

**ALCANOS LINEALES DE LA CERA CUTICULAR DE HOJAS DE *POPULUS ALBA*,
POPULUS DELTOIDES (SALICACEAE), *ROBINIA PSEUDOACACIA* (FABACEAE),
ULMUS PUMILA (ULMACEAE) Y *FRAXINUS AMERICANA* (OLEACEAE) EN
TANDIL, BUENOS AIRES, ARGENTINA**

María L. Bakker & Patricia I. Alvarado

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNPCBA, Pinto 399, 7000 Tandil, Buenos Aires, Argentina;
bakker@vet.unicen.edu.ar (autor corresponsal).

Abstract. Bakker M.L. & P.I. Alvarado. 2006. Cuticular wax linear alkanes in leaves of *Populus alba*, *Populus deltoides* (Salicaceae), *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), *Ulmus pumila* (Ulmaceae) and *Fraxinus americana* (Oleaceae) from Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Darwiniana* 44(1): 58-63.

Mature leaves of adult individuals of *Populus alba*, *Populus deltoides*, *Robinia pseudoacacia*, *Ulmus pumila* and *Fraxinus americana* from the University Campus, Tandil, Buenos Aires, Argentina (37° 19'S, 59° 08'W) were collected on February 2004. The cuticular wax was extracted, purified, and the content and relative proportion of odd-carbon numbered *n*-alkanes (C₂₃→C₃₅) was quantified by capillary gas-liquid chromatography. Total concentration of *n*-alkanes (mg/kg DM) were *P. alba* (6935) > *Robinia* (1571) > *P. deltoides* (1379) > *Ulmus* (880) > *Fraxinus* (467). Most abundant *n*-alkanes in all species were C₂₇ and C₂₉ accounting for 10-51% and 35-76% of total, respectively, except *Fraxinus* where most abundant were C₂₉ and C₃₁ accounting for 31% and 41% of total, respectively. *P. alba* and *P. deltoides* differed not only in total concentration of all *n*-alkanes but also in relative proportion of C₂₇ and C₂₉, being C₂₉ the most abundant in the latter species (76%) as well as in *Robinia* (75%). The occurrence of even-carbon numbered *n*-alkanes was either undetectable or very low in all species in general, except for C₂₆, C₂₈ and C₃₀, the latter being prominent in *Fraxinus*.

Keywords. *Populus*, *Robinia*, *Ulmus*, *Fraxinus*, linear alkanes, cuticular wax.

Resumen. Bakker M.L. & P.I. Alvarado. 2006. Alcanos lineales de la cera cuticular de hojas de *Populus alba*, *Populus deltoides* (Salicaceae), *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), *Ulmus pumila* (Ulmaceae) y *Fraxinus americana* (Oleaceae) en Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Darwiniana* 44(1): 58-63.

Se coleccionaron hojas maduras de ejemplares adultos de *Populus alba*, *Populus deltoides*, *Robinia pseudoacacia*, *Ulmus pumila* y *Fraxinus americana* del Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires, Argentina (37° 19'S, 59° 08'O) en febrero de 2004. La cera cuticular fue extraída, purificada, y el contenido y proporción relativa de *n*-alcanos de número impar de carbonos (C₂₃→C₃₅) fue cuantificado mediante cromatografía gas-líquido capilar. La concentración total de *n*-alcanos (mg/kg MS) fue *P. alba* (6935) > *Robinia* (1571) > *P. deltoides* (1379) > *Ulmus* (880) > *Fraxinus* (467). Los *n*-alcanos más abundantes en todas las especies fueron C₂₇ y C₂₉ que constituyeron entre 10 y 51% y entre 35 y 76% del total respectivamente, excepto en *Fraxinus* donde los más abundantes fueron C₂₉ y C₃₁ que constituyeron el 31 y 49% del total respectivamente. *P. alba* y *P. deltoides* difirieron no solo en la concentración total de *n*-alcanos sino también en la proporción relativa de C₂₇ y C₂₉, siendo C₂₉ el *n*-alcano más abundante en la segunda especie (76%) igual que en *Robinia* (75%). La presencia de *n*-alcanos de número par de carbonos no fue detectable o resultó muy baja en general en todas las especies, con excepción de C₂₆, C₂₈ y C₃₀, este último se destacó particularmente en *Fraxinus*.

