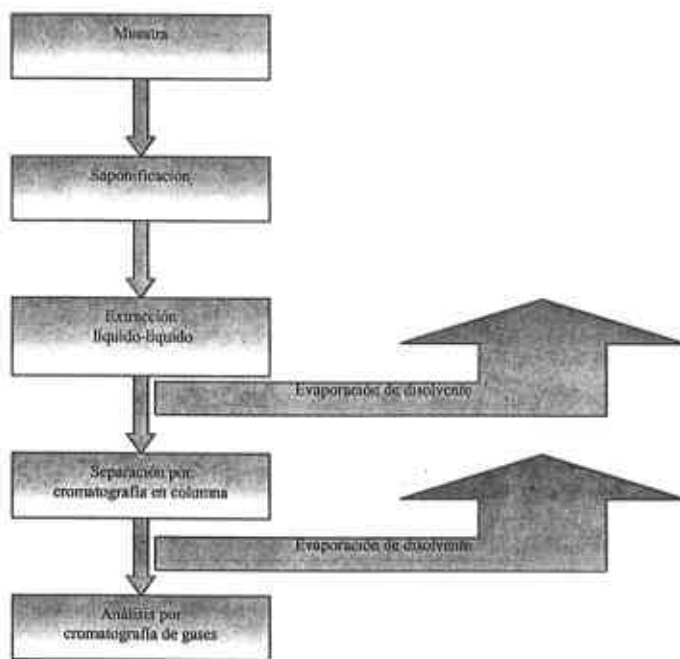
En el artículo de 1986 <sup>(19)</sup> se estableció el siguiente esquema de trabajo para la preparación de las muestras en la determinación de alcanos en ceras de forrajes.

Cuadro 3.1 Esquema del procedimiento de determinación de alcanos según la técnica de Mayes



Después esta técnica fue modificada por Mayes en colaboración con Dove<sup>6</sup>, generando la principal técnica usada, a la que algunos autores se refieren como la técnica modificada de Mayes. El esquema general de ésta técnica se muestra a continuación.

Cuadro 3.2 Esquema del procedimiento de determinación de alcanos según la técnica modificada de



Mayes.

En esta tesis, el estudio se realizó sobre la técnica ya modificada, que para fines prácticos de aquí en adelante se nombrará como técnica de Mayes, puesto que es la técnica que en realidad se usa y en la cual se consideraron las siguientes etapas como susceptibles de estudio:

- a) Etapa de saponificación
- b) Etapa de extracción líquido-líquido

c) Etapa de separación por cromatografía en columna

### 3.2.2 Técnica de Mayes

Esta técnica consiste en la saponificación de una muestra pulverizada de pasto, seguida de una extracción líquido-líquido, usando como disolvente n-heptano; evaporación del disolvente en rotavapor, redisolución del residuo y separación de los alcanos del resto de los componentes en columna cromatográfica con gel de sílice, usando n-heptano como eluyente, para después volver a evaporar la fracción recolectada y proceder a su análisis por cromatografía de gases.

Para ésta técnica se usó como estándar interno una solución de n-C<sub>34</sub> y una solución de KOH 1 M para la saponificación. Ver anexo

### 3.2.3 Etapa de saponificación

Dentro de las modificaciones que otros autores han realizado a la técnica de Mayes, se observa que el tiempo de saponificación varía de 3, 4 o hasta doce horas, sin un aparente cambio en los resultados, y respecto a tiempos menores de saponificación no se encontraron reportados cambios para esta técnica. Considerando esto, se pensó en disminuir el tiempo de saponificación. Para esto se realizaron varios experimentos en los cuales se varió el tiempo de saponificación desde 4, 3, 2 y 1 horas, además de una saponificación a tiempo cero con el objetivo de observar el comportamiento general. En esta última la muestra se preparó para saponificación, pero se extrajo inmediatamente, con el objetivo de observar si es necesaria la saponificación.

En estos ensayos como en la técnica de Mayes se usó el mismo estándar interno y la solución de KOH 1 M, sólo se modificó el tiempo de saponificación. Se realizaron cinco repeticiones por cada tiempo.

El procedimiento para el estudio de esta etapa quedó de la siguiente forma: Saponificación de la muestra (0, 1, 2, 3 o 4 horas), extracción líquido-líquido con n-heptano, concentración del extracto obtenido, separación de extracto en columna cromatográfica con gel de sílice usando n-heptano como eluyente, concentración de la fracción obtenida y análisis del concentrado. El procedimiento se encuentra descrito en el Anexo

#### 3.2.4. Etapa de extracción

En esta etapa se propuso omitir la saponificación de la muestra.

El siguiente paso es la extracción, que se realiza en la técnica de Mayes, la cual es líquido-líquido y donde una fase es la solución de KOH etanólico y la otra fase es el n-heptano. Se sabe que la cera cuticular está en forma de cristales que se encuentran sobre la pared celular de la planta y se ha observado que en este tipo de extracción el contacto entre la parte sólida suspendida en el etanol y la fase líquida constituida por el n-heptano es muy poca. Por esta razón se propuso realizar la extracción sólido-líquido con el objetivo de aumentar el área de contacto entre las partículas de pasto y la fase extractora que es el n-heptano, pero ésta se realiza de forma sencilla, sólo mezclando el pasto y el n-heptano.

En la técnica de Mayes la extracción líquido-líquido se realiza a temperatura ambiente, pero se sabe que los intervalos de temperatura ambiente a los que se realizan los ensayos varían mucho, dependiendo de la época del año y del lugar donde se realice, y esto afecta la solubilidad de los alcanos en n-heptano y como consecuencia la cantidad de material extraído. Para observar el efecto de la temperatura en la extracción de

alcenos, ésta se realizó a diferentes temperaturas de disolvente, probando las siguientes: 15° C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 80°C.

El procedimiento para el estudio de esta etapa quedó de la siguiente forma: Extracción sólido-líquido de la muestra con n-heptano, concentración del extracto obtenido, separación de extracto en columna cromatográfica con gel de sílice usando n-heptano como eluyente, concentración de la fracción obtenida y análisis del concentrado. El procedimiento se encuentra descrito en el Anexo.

### 3.2.5. Etapa de separación por cromatografía en columna.

Considerando que en la extracción directa puede haber presencia de ésteres y otras sustancias que pueden afectar la separación y el análisis por cromatografía de gases, se decidió aumentar la cantidad de gel de sílice en la columna de separación cromatográfica para obtener solamente los alcenos, por lo cual se realizó un ensayo con 2 g, que es la cantidad usada en la técnica de Mayes y otro con 4 g, que es el doble de la cantidad usada comúnmente. Y para comprobar la ausencia o presencia de ésteres se le realizó un análisis por espectroscopia de infrarrojo.

El procedimiento para el estudio de esta etapa quedó de la siguiente forma: extracción sólido líquido a 60 °C con n-heptano, concentración del extracto obtenido, separación de extracto en columna cromatográfica con gel de sílice (2g y 4g) usando n-heptano como eluyente (10 ml y 20 ml respectivamente), concentración de la fracción obtenida y análisis del concentrado por cromatografía de gases y espectroscopia de infrarrojo. El procedimiento se encuentra descrito en el Anexo.



### 3.2.6 Condiciones de análisis instrumental

#### 3.2.6.1 *Análisis cromatográfico*

Para el análisis de muestras se usó un cromatógrafo de gases marca HP 5890 Serie II, con un detector de ionización de flama encendido con Hidrógeno cromatográfico de pureza 99.998%, marca INFRA y con Aire extraseco INFRA y como gas acarreador o fase móvil se usó Nitrógeno cromatográfico de pureza 99.998% marca INFRA. La columna usada fue columna capilar HP-5 de 30 metros de longitud y 0.32 mm de diámetro con fase estacionaria que contenía 5% de difenil y 95% de dimetil polisiloxano y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor sobre la pared interna.

Las condiciones usadas para el cromatógrafo fueron las siguientes: Inyector 320 °C, Detector 320 °C ambas temperaturas constantes durante todo el análisis y el horno comenzó a 250 °C durante tres minutos y después tuvo un aumento de 10 °C/min hasta alcanzar los 300 °C y permaneció a esta temperatura durante 1 minuto. El tiempo total de análisis fue de 16 minutos. El flujo de gas Nitrógeno se estableció en 15 psig o 100 Kpa.