Palabras clave. *Populus*, *Robinia*, *Ulmus*, *Fraxinus*, alcanos lineales, cera cuticular.

INTRODUCCIÓN

La parte aérea de las plantas está cubierta por una cutícula cerosa compuesta principalmente por

n-alcanos de cadena larga, alcoholes, cetonas y ésteres, incluyendo además triterpenoides, esteroides y flavonoides en menor cantidad. Las características fisicoquímicas de la cera determinan fun-

ciones vitales para las plantas como la reducción de la pérdida de agua no estomática, reducción del depósito de polvo, polen y contaminantes ambientales, protección contra la radiación ultravioleta, bacterias y hongos, y participación en una variedad de interacciones con los insectos (referencias citadas en Kunst & Samuels, 2003). Los *n*-alcanos más abundantes en la mayoría de las plantas superiores son los de número impar de carbonos en el rango de C₂₁ a C₃₅ y tanto la concentración como la proporción relativa están determinadas genéticamente, por lo que pueden diferir marcadamente entre distintas especies y dentro de una misma especie, aunque también se observan diferencias entre partes morfológicas de una misma planta y variaciones relacionadas con la edad, el desarrollo y las condiciones ambientales (Dove & Mayes, 1996; Dove et al., 1996; Post-Beittenmiller, D. 1996; Cameron et al., 2002; Maffei et al., 2004 y referencias citadas en estos tres últimos). Los *n*-alcanos de cadena larga son prácticamente indigestibles para la mayoría de los mamíferos herbívoros y se excretan cuantitativamente en las heces, de manera que las diferencias que existen en la proporción relativa de *n*-alcanos entre especies y partes de planta permiten estimar las proporciones de las mismas en la dieta de los animales que las ingieren (Mayes & Dove, 2000).

El objetivo de este trabajo fue la identificación de un material vegetal abundante, de fácil obtención, que posea una alta concentración de *n*-alcanos de cadena larga y en una proporción relativa tal que, adicionando pequeñas cantidades del mismo a un alimento con bajo contenido de *n*-alcanos, permita distinguirlo de otros componentes vegetales de la dieta. Los resultados de este trabajo brindan además información original sobre la composición de los *n*-alcanos de la cera cuticular de hojas de algunas especies de árboles de amplia presencia local, que puede ser de utilidad para estudios taxonómicos y de los efectos de la contaminación ambiental y el cambio climático sobre la vegetación de la zona.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material analizado se coleccionó de ejemplares adultos de *Populus alba* L. (BAL 7294), *Popu-*

lus deltoides Bartr. ex Marshall (BAL 7293), *Robinia pseudoacacia* L. (BAL 7292), *Ulmus pumila* L. (BAL 7296) y *Fraxinus americana* L. (BAL 7298) del Campus Universitario de Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina (37° 19'S, 59° 08'O), en el mes de febrero de 2004. De cada una de las especies se seleccionó un solo ejemplar, del cual se coleccionaron al azar y en forma manual, entre 20 y 25 hojas maduras de las ramas inferiores, incluyendo los peciolo. Las hojas se lavaron individualmente con agua corriente fría, se dejaron secar al aire a temperatura ambiente entre 24 y 48 horas, y luego se molieron con un molinillo eléctrico. Una alícuota de ~0,1000 (*Populus*), o ~0,2500 g (otros) de muestra molida se pesó en un tubo de vidrio de borosilicato (150 x 20 mm) con tapa a rosca provista de un sello interno de teflón, y se agregó ~0,1100 g de una solución de 0,4 mg/g de *n*-docosano (C₂₂) (SIGMA) y 0,8 mg/g de *n*-tetratriacontano (C₃₄) (SIGMA) en *n*-undecano (C₁₁) (ICN) como estándares internos. Otra alícuota de ~1,0000 g se pesó en una bandejita de aluminio y se secó en estufa a 75 °C hasta peso constante para la determinación del contenido de materia seca (MS).

La extracción y purificación de la cera cuticular se realizó según el método propuesto por Mayes et al. (1986). Se agregó al tubo 10 ml de una solución 1 M de hidróxido de potasio en etanol y se calentó en bloque seco a 90 °C durante 16 horas. Luego de enfriar el tubo hasta 65 °C, se agregaron 7 ml de *n*-heptano (ANEDRA) y 2 ml de agua destilada, se agitó en forma manual y se recolectó la fase de *n*-heptano en otro tubo, repitiéndose esta operación con el nuevo agregado de 7 ml de *n*-heptano. La fase de *n*-heptano se evaporó a seco en bloque seco a 90 °C, bajo un evaporador con flujo continuo de aire. El residuo seco se rediluyó en 1,5 ml de *n*-heptano y se purificó pasándolo por una columna de ~5 ml de sílicagel 60 (MERCK). El extracto purificado se evaporó a sequedad con las mismas condiciones ya mencionadas y se guardó hasta el análisis.

El análisis de los *n*-alcanos se realizó mediante cromatografía gas-líquido capilar con un equipo HP 6890 con inyector automático y detector de ionización de llama. Se usó una columna DB-1 (J&W) (15 m x 0,53 mm d.i., espesor del film: 1 µm) y helio como gas portador a 10 ml/min con flujo constante. El extracto purificado se rediluyó