Antes de realizar el análisis de las muestras problema se requirió realizar una curva de calibración, para lo cual se tuvo que preparar seis soluciones de diferente concentración. Cada una de estas soluciones se preparó con estándares de los alcanos de interés. Los alcanos usados fueron alcanos lineales de cadena de carbonos larga que incluía del n-C<sub>20</sub> al n-C<sub>36</sub>, con excepción del alcano n-C<sub>34</sub> que fue el alcano usado como estándar interno tanto en la curva de calibración como en todas las muestras que se analizaron. El procedimiento para preparar estas soluciones se encuentra en el Anexo.

Se efectuó el análisis de cada una de las soluciones preparadas para realizar la curva de calibración inyectando una pequeña cantidad de cada solución en el cromatógrafo de gases. Esta operación se realizó por triplicado para cada solución.

Para el análisis de cada solución problema se inyectó en el cromatógrafo una pequeña cantidad de cada solución y esta operación también se realizó por triplicado. Después de cada diez muestras problema inyectadas en el cromatógrafo se inyectó una de las soluciones estándar de la curva de calibración para recalibrar el equipo

Para determinar las áreas bajo la curva de cada cromatograma se usó un integrador del programa HP 3365 Chemstations Series II.

Los cálculos para determinar las concentraciones, se realizaron en una hoja de cálculos de Excel Microsoft Office® versión 2000. Los resultados se encuentran en el capítulo 4.

### *3.2.6.2 Análisis por espectrometría de infrarrojo*

La muestra extraída se disolvió en 300  $\mu$ l de n-heptano y se colocó en una ventanilla de sulfuro de Zinc para efectuar la determinación por espectroscopia de infrarrojo (Intran-2). El aparato es un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier FT-IR Marca Nicolet, Modelo Impact 420 con un haz láser de 1mW Helio-Neón de 633 nm.

El software usado para registrar el espectrograma es el Quick IR versión 3.1 y el software usado para procesar y analizar el espectro de FT-IR es el Omnic E.S.P. versión comercial 4.1.

El espectro de infrarrojo se realizó con las siguientes condiciones: resolución de 4 58 scans Velocidad de espejo 0.6329 Apertura 1.00. IR.

### 3.3 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para obtener el perfil de alcanos mediante la técnica de Mayes se realizaron 5 repeticiones de la técnica y tres inyecciones de cada repetición, los resultados se promediaron según la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Donde:

$n$  es número de valores promediados y  
 $x$  el valor de cada lectura.

Se realizó el cálculo de la desviación estándar muestral de los datos promediados mediante la siguiente fórmula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Donde:

$X$  el valor de cada lectura.

$\bar{x}$  es el promedio de los valores y

$n$  es número de valores usados en el cálculo

Para el cálculo de la proporción entre los alcanos de mayor concentración se realizó el siguiente cálculo:

$$n-C_{31} : n-C_{28} = \frac{[n-C_{31}]}{[n-C_{28}]}$$

En la etapa de saponificación se efectuaron saponificaciones a 5 tiempos diferentes, se realizaron 5 repeticiones a cada tiempo de saponificación y cada repetición se analizó por triplicado, los resultados a cada tiempo de saponificación se promediaron y se calculó su desviación estándar usando las fórmulas descritas anteriormente.

Para el caso de la etapa de extracción, se realizaron extracciones a seis temperaturas diferentes, 5 repeticiones por cada temperatura y 3 análisis por cada repetición. Los valores obtenidos para cada temperatura se promediaron y se calculó su desviación estándar usando las fórmulas arriba descritas.

En la etapa de separación por cromatografía en columna se realizaron separaciones usando columnas con dos diferentes cantidades de gel de sílice, 5 repeticiones por cada cantidad usada y tres análisis cromatográficos por cada repetición. Los resultados de la separación en cada una de las dos columnas se promediaron y se obtuvo su desviación estándar usando las fórmulas previamente descritas.

Los alcanos más abundantes (n-C<sub>31</sub> y n-C<sub>29</sub>) son los que se usan para determinar la diferencia entre los métodos.

Al comparar los resultados entre cada modificación realizada y la técnica de Mayes se usaron los valores de proporción C<sub>31</sub>:C<sub>29</sub> de cada ensayo y el porcentaje de diferencia entre las lecturas se calculó de la siguiente forma:

$$\frac{|Modificada - Mayes|}{Mayes} \times 100 = \% \text{ Diferencia}$$

Donde

*Mayes* es la proporción n-C<sub>31</sub>: n-C<sub>29</sub> obtenida por la técnica de mayes y

*Modificada* es la proporción n-C<sub>31</sub>: n-C<sub>29</sub> obtenida al realizar alguna modificación.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 TÉCNICA DE MAYES

Se trabajó con una muestra de 0.5 g de ryegrass liofilizado y pulverizado, esta muestra se sometió a saponificación durante 4 horas y la solución obtenida se extrajo con n-heptano, el extracto obtenido se sometió a una separación por columna cromatográfica y la solución resultante se evaporó y los concentrados obtenidos se analizaron por cromatografía de gases. Se realizaron 5 repeticiones de esta técnica

De los resultados de análisis por cromatografía de gases se obtuvo el perfil de concentraciones de n-alcenos (ver gráfica 4.1), y se encontraron todos los n-alcenos en el intervalo de n-C<sub>20</sub> al n-C<sub>36</sub> (con excepción del n-C<sub>34</sub> que es el estándar interno), Estos alcanos tuvieron una gran variedad de concentraciones pero en general se dividieron en dos grupos según su concentración: el primero son los alcanos mayoritarios cuyos valores de concentración estuvieron arriba de los 200 mg / kg de Materia Seca (MS) como son C<sub>29</sub> y C<sub>31</sub> el segundo grupo son los que presentaron concentraciones menores a 200 mg / kg MS, que son el resto de los alcanos.

Grafica 4.1 Perfil de concentraciones de n-alcenos obtenidos siguiendo la técnica de Mayes.

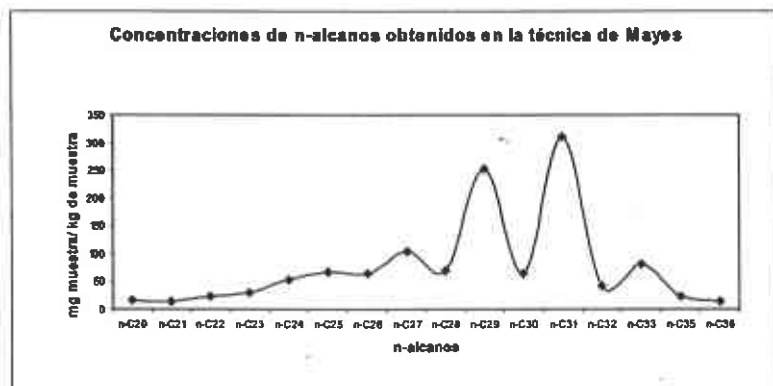


Tabla 4.1 Concentración de alcanos en ryegrass divididos en alcanos mayoritarios y alcanos de concentración menor.

Alcanos con concentraciones mayores a 100 mg de alcano / kg MS de muestra	n-C <sub>29</sub> y n-C <sub>31</sub>
Alcanos con concentraciones menores a 100 mg de alcano / kg MS de muestra	n-C <sub>20</sub> , n-C <sub>21</sub> , n-C <sub>22</sub> , n-C <sub>23</sub> , n-C <sub>24</sub> , n-C <sub>25</sub> , n-C <sub>26</sub> , n-C <sub>27</sub> , n-C <sub>28</sub> , n-C <sub>30</sub> , n-C <sub>33</sub> , n-C <sub>35</sub> , n-C <sub>36</sub> .

Los valores usados para la comparación entre métodos son el n-C<sub>29</sub> y el n-C<sub>31</sub> que son los más abundantes de todos los alcanos obtenidos y el parámetro a usar para definir la utilidad de la técnica es la relación que existe entre ellos (n-C<sub>31</sub> / n-C<sub>29</sub>), 1.23 en este caso.