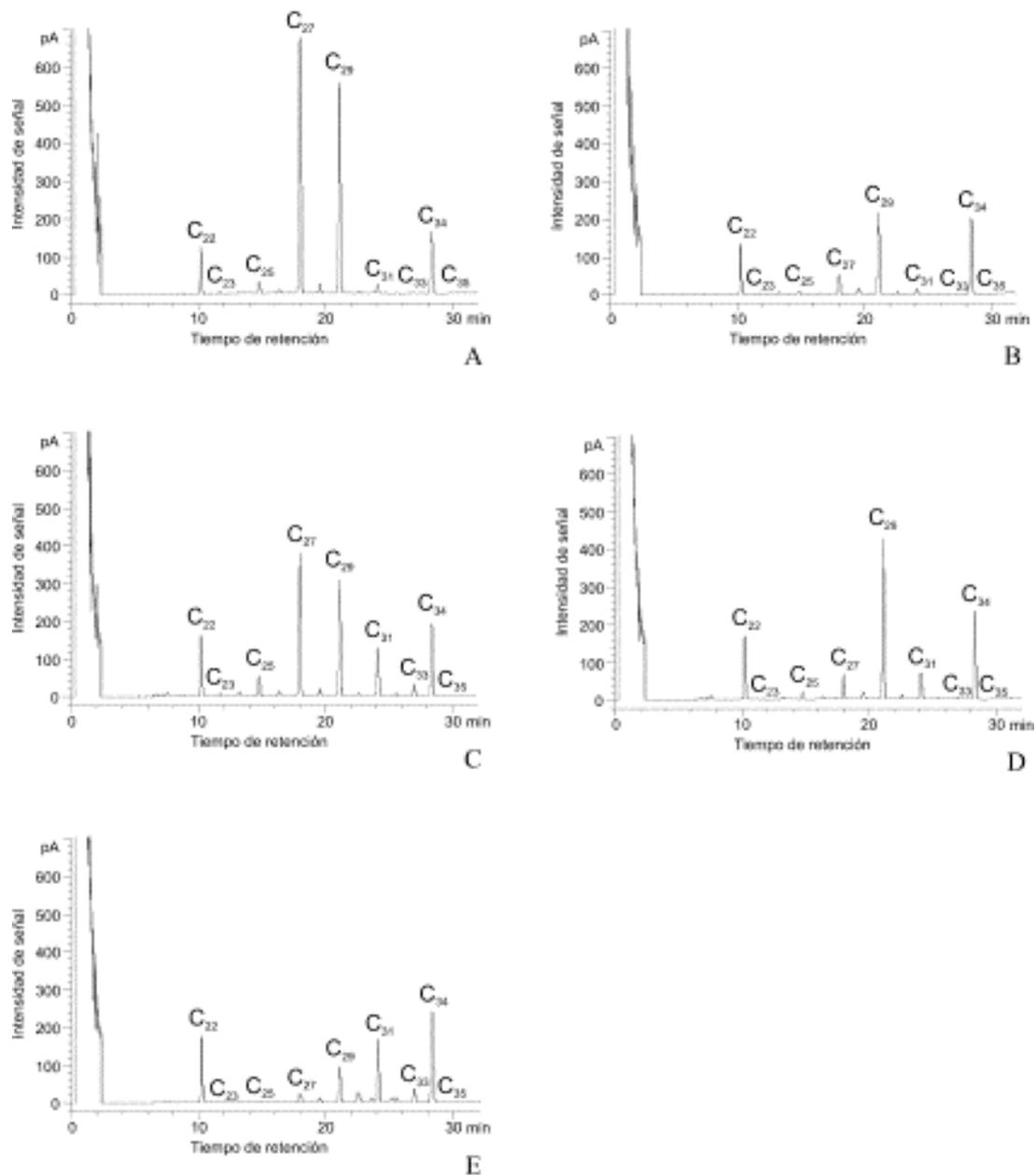


Fig.1. Cromatogramas del extracto purificado de cera cuticular de hojas de **A**, *Populus alba*. **B**, *Populus deltoides*. **C**, *Robinia pseudoacacia*. **D**, *Ulmus pumila* y **E**, *Fraxinus americana*. Cantidad de muestra (g): (0,1000 (*Populus*), (0,2500 (otros); inyección: 0,5 µl del extracto purificado en n-heptano; columna: DB-1 (15 m x 0,53 mm, 1 µm); gas portador: helio a 10 ml/min; inyector y detector: 340 °C; horno: 150 °C x 2,5 min, 8 °C/min hasta 190 °C, 4 °C/min hasta 270 °C, 3 °C/min hasta 300 °C x 5 min. Estándares internos: C₂₂ y C₃₄. Tiempo de retención promedio (min): C₂₃: 11,64; C₂₅: 14,75; C₂₇: 17,94; C₂₉: 21,06; C₃₁: 24,05; C₃₃: 26,89; C₃₅: 29,69. Los picos que se destacan entre los n-alcamos de número impar de carbonos son los n-alcamos de número par de carbonos en orden de serie.

en 400 µl de n-heptano (MERCK) y se inyectaron 0,5 µl, sin división de flujo. Las condiciones

de la corrida cromatográfica fueron: temperatura del inyector y detector: 340 °C; temperatura del

Tabla 1. Concentración y proporción relativa de *n*-alcanos de número impar de carbonos (C₂₃→C₃₅) de cera cuticular de hojas de *Populus alba*, *Populus deltoides*, *Robinia pseudoacacia*, *Ulmus pumila* y *Fraxinus americana* del Campus Universitario de Tandil, Buenos Aires, Argentina, en febrero de 2004.

| | <i>n</i> -alcano (mg/kg MS) | | | | | | |
|--|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | C ₂₃ | C ₂₅ | C ₂₇ | C ₂₉ | C ₃₁ | C ₃₃ | C ₃₅ |
| <i>Populus alba</i> L. | 19,1 | 142,6 | 3528,0 | 3121,2 | 109,0 | 9,2 | 6,0 |
| <i>Populus deltoides</i> Bartr. ex Marsh | 14,9 | 38,3 | 230,1 | 1041,8 | 44,6 | 5,5 | 3,6 |
| <i>Robinia pseudoacacia</i> L. | 10,8 | 87,3 | 636,4 | 550,6 | 224,3 | 59,4 | 2,7 |
| <i>Ulmus pumila</i> L. | 4,5 | 27,9 | 90,6 | 658,6 | 92,4 | 4,2 | 1,8 |
| <i>Fraxinus americana</i> L. | 1,9 | 4,9 | 29,7 | 145,4 | 230,5 | 52,1 | 2,5 |

| | <i>n</i> -alcano (% del total C ₂₃ →C ₃₅) | | | | | | |
|--|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | C ₂₃ | C ₂₅ | C ₂₇ | C ₂₉ | C ₃₁ | C ₃₃ | C ₃₅ |
| <i>Populus alba</i> L. | 0,3 | 2,1 | 50,9 | 45,0 | 1,6 | 0,1 | 0,1 |
| <i>Populus deltoides</i> Bartr. ex Marsh | 1,1 | 2,8 | 16,7 | 75,6 | 3,2 | 0,4 | 0,3 |
| <i>Robinia pseudoacacia</i> L. | 0,7 | 5,6 | 40,5 | 35,0 | 14,3 | 3,8 | 0,2 |
| <i>Ulmus pumila</i> L. | 0,5 | 3,2 | 10,3 | 74,8 | 10,5 | 0,5 | 0,2 |
| <i>Fraxinus americana</i> L. | 0,4 | 1,0 | 6,4 | 31,1 | 49,4 | 11,2 | 0,5 |

horno: 150 °C durante 2,5 min; rampa 1: 8 °C/min hasta 190 °C; rampa 2: 4 °C/min hasta 270 °C; rampa 3: 3 °C/min hasta 300 °C durante 5 min. La cuantificación de los *n*-alcanos de número impar de carbonos (C₂₃→C₃₅) se realizó mediante calibración con tres niveles de una solución de *n*-tricosano (C₂₃), *n*-pentacosano (C₂₅), *n*-heptacosano (C₂₇), *n*-nonacosano (C₂₉), *n*-dotriacontano (C₃₂) y *n*-tritriacontano (C₃₃) (SIGMA-ALDRICH) en *n*-heptano, con la adición de C₂₂ y C₃₄ como estándares internos, y *n*-hentriacontano (C₃₁) y *n*-pentatriacontano (C₃₅) se cuantificaron usando los factores de respuesta (FR) de C₃₂ y C₃₃, respectivamente. La validación del método cromatográfico se realizó con once niveles de concentración de los *n*-alcanos mencionados (rango desde 0,0005 hasta 0,6 µg/µl) inyectados por duplicado: la respuesta del detector para todos los *n*-alcanos y el rango de concentración especificado es lineal ($y=a+FRx$), los valores de *a* son cercanos a cero (0,009-0,01), los FR son cercanos a uno (0,95-1,03) y los coeficientes de determinación (R²) son superiores a 99, 98%; los límites de detección (Señal/Ruido=3) y cuantificación (Señal/Ruido=10) para todos los *n*-alcanos están dentro de los rangos 0,08-0,16 y 0,25-0,50 ng/µl, respectivamen-

te; la precisión dentro del día y entre días es muy alta, los coeficientes de variación de las réplicas no superan el 3% y el valor promedio para todos los *n*-alcanos y rango de concentración especificado es inferior al 0,5%. La selectividad del método cromatográfico se comprobó mediante la adición de estándares de los *n*-alcanos a extractos de muestras y el ajuste de las condiciones de corrida para obtener una resolución de los picos cromatográficos mayor a 1,5 (100%). La recuperación de todos los *n*-alcanos analizados con el método de extracción empleado es prácticamente completa (88-105%) y la incorporación de los estándares internos corrige cualquier variación que pueda ocurrir durante el proceso (Oliván & Osoro, 1999).