Tabla 4.2 Perfil de alcanos en la cera cuticular del ryegrass

n-Alcano	Cantidad (mg)/kg	Alcano	Cantidad (mg)/kg
	MS		MS
n-C <sub>20</sub>	16	n-C <sub>28</sub>	70
n-C <sub>21</sub>	14	n-C <sub>29</sub>	252
n-C <sub>22</sub>	24	n-C <sub>30</sub>	65
n-C <sub>23</sub>	30	n-C <sub>31</sub>	310
n-C <sub>24</sub>	54	n-C <sub>32</sub>	42
n-C <sub>25</sub>	68	n-C <sub>33</sub>	82
n-C <sub>26</sub>	65	n-C <sub>35</sub>	23
n-C <sub>27</sub>	105	n-C <sub>36</sub>	14

## 4.2 ETAPA DE SAPONIFICACIÓN

En esta etapa, el ryegrass pulverizado se sometió al proceso de saponificación a diferentes tiempos, posteriormente la solución obtenida se extrajo con n-heptano y el extracto se hizo pasar por una columna cromatográfica. La fracción recolectada se concentró para ser analizada.

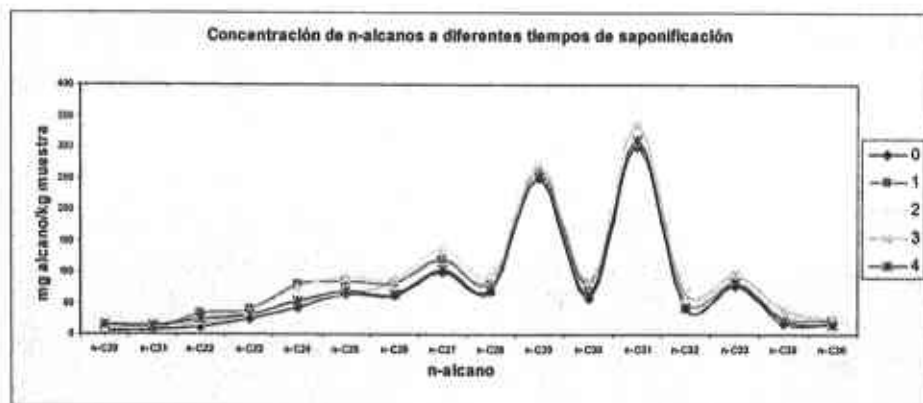
Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta etapa se muestran en la siguiente tabla. Las cantidades están expresadas en mg de alcano por kilogramo de masa seca (MS)

Tabla 4.3 Perfil de alcanos en ryegrass a diferentes tiempos de saponificación. Cantidad en mg de alcano/kg MS

Alcanos	Tiempo de saponificación en horas				
	0	1	2	3	4
n-C <sub>20</sub>	4	9	8	16	16
n-C <sub>21</sub>	8	7	15	15	14
n-C <sub>22</sub>	11	34	23	17	24
n-C <sub>23</sub>	25	41	36	30	30
n-C <sub>24</sub>	43	81	75	51	54
n-C <sub>25</sub>	65	85	90	65	68
n-C <sub>26</sub>	61	83	89	81	65
n-C <sub>27</sub>	101	120	138	122	105
n-C <sub>28</sub>	68	82	95	88	70
n-C <sub>29</sub>	249	259	278	268	252
n-C <sub>30</sub>	58	77	87	84	65
n-C <sub>31</sub>	299	306	337	334	310
n-C <sub>32</sub>	42	54	58	66	42
n-C <sub>33</sub>	77	85	97	96	82
n-C <sub>35</sub>	18	27	34	41	23
n-C <sub>36</sub>	19	22	27	23	14

En la siguiente representación gráfica del perfil de concentraciones de alcanos obtenida a diferentes tiempos de saponificación se puede observar que en todos los casos es prácticamente la misma forma de la curva

Grafica 4.2 Perfil de concentraciones de alcanos obtenidos a diferentes tiempos de saponificación de la muestra.



El perfil de alcanos se mantiene en todos los tiempos de saponificación, donde los alcanos mayoritarios para todas las condiciones son n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub>. El alcano n-C<sub>31</sub> sigue siendo el alcano con mayor concentración, seguido por el n-C<sub>29</sub> y por último el n-C<sub>27</sub>, sus concentraciones y las relaciones entre n-C<sub>31</sub> y n-C<sub>29</sub> son las siguientes:

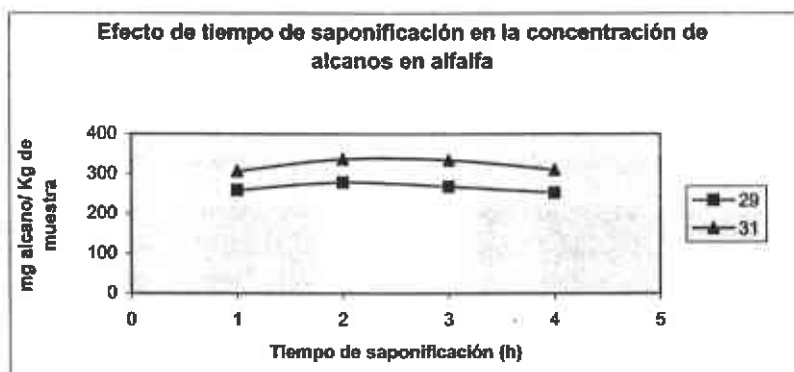


Tabla 4.4. Cantidades en mg/kg MS de los alcanos mayoritarios a diferentes tiempos de saponificación

n-Alcanos	Horas			
	1	2	3	4
n-C <sub>29</sub>	259	278	268	252
n-C <sub>31</sub>	306	337	334	310
n-C <sub>31</sub> :n-C <sub>29</sub>	1.18	1.21	1.25	1.23

No parece haber una variación en los valores de las relaciones de los alcanos mayoritarios en función del tiempo de saponificación, las concentraciones que se muestran en la siguiente gráfica (gráfica 4.3) nos muestran valores superiores a 300 mg/kg MS para el C<sub>31</sub> y valores alrededor de 260 para C<sub>29</sub> en todos los tiempos de saponificación, teniendo un valor máximo cuando ésta se realiza en dos horas.

Gráfica 4.3. Variación de la concentración de alcanos n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub> a diferentes tiempos de Saponificación.



Si se grafican las concentraciones de n-C<sub>31</sub> para todos los tiempos de saponificación, el orden de mayor a menor recuperación de alcano sería 2 horas, 3 horas, 4 horas y 1 hora.

En cuanto a las concentraciones obtenidas se puede observar que los valores para los tiempos de saponificación 1,2 y 3 son ligeramente mayores que para los obtenidos a 4 horas de saponificación. (Ver tabla 4,4)

La relación existente entre n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub> es similar para cada tiempo de saponificación los valores oscilan entre 1.18 y 1.25, siendo el valor de referencia 1.23 que corresponde a la relación n-C<sub>31</sub>/ n-C<sub>29</sub> en la técnica de Mayes. Los valores de 2, 3 y 4 horas se encuentran dentro del 1.6 % de diferencia respecto al valor de relación obtenida en la técnica de Mayes. En el caso del tiempo de saponificación de 1 hora en que la relación disminuye a 1.18, es decir 4.2 %, la variación corresponde a una disminución en la recuperación de n-C<sub>36</sub>, lo que provoca que el valor de la relación disminuya.

Con estos resultados podemos decir que usando cualquiera de estos tiempos de saponificación pueden usarse para determinar el perfil de alcanos

#### 4.3 ETAPA DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

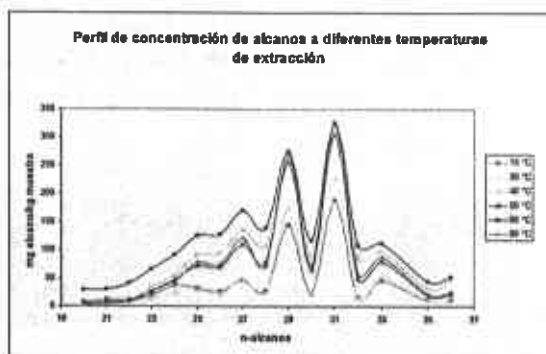
En lo que concierne a la etapa de extracción se tomaron 0.5 g de muestra liofilizada y pulverizada y se sometieron a extracción con n-heptano a diferentes temperaturas. El extracto se separó por columna cromatográfica y se concentró para su análisis. De este proceso se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 4.5. Perfil de alcanos en ryegrass, a diferentes temperaturas de extracción. Concentraciones dadas en mg alcano / kg de MS.

Alcanos	Temperatura de extracción °C					
	15	30	40	50	60	80
n-C <sub>20</sub>	8	3	3	4	29	1
n-C <sub>21</sub>	13	9	6	7	31	5
n-C <sub>22</sub>	9	5	10	11	41	8
n-C <sub>23</sub>	20	14	34	27	67	27
n-C <sub>24</sub>	37	23	56	47	92	45
n-C <sub>25</sub>	33	29	92	72	125	78
n-C <sub>26</sub>	26	22	94	70	128	75
n-C <sub>27</sub>	47	49	136	111	170	122
n-C <sub>28</sub>	28	25	108	78	139	72
n-C <sub>29</sub>	145	176	251	257	275	269
n-C <sub>30</sub>	23	26	92	66	117	73
n-C <sub>31</sub>	189	228	314	305	326	324
n-C <sub>32</sub>	16	15	86	49	108	60
n-C <sub>33</sub>	46	55	99	80	113	88
n-C <sub>35</sub>	10	11	31	19	44	22
n-C <sub>36</sub>	10	8	44	21	51	26

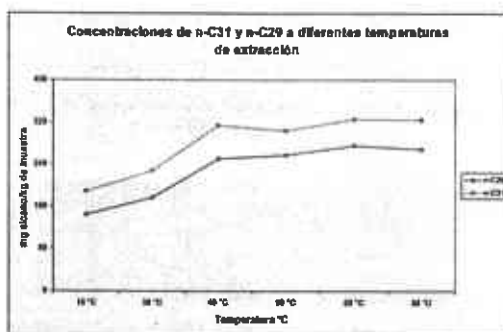
El perfil de alcanos es similar al obtenido en la reproducción de la técnica de Mayes, los valores mayoritarios son n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub>, mientras que el resto de los alcanos se obtienen en menor cantidad. El alcano con mayor concentración es el n-C<sub>31</sub> seguido de n-C<sub>29</sub>, mientras que el resto de las concentraciones se mantienen por debajo de los 200 mg/kg MS para todas las temperaturas de extracción.

Gráfica 4.4 Perfil de concentración de alcanos obtenidos a diferentes tiempos de extracción



En la gráfica se puede observar que a diferentes temperaturas de extracción los valores de concentración son diferentes. La recuperación de los n-alcenos n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub> aumenta en función de la temperatura de extracción, lo mismo sucede con el resto de los n-alcenos (ver gráfica 4.5). También se puede observar que la mayor recuperación de alcanos se presenta a 40 °C y temperaturas mayores.

Gráfica 4.5. Representación gráfica de los valores de concentración de los n-alcenos n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub> obtenidos a diferentes tiempos de extracción



La recuperación de n-C<sub>31</sub> parece tener un límite máximo de recuperación, alrededor de 320 mg/kg MS, cuando se usan temperaturas mayores a 40 °C.

Tabla 4.6. Alcanos mayoritarios del ryegrass obtenidos a diferentes temperaturas de extracción. Las concentraciones están dadas en mg de alcano / kg de MS

n-alcano	Temperatura de extracción °C					
	15 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	80 °C
n-C <sub>29</sub>	145	176	251	257	275	269
n-C <sub>31</sub>	189	228	314	305	326	324
C <sub>31</sub> :C <sub>29</sub>	1.30	1.29	1.25	1.18	1.18	1.21
% error	5.9	4.9	1.7	3.8	3.8	1.9

En cuanto a la proporción n-C<sub>31</sub>: n-C<sub>29</sub> se puede observar que los valores obtenidos en todas las temperaturas se encuentran muy cercanos al valor de proporción registrado para la técnica de Mayes (1.23), pero se puede observar que los valores obtenidos a 15 °C y 30 °C de extracción el porcentaje de variación es 5.9% y 4.9% por arriba del valor obtenido por Mayes y el valor a 40 °C es el que presenta una menor variación con sólo 1.7 %. Para el caso de los valores de proporción obtenidos a 50 °C, 60 °C y 80 °C, éstos estuvieron por debajo del valor de Mayes, 3.8 % para 50 °C y 60 °C; y 1.9 para 80 °C.

Con estos datos podemos ver que en cuanto a proporción (C<sub>31</sub>:C<sub>29</sub>) y recuperación de alcanos, la condición más parecida a la técnica de Mayes es la extracción directa a 40 °C. Aunque la mejor recuperación de los alcanos se logra a 60°C

#### 4.4 ETAPA DE SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

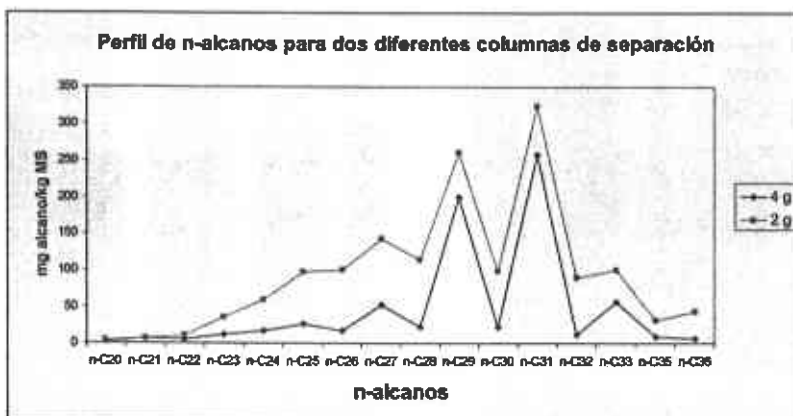
Para el caso de la separación por columna los resultados se muestran a continuación.

Tabla 4.7. Perfil de alcanos del ryegrass al variar la cantidad de gel de sílice en la columna cromatográfica. Las concentraciones están dadas en mg de alcano / kg de muestra.

Alcano	Cantidad de gel de sílice en g	
	4	2
n-C <sub>20</sub>	2	16
n-C <sub>21</sub>	6	14
n-C <sub>22</sub>	5	24
n-C <sub>23</sub>	12	30
n-C <sub>24</sub>	18	54
n-C <sub>25</sub>	26	68
n-C <sub>26</sub>	18	65
n-C <sub>27</sub>	53	105
n-C <sub>28</sub>	23	70
n-C <sub>29</sub>	200	252
n-C <sub>30</sub>	23	65
n-C <sub>31</sub>	258	310
n-C <sub>32</sub>	12	42
n-C <sub>33</sub>	57	82
n-C <sub>35</sub>	9	23
n-C <sub>36</sub>	7	14

El perfil de los alcanos es similar al obtenido por la técnica de Mayes, los alcanos mayoritarios en orden de mayor a menor concentración son n-C<sub>31</sub> y n-C<sub>29</sub>, mientras que el resto sigue siendo de concentraciones menores.

Grafica 4.6 Perfil de concentración de alcanos para columnas con diferentes cantidades de gel de sílice. Valores en mg n-alcano/ kg MS



Los valores de las concentraciones obtenidos para todos los alcanos en la columna con 4 g de gel de sílice son menores que al usar columna con 2 g. Las concentraciones son de un 20 % a un 80 % menores que en el caso de la columna a 2g.

En general esta pérdida en la concentración de alcanos se le puede atribuir a la retención de alcanos por la gran cantidad de gel de sílice usada en la columna

Tabla 4.8. Concentraciones y desviación estándar de los alcanos mayoritarios del ryegrass obtenidos al variar la cantidad de gel de sílice en la columna cromatográfica usada para separación. Las concentraciones están expresadas en mg de alcano / kg de MS.

Alcano	Cantidad de gel de sílice en g	
	4 g	2 g
n-C <sub>27</sub>	53	143
n-C <sub>29</sub>	200	261
n-C <sub>31</sub>	258	323

Tabla 4.9. Valores de la proporción existente entre n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub> para 2 y 4 g de gel de sílice usadas en la separación por columna cromatográfica y su porcentaje de error respecto a la técnica de Mayes. Las concentraciones están expresadas en mg de alcano / kg de MS.

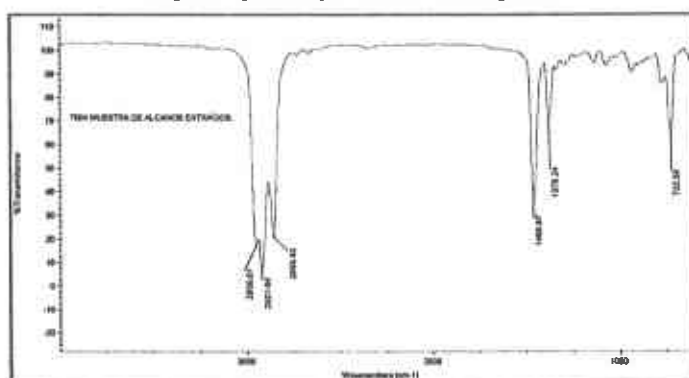
	Cantidad de gel de sílice en g	
	4 g	2 g
n-C <sub>31</sub> :n-C <sub>29</sub>	1.29	1.24
% error	5.0	0.8

En el caso de las concentraciones de los alcanos mayoritarios se puede observar un valor de aproximadamente 50 mg/kg MS menor para cada alcano usando en la columna una cantidad de gel de sílice de 4 g comparada con la columna en la que se usaron 2 g, esta disminución no representa una disminución proporcional de los alcanos, sino que son el 23 %, y 20 % para C<sub>29</sub>, y C<sub>31</sub>. Es decir en la columna con 4 gramos existe una mayor retención de alcanos, lo que resulta en un mayor gasto de disolvente, Se puede observar también que la retención para C<sub>29</sub> es similar a C<sub>31</sub>.