Los valores se presentan como la concentración de cada *n*-alcano en la muestra en mg/kg MS. La concentración total de *n*-alcanos (mg/kg MS) se obtuvo sumando las concentraciones de los *n*-alcanos de número impar de carbonos del rango considerado (C₂₃→C₃₅). En este trabajo se destaca la presencia pero no se cuantificaron los *n*-alcanos de número par de carbonos presentes dentro del rango estudiado ya que, en comparación con los *n*-alcanos de número impar de carbonos, en la mayoría de las especies vegetales están en

general en muy baja concentración (<10 mg/kg MS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cromatogramas del extracto purificado de la cera cuticular de las hojas se muestran en la Fig. 1. La presencia de *n*-alcanos de número par de carbonos dentro del rango estudiado fue no detectable o muy baja en general en todas las especies, con excepción de *n*-hexacosano (C₂₆), *n*-octacosano (C₂₈) y *n*-triacontano (C₃₀), este último se destacó particularmente en *Fraxinus americana*. La concentración y proporción relativa de *n*-alcanos de número impar de carbonos se muestran en la Tabla 1. La concentración total de *n*-alcanos (mg/kg MS) fue, de mayor a menor, *Populus alba* (6935) > *Robinia pseudoacacia* (1571) > *Populus deltoides* (1379) > *Ulmus pumila* (880) > *Fraxinus americana* (467). Los *n*-alcanos más abundantes en todas las especies fueron C₂₇ y C₂₉ que constituyeron entre 10 y 51% y 35 y 76% del total, respectivamente, excepto en *Fraxinus americana* donde los más abundantes fueron C₂₉ y C₃₁ que constituyeron 31 y 49% del total, respectivamente.

Según nuestro conocimiento no hay información disponible sobre la cantidad y proporción relativa de los *n*-alcanos de la cera cuticular de hojas de árboles en la Argentina; los primeros datos de especies de plantas forrajeras de la zona del sudeste de la provincia de Buenos Aires fueron reportados por Alvarado et al. (2001) y Bakker et al. (2001). No encontramos información de otros países sobre la composición de los *n*-alcanos de la cera cuticular de las hojas para las especies que analizamos en este trabajo. Los trabajos disponibles sobre el género *Populus* son un estudio sobre la relación entre la cera cuticular y el crecimiento en híbridos comerciales con alta producción de biomasa (Cameron et al., 2002) y varios estudios sobre el impacto de los niveles de CO₂ y O₃ en la estructura de la cera cuticular y las consecuencias que traen estos cambios en la interacción entre la planta y los insectos, realizados con *Populus tremuloides* (The Aspen FACE Experiment). Las dos especies del género *Populus* que analizamos en este trabajo difieren marcadamente no solo en la concentración total de *n*-

alcanos sino también en la proporción relativa de C₂₇ y C₂₉. En *Populus deltoides*, tanto el contenido total de *n*-alcanos [expresado en relación a una superficie promedio de hoja estimada de 115 cm² (~6 µg/cm²)] como las proporciones relativas de C₂₇ (17%) y C₂₉ (76%), fueron cercanos a los de cultivos controlados de los híbridos *P. deltoides* x *P. nigra* y *P. nigra* x *P. maximowiczii* en diferentes momentos del año en New York (42° 47' N, 76° 07' O) (5-12 µg/cm², C₂₇: 20-30%, C₂₉: 60-80%) reportados por Cameron et al. (2002). En comparación, *Populus alba* L. se destacó por la alta concentración total de *n*-alcanos con una alta proporción relativa de C₂₇. Los resultados que obtuvimos indican que la cantidad y composición