Un análisis por espectrometría de infrarrojo nos muestra que después de la separación por columna cromatográfica, usando columnas con 4 y 2 g de gel de sílice, no se encuentran ésteres presentes (ver figura 4.1), que es parte de la razón para el uso de la separación por cromatografía en columna.

Figura 4.1 Espectro de infrarrojo de una muestra del extracto de ryegrass usando 4 g de gel de sílice en la etapa de separación por columna cromatográfica

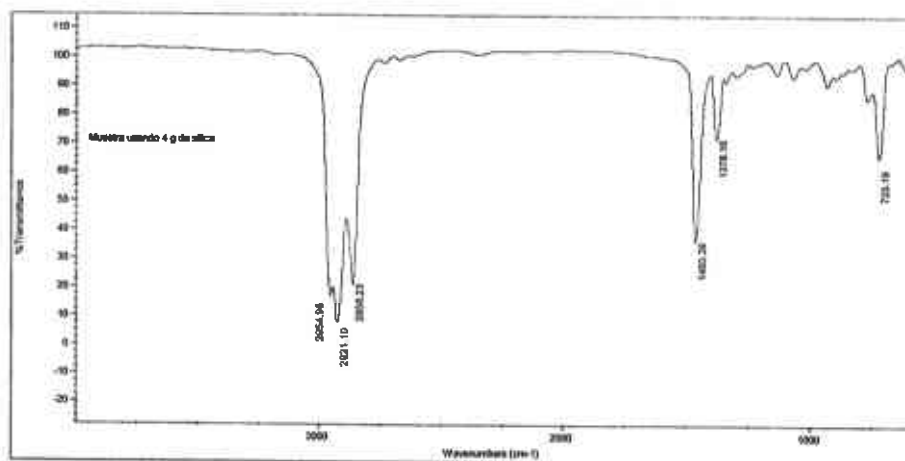


En el espectro de infrarrojo de la muestra del extracto de ryegrass cuando se usaron 2 g de gel de sílice en la columna cromatográfica se pueden observar 6 señales principales (ver tabla 4.11). La señales en  $2966\text{ cm}^{-1}$  y  $2855\text{ cm}^{-1}$  nos muestran la presencia de grupos  $-\text{CH}_3$  que son los extremos de las cadenas lineales y la banda en  $2921\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de grupos  $-\text{CH}_2-$ . No existe una señal en  $1720\text{ cm}^{-1}$  que nos indique la presencia de ésteres. Con estos datos podemos afirmar que la columna en la que se usan 2 g de gel de sílice es suficiente para separar los alcanos de otros compuestos con grupo funcional diferente. También se descarta la presencia de alcoholes o aminas por la ausencia de señales por arriba de  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Por lo que en ambos casos se considera una separación correcta de los alcanos del resto de los productos de la muestra inicial, aunque sólo en columna en la que se usan 2 g de gel de sílice resulta una recuperación aceptable.

Tabla 4.10. Señales existentes en el espectro de infrarrojo del extracto de ryegrass donde se usan 2 g de gel de sílice para la etapa de separación.

Longitud de onda	Tipo de señal
2966 $\text{cm}^{-1}$	Estrechamiento de grupos $-\text{CH}_3$
2855	Estrechamiento de grupos $-\text{CH}_3$
2921	Estrechamiento de grupos $-\text{CH}_2-$
1455	Deformación de grupos $-\text{CH}_3$
1378	Deformación de grupos $-\text{CH}_3$
722	Presencia de más de 5 grupos $-\text{CH}_2-$

Figura 4.2. Espectro de infrarrojo del extracto de ryegrass cuando se usaron 4 g de gel de sílice en la columna cromatográfica en la etapa de saponificación.



El espectro de infrarrojo de la muestra del extracto de ryegrass cuando se usaron 4 g de gel de sílice en la columna cromatográfica es similar a cuando se usaron 2 g, también se pueden observar 6 señales principales (ver tabla 4.12). La señales en 2964  $\text{cm}^{-1}$  y 2858  $\text{cm}^{-1}$  nos muestran la presencia de grupos  $-\text{CH}_3$  que son los extremos de las cadenas lineales y la banda en 2921  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de grupos  $-\text{CH}_2-$ . No

existe una señal en  $1720\text{ cm}^{-1}$  que nos indique la presencia de ésteres, también se descarta la presencia de alcoholes o aminas por la ausencia de señales por arriba de  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Se puede ver en el espectro de IR para el extracto obtenido con la columna con 2 g de gel de sílice que no es necesario tanto volumen de gel de sílice para realizar la separación.

Tabla 4.11. Señales existentes en el espectro de infrarrojo del extracto de ryegrass donde se usan 4 g de gel de sílice para la etapa de separación.

Longitud de onda	Tipo de señal
$2964\text{ cm}^{-1}$	Estrechamiento de grupos $-\text{CH}_3$
2858	Estrechamiento de grupos $-\text{CH}_3$
2921	Estrechamiento de grupos $-\text{CH}_2-$
1450	Defonnación de grupos $-\text{CH}_3$
1378	Defonnación de grupos $-\text{CH}_3$
725	Presencia de más de de 5 grupos $-\text{CH}_2-$

Como resultado de esta etapa puede considerarse que el uso de una columna con 2 g de gel de sílice es suficiente para separar los álcenos de otras impurezas presentes en la muestra y no es se necesita mas gel de sílice.

#### 4.5 TÉCNICA PROPUESTA

Integrando los resultados de cada etapa modificada de la técnica de Mayes para la preparación de la muestra, se desarrolló el siguiente procedimiento:

A una muestra de ryegrass se le realiza una extracción con n-heptano a 60 °C, se evapora el disolvente y el concentrado se hace pasar por una columna con 2 de gel de sílice, la fracción recolectada se concentra y se realiza su análisis por cromatografía de gases. (Ver Anexo para descripción detallada)

Tiempo estimado de preparación de la muestra es de 20 minutos

Por otra parte, otra muestra de ryegrass se procesó usando la técnica de Mayes y el extracto obtenido se analizó por cromatografía de gases.

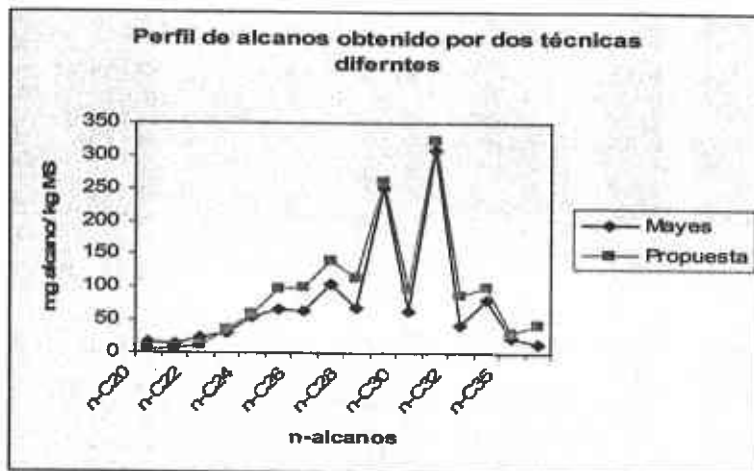
Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.12 Tabla de valores de las concentraciones de n-alcenos obtenidos en la técnica de Mayes y la técnica propuesta. Valores en mg de n-alceno/ kg MS

	TECNICAS	
	Mayes	Propuesta
n-C <sub>20</sub>	16	4
n-C <sub>21</sub>	14	6
n-C <sub>22</sub>	24	11
n-C <sub>23</sub>	30	36
n-C <sub>24</sub>	54	59
n-C <sub>25</sub>	68	97
n-C <sub>26</sub>	65	100
n-C <sub>27</sub>	105	143
n-C <sub>28</sub>	70	115
n-C <sub>29</sub>	252	261
n-C <sub>30</sub>	65	99
n-C <sub>31</sub>	310	323
n-C <sub>32</sub>	42	90
n-C <sub>33</sub>	82	100
n-C <sub>35</sub>	23	32
n-C <sub>36</sub>	14	44
C31:C29	1.23	1.24

El perfil de alcanos puede verse claramente en la siguiente gráfica:

Gráfica 4.7 Perfil de concentraciones de alcanos obtenidos por dos técnicas diferentes. Las concentraciones están expresadas en mg de n-alceno/ kg de MS



Se puede observar que el perfil de alcanos obtenido en ambas técnicas es muy parecido. Los alcanos mayoritarios tanto en la técnica de Mayes como en la técnica propuesta son el n-C<sub>31</sub> y el n-C<sub>29</sub>. El alcano más concentrado es n-C<sub>31</sub> seguido de n-C<sub>29</sub>. El resto de los alcanos en ambas técnicas se encuentran en cantidades menores a los 200 mg/kg MS. Sin embargo se puede notar que existe una recuperación mayor de alcanos en la técnica propuesta que en la técnica de Mayes en los siguientes porcentajes, 3% para n-C<sub>29</sub> y 4 % para n-C<sub>31</sub>.

Tabla 4.13. Comparación de la concentración de los alcanos mayoritarios entre la técnica de Mayes y la propuesta de modificación. Los valores están dados en mg de alcano / kg de MS.

n-Alcanos	Técnicas	
	Mayes	Propuesta
n-C <sub>29</sub>	252	261
D.E.	23	28
n-C <sub>31</sub>	310	323
D.E.	30	24
n-C <sub>31</sub> :n-C <sub>29</sub>	1.23	1.24

La proporción entre C<sub>29</sub>:C<sub>31</sub> resulta similar en ambos casos con una diferencia de un 0.8%.

Para este caso y con el objetivo de poner las bases para un trabajo futuro se obtuvieron las desviaciones estándar de cada alcano para ambas técnicas, sus valores resultaron, en ambos casos, ser muy altos, por lo que aunque parecidos, ambas técnicas deben ser aún mucho más corregidas

Como resumen puede considerarse que la técnica propuesta representa una mejora al compararla con la técnica tradicional de Mayes, tanto en el ahorro de tiempo y reactivos como en la sencillez de la técnica.

## 5. CONCLUSIONES

Se pudo obtener el perfil de alcanos usando la técnica de Mayes. Los mayoritarios obtenidos fueron n-C<sub>27</sub>, n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub>.

Se demuestra que en la etapa de saponificación no existe una variación en la concentración de los alcanos mayoritarios del ryegrass en función del tiempo que se saponifique la muestra y que el perfil general de los alcanos se conserva.

En la etapa de extracción se encontró que la concentración obtenida de los alcanos del ryegrass, es función de la temperatura a la que se encuentre el disolvente al momento de la extracción, a mayor temperatura mayor recuperación de alcanos, pero no hay variación en el perfil general de las concentraciones siendo los mayoritarios los alcanos n-C<sub>27</sub>, n-C<sub>29</sub> y n-C<sub>31</sub>.

En la separación por columna cromatográfica, se encontró que la columna en la que se usan 2 g de gel de sílice es suficiente para retener tanto micropartículas del pasto como ésteres, alcoholes y otras impurezas que puedan afectar los resultados durante el análisis. Se observó que al usar una mayor cantidad de gel de sílice la recuperación final de los alcanos disminuye drásticamente y el volumen de disolvente a usar aumenta, además de que no es necesario usar una cantidad tan grande de gel de sílice para realizar la separación.

En conclusión, de estos resultados se logró proponer una técnica de menor tiempo, menor costo, por la disminución en el uso de reactivos y disolventes, y con la cual se obtuvo una mayor recuperación de los alcanos comparada con la técnica de Mayes.



Con este trabajo se obtuvieron los siguientes logros: suprimir la saponificación en el proceso, ahorrando tiempo; Se cambió la extracción líquido-líquido por una extracción sólido-líquido y un aumento de temperatura a 60 °C, que resulta en una mejor recuperación de los alcanos. En cuanto a la etapa de separación cromatográfica, las modificaciones propuestas no dieron buenos resultados, por lo cual esta etapa quedó como la original. Por último se logró proponer una nueva metodología que emplea solamente 20 minutos de trabajo comparada con las 4 horas empleadas en la técnica de Mayes y al disminuir las cantidades de disolventes y reactivos es de más bajo costo y con resultados similares a la técnica de Mayes para la cuantificación de alcanos en la cera cuticular de plantas, aplicable al ryegrass.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Chacon, E.A., Stobs, T.H., and Sandland, R.L. Estimation of herbage consumption grazing cattle using measurements of eating behaviors. *J. Br. Grassid Soc.* 31, 81-87. 1976.
2. Chibnall, A.C. The constitution of the primary alcohols, fatty acids and paraffins present in plant and insect waxes. *Biochemistry*, 28, pp 2189-2208, 1934.
3. Dove, H. Using the n-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixtures. *Australian Journal Agricultural Research.* 43, pp 1711-1724, 1992.
4. Dove, H. The nutrition of grazing ewes during pregnancy and lactation: a comparison of alkane-based and chromium/*in-vitro*-based estimated of herbage intake. *Australian Journal Agricultural Research.* 51, pp 765-777, 2000.
5. Dove, H. and Mayes, R. W. Effects of species, plant part, and plant age on the n-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. *Australian Journal Agricultural Research.* 47, pp 1333-1347, 1996.
6. Dove, H. and Mayes, R. W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of nutrition of herbivores: a review. *Australian Journal Agricultural Research.* 42, pp 913-952, 1991.
7. Dove, H. and Mayes, R. W. Plant Wax Components: A New Approach to Estimating Intake and Diet Composition in Herbivores. *Critical Review: American Institute of Nutrition* 1996.
8. Dove, H. and Mayes, R. W. Satellite meeting: Wild and Domestic Herbivore Diet Characterization. *Macaulay Land Use Research Institute.* Pp. 0-39, 2003.
9. Eglinton, G. Hydrocarbon constituents of the wax coatings of plant leaves; a taxonomic survey. *Phytochemistry*, 1, pp. 89-102, 1962.
10. Forbes, J. M. The intake of fresh and conserved Grass. *Voluntary Food Intake and Diet Selection in Farm Animals; Cab International*, pp. 362-367. 1995.

11. Gedir, J.V. And Hudson, R.J. Seasonal intake determination in reproductive Wapiti Hinds using n-alkane markers. *Canadian Journal of Animal Science*, 80, pp. 137-144, 2000.
12. Harris Daniel C., Análisis Químico Cuantitativo, 2° Edición en Español, Ed. Reverté 2001 pp 655-693
13. Jung, H. G. Forage cell wall structure and digestibility. *Symposium on Forage Cell Wall Structure and Digestibility* pp 1-32. 1993.
14. Kobl, A.R. & Luckey, T.D. Nutrition abstract review 42: 813-45. 1972.
15. Kolattukudy, P. E. Biochemistry of plant waxes; Chemistry and Biochemistry of natural waxes. *Elsevier*, 1976.
16. Malossini, Franco. Comparison of n-alkanes and chromium oxide methods for estimating herbage intake by grazing dairy cows. *Animal Feed Science Technology* 61. pp. 155-165, 1996.
17. Malossini, Franco. n-Alkane Content of Some Forages. *Journal Science Food Agriculture*. 53, pp. 405-409, 1990.
18. Martin, J. T. The cuticle in action. Physiological functions. *The cuticle of plants*, pp. 192-221, 1970.
19. Mayes, R. W. and Lamb C.S. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 107, pp. 161-170, 1986. The possible use of n-alkanes in herbage as indigestible faecal markers. *Proceedings of The Nutrition Society* 43, 39A. 1984.
20. McMurry, John, Química orgánica, Grupo Editorial Iberoamérica. Pp 1-32, 791, 1059.
21. Patai Saul, Banthorpe Derek. Natural occurrence, biochemistry and toxicology. *The chemistry of alkanes and cicloalkanes*, John Wiley & sons, 19, pp. 895-926, 1992.
22. Penning, P.D., and Hooper, G.E. An evaluation of the use of short-term weight changes in grazing sheep for estimating herbage intake. *Grass and Forage Sci.* 40, 79-84. 1985.

23. **Raymond, W.F., and Mison, D.J.** The use of chromic oxide for estimating the faecal production of grazing animals. *J. Br. Grassid Soc.* 10, 282-296. 1955.
24. **Smith Philip M. and Kolattukudy, P. E.** The chemotaxonomy of plants. *Editorial Edward Arnold.* 1, pp. 0-76, 1976.
25. **Stumpf, P. K.** Cutin suberin and waxes. *The Biochemistry of plants*, 4, pp 571-645, 1980.
26. **Tulloch, A. P.** Chemistry of waxes of higher plants. *Chemistry and Biochemistry of natural waxes. Elsevier*, pp. 235-287, 1976.
27. **Thilley, J.M.A., and Terry R.A.** A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassid Soc.* 18, 104-11. 1963
28. **Valiente, O. L.** Validation of the n-alkane technique to estimate intake, digestibility, and diet composition in sheep consuming mixed grain: Rouhage diets. *Australian Journal Agricultural Research*, 54, pp. 693-702, 2003.
29. **Vogel's; Brian, S.** Furniss, Textbook of Practical Organic Chemistry 5<sup>th</sup> Edition, Longman Scientific & Technical John Wiley & Sons NY pp 691, 1071, 1139, 1266.
30. **Vulich, S. A.** Use of n-Alkanes for the estimation of herbage intake in sheep: accuracy and precision of estimates. *Journal of Agricultural Science*, 116, pp. 319-323, 1991.
31. **Vulich, S. A.** Modification of the analytical procedures for the determination of herbage and faecal n-alkanes used in the estimation of herbage intake. *Journal of agricultural Science*, 124, pp. 71-77, 1995.
32. **Willard Hobart H.** Métodos Instrumentales de Análisis; Versión en español de la 7<sup>o</sup> edición en inglés, Grupo Editorial Iberoamérica pp. 31-34, 95-98, 104-105, 505-568.
33. **Walters, R.J.K. and Evans, E. M.** Evaluation of a sward sampling technique for estimating herbage intake by grazing sheep. *J. Br Grassid Soc.* 34, 37-44. 1979.
34. **Reyes Reyes Rocío** Efecto de cinco métodos de conservación sobre el perfil de n-alcenos en tres gramíneas y dos leguminosas de clima templado. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM 2004

## 7. ANEXO

### 7.1 SOLUCIONES PREPARADAS

#### 7.1.1 Soluciones de curva de calibración

##### 7.1.1.1 Solución Madre de estándares n-C<sub>20</sub>a al n-C<sub>36</sub>

Para preparar 10 mL de una solución que contenga los compuestos n-C<sub>20</sub> al n-C<sub>36</sub> en una concentración de  $5 \times 10^{-3}$  M se requiere calcular la masa de cada uno de ellos.

El ejemplo de este cálculo para el alcano n-C<sub>20</sub> se muestra a continuación:

Datos:

Masa Molecular (MM n-C<sub>20</sub>) de n-C<sub>20</sub> = 282 g/mol

Volumen a prepara (Vol)<sub>r</sub> = 0.01 L

Concentración deseada (Conc) =  $5 \times 10^{-3}$ .

La fórmula a usar es la siguiente:

$$(MM \text{ n-C}_{20})(Vol)(Conc) = \text{g de n-C}_{20}$$

el valor resultante es el siguiente:

$(5 \times 10^{-3} \text{ mol/L})(0.010 \text{ L})(282 \text{ g/mol}) = 0.0141 \text{ g de n-C}_{20}$  que es equivalente a 14.1 mg.

Se realizó este cálculo para obtener la cantidad de cada n-alceno a pesar, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

n-Alcanos	Masa molecular g/mol	Concentración mol/l	Volumen final l	masa a pesar G
n-C <sub>20</sub>	282	0.005	0.01	0.0141
n-C <sub>21</sub>	296	0.005	0.01	0.0148
n-C <sub>22</sub>	310	0.005	0.01	0.0155
n-C <sub>23</sub>	324	0.005	0.01	0.0162
n-C <sub>24</sub>	338	0.005	0.01	0.0169
n-C <sub>25</sub>	352	0.005	0.01	0.0176
n-C <sub>26</sub>	366	0.005	0.01	0.0183
n-C <sub>27</sub>	380	0.005	0.01	0.0190
n-C <sub>28</sub>	394	0.005	0.01	0.0197
n-C <sub>29</sub>	408	0.005	0.01	0.0204
n-C <sub>30</sub>	422	0.005	0.01	0.0211
n-C <sub>31</sub>	436	0.005	0.01	0.0218
n-C <sub>32</sub>	450	0.005	0.01	0.0225
n-C <sub>33</sub>	464	0.005	0.01	0.0232
n-C <sub>35</sub>	492	0.005	0.01	0.0246
n-C <sub>36</sub>	506	0.005	0.01	0.0253

La masa calculada se pesa y coloca en un matraz de 10 mL. Disolver con un poco de n-heptano, nota: la mezcla de alcanos se disuelve muy despacio, se recomienda agitar continuamente ya disuelto se lleva al aforo con n-heptano.

#### 7.1.1.2 Solución de estándar interno para la curva de calibración

Se requiere además estándar interno de la misma concentración final de las muestras y se obtiene de la misma forma que la descrita en la sección 7.1.1.1.

Para preparar 25 mL de una solución de n-C<sub>34</sub> con una concentración  $3 \times 10^{-4}$  M.

$$(3 \times 10^{-4} \text{ M})(0.025 \text{ l})(478 \text{ g/mol}) = 0.0036 \text{ g}$$

El procedimiento para preparar la solución es el siguiente:

En un matraz de 25 mL aforado se colocan 0.0036 g de n-C<sub>34</sub> junto con n-heptano suficiente para disolverlo, una vez disuelto se lleva al aforo con n-heptano.

#### 7.1.1.3 Preparación de las soluciones de la curva de calibración

Con la solución madre de estándares y la solución de estándar interno se preparan las soluciones finales de la curva de calibración de la siguiente forma:

##### Procedimiento

Colocar 1 mL de la solución de Estándar interno en cada uno de los 5 matraces aforados de 5 mL. Etiquetar con los números de 1 al 5.

Agregar las cantidades de estándares y de la solución madre, que se muestran en la siguiente tabla, a cada matraz y posteriormente se lleva al aforo.

En la siguiente tabla se muestran las soluciones de la curva de calibración, también se muestra la cantidad en mL de las soluciones de Estandar interno y Solución madre que se deben agregar a cada solución final de la curva , así como las concentraciones finales al realizar la dilución.

Solución #	Cantidad de Estándar interno (mL)	Cantidad Solución madre (mL)	de Concentración final estándar interno (M)	Concentración de final de Estándares C <sub>20</sub> al C <sub>36</sub> (M)
1	1	0.0025	0.001	0.000025
2	1	0.05	0.001	0.000050
3	1	0.25	0.001	0.000250
4	1	0.5	0.001	0.000500
5	1	2.5	0.001	0.002500

El material usado para la preparación de las soluciones para obtener la curva de calibración se muestra en la siguiente tabla:

#### 7.1.2 Soluciones usadas en las diversas etapas de estudio

##### 7.1.2.1 Preparación de la solución de KOH 1 M

Para preparar 400 mL de la solución de etanol 1:1 se miden 200 mL de alcohol y se agregan en un matraz de 500 mL, se agregan 200 mL de agua y se etiqueta como solución etanol agua 1:1



Para preparar 250 ml de la solución de KOH en concentración 1 M se pesan 14 g de KOH y se disuelven con la solución de etanol-agua en un matraz aforado de 250 ml. Se lleva al aforo con la misma solución alcohólica.

Tabla de material y reactivos usados

<i>Material</i>	<i>Reactivos</i>
2 Vasos de precipitados graduados de 250 mL	Etanol 96 % grado R.A. Merck
Vaso de precipitados graduado de 500 mL	Agua destilada
Matraz aforado de 250 mL	KOH J.T Baker
Espátula	
Vidrio de reloj	
Balanza analítica	
Agitador de vidrio	

#### 7.1.2.2 Preparación de la solución de estándar interno

Para preparar 50 mL de una solución de  $n\text{-C}_{34}$  que tenga una concentración de 0.0003 M. Se pesan 0.00717 g de  $n\text{-C}_{34}$  y se disuelven con  $n\text{-heptano}$  en un matraz aforado de 50 mL. Se lleva al aforo y se etiqueta.

## 7.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

### 7.2.1 Procedimiento para tratamiento de la muestra con la técnica de Mayes

En un matraz bola de 50 mL se colocan 0.5 g del pasto pulverizado y se le agrega 1 mL de la solución de estándar interno y 5 mL de la solución de KOH 1 M. Se le adapta un refrigerante en posición de reflujo y se calienta en un baño de temperatura constante a 90°C durante 4 horas.

Después de terminada la saponificación se deja enfriar el matraz y se agrega 10 mL de n-heptano y 2 mL de agua, se agita y se dejan separar las dos fases, la fase orgánica formada por el n-heptano en la parte superior se traslada con una pipeta Pasteur a otro matraz de 50 mL, esta operación se repite 2 veces más, para completar 3 extracciones. Este extracto se evapora en un rotavapor y ya seco se disuelve con aproximadamente 1 mL de n-heptano.

Este extracto disuelto se hace pasar por una columna cromatográfica cilíndrica de 10 cm de largo X 1.5 cm de diámetro que contiene 2 g de gel de sílice en n-heptano, este extracto se eluye con 10 mL de n-heptano y lo recuperado se evapora a sequedad, se disuelve con 0.3 mL de n-heptano y se transfiere a un vial para su posterior análisis.

#### 7.2.2 Procedimiento para saponificación a diferentes temperaturas

En un matraz bola de 50 mL se colocan 0.5 g del pasto pulverizado, y se le agrega 1 mL de la solución de estándar interno y 5 mL de la solución de KOH en etanol al 50%. Se le adapta un refrigerante en posición de reflujo y se calienta en un baño de temperatura constante a 90°C durante 1,2,3 o 4 horas según el ensayo.

Después de terminada la saponificación se deja enfriar el matraz y se agregan 10 mL de n-heptano y 2 mL de agua, se agita y se dejan separar las dos fases, la fase orgánica formada por el n-heptano en la parte superior se traslada con una pipeta Pasteur a otro matraz de 50 mL, esta operación se repite 2 veces más, para completar 3 extracciones. Este extracto se evapora en un rotavapor y ya seco se disuelve con aproximadamente 1 mL de n-heptano.

Este concentrado se hace pasar por una columna cromatográfica cilíndrica de 10 cm de largo X 1.5 cm de diámetro que contiene 2 g de gel de sílice en n-heptano, se eluye

con 10 mL de n-heptano y lo que se recupera se evapora a sequedad y se disuelve con 0.3 mL de n-heptano para transferirlo a un vial para su posterior análisis.

#### 7.2.1 Procedimiento para extracción directa

En un tubo de ensaye de 100 mm X 160mm se colocaron 0.5 g de muestra y se les agregó 1 mL de la solución de estándar interno. En otro tubo de ensaye de 100 mm X 160 mm se colocaron 10 mL de n-heptano. Ambos tubos se introdujeron en un baño de temperatura constante, hasta alcanzar la temperatura deseada, que depende del ensayo. Después de 5 minutos en el baño se agregó el n-heptano al tubo con la muestra y se agitó durante 1 minuto. El tubo con el n-heptano y la muestra se retiró del baño de temperatura constante y se le introdujo un algodón hasta tocar la muestra sólida, a continuación se decantó el n-heptano a un matraz bola de 25 mL, el algodón se exprime para recuperar todo el n-heptano, posteriormente se evaporó a sequedad en un rotavapor. Esta operación se repitió 2 veces más para completar tres extracciones. Las tres fracciones se colocaron en el mismo matraz y se evaporaron hasta dejar aproximadamente 1 mL.

El extracto se colocó sobre una columna cromatográfica cilíndrica de 10 cm de largo por 1.5 de diámetro que contenía 2 g de gel de sílice mezclada con n-heptano, el extracto se eluyó y lo recuperado se evaporó a sequedad en un rotavapor. El concentrado se disolvió en 0.3 mL de n-heptano y se transfirió a un vial para su posterior análisis.

#### 7.2.2 Procedimiento para la etapa de separación por cromatografía en columnas.

En un tubo de ensaye de 100 mm X 160 mm se colocan 0.5 g de pasto y 1 mL de estándar interno, en otro tubo se colocan 10 mL de n-heptano y ambos tubos se introducen en un baño de temperatura constante a 60 °C durante 5 minutos. Posteriormente se agrega el n-heptano a la muestra de pasto y se agita manteniendo el tubo dentro del baño de temperatura constante. Se saca el tubo del baño y se le introduce un algodón hasta tocar la

muestra, el n-heptano se decanta a un matraz bola de 25 mL y el algodón se exprime para recuperar todo el n-heptano, esta fracción se evapora a sequedad. Esta operación se repite 2 veces más y se juntan los tres extractos. Las tres fracciones se colocaron en el mismo matraz y se evaporaron hasta dejar aproximadamente 1 mL. Este concentrado se coloca en la parte superior de una columna cromatográfica cilíndrica que contiene gel de sílice, 2g o 4 g según sea el ensayo, para eluirse con n-heptano, 10 y 20 mL respectivamente. La solución recuperada se evapora en un rotavapor a sequedad y el concentrado se disuelve con 0.3 mL de n-heptano y se traslada a un vial para su posterior análisis.

#### 7.2.5 Técnica propuesta

En un tubo de ensayo de 100 mm X 160 mm se le agrega 0.5 g de pasto liofilizado y 1 mL de estándar interno y se introduce en un baño de temperatura constante a 60 °C. Pasados 5 minutos en el baño se le agregan 10 mL de n-heptano previamente calentado a 60 °C . Se agita durante 1 minuto dentro del baño. Posteriormente una bolita de algodón de aproximadamente 1 cm de diámetro se sumerge hasta tocar el fondo del tubo para filtrar el pasto pulverizado y el n-heptano se decanta a un matraz bola de 25 mL. El disolvente se evapora hasta obtener aproximadamente 1 mL de residuo, el cual se adiciona por la parte superior de una columna cromatográfica que contiene 2 g de gel de sílice. La muestra se eluye con 10 mL de n-heptano y la fracción recuperada se evapora a sequedad. Este extracto se disuelve con 0.30 mL de n-heptano y se transfiere a un vial de 2 mL para su análisis.

### 7.3 MATERIAL Y REACTIVOS

Material	Reactivos
☛ Espátula	☛ Heptano (n-C <sub>7</sub> , J.T Baker)
☛ Vidrio de reloj	☛ Sílica gel 60-200 mesh J.T Baker
☛ Balanza analítica	☛ Agua destilada
☛ Matraz bola de 50 mL	☛ KOH J. T. Baker
☛ Probeta de 25 mL	☛ EtOH 96 % Merck
☛ Pipeta de 5 mL	☛ n-Eicosano (n-C <sub>20</sub> )*
☛ Pipeta de 1 mL	☛ n-Heneicosano (n-C <sub>21</sub> )*
☛ Refrigerante	☛ n-Docosano (n-C <sub>22</sub> )*
☛ Baño de agua a temperatura constante	☛ n-Tricosano (n-C <sub>23</sub> )*
☛ Pipeta Pasteur	☛ n-Tetracosano (n-C <sub>24</sub> )*
☛ Rotavapor	☛ n-Pentacosano (n-C <sub>25</sub> )*
☛ Columna para cromatografía de 10 cm X 1.5 cm.	☛ n-Hexacosano (n-C <sub>26</sub> )*
☛ Matraz bola de 25 mL	☛ n-Heptacosano (n-C <sub>27</sub> )*
☛ Micropipeta de 100 a 1000 microlitros	☛ n-Octacosano (n-C <sub>28</sub> )*
☛ Puntillas para micropipeta	☛ n-Nonacosano (n-C <sub>29</sub> )*
☛ Vial de 2 mL con tapa.	☛ n-Triacontano (n-C <sub>30</sub> )*
☛ Vidrio de reloj	☛ n-Hentriacontano (n-C <sub>31</sub> )
☛ Balanza analítica	☛ n-Dotriacontano (n-C <sub>32</sub> )*
☛ Matraz aforado de 25 mL	☛ n-tritriacontano (n-C <sub>33</sub> )*
☛ Espátula	☛ n-Tetratriacontano (n-C <sub>34</sub> )*
☛ Piseta	☛ n-Pentatriacontano (n-C <sub>35</sub> )*
	☛ n-Hexatriacontano (n-C <sub>36</sub> )*
	* Reactivos de Fluka Chemic, 97 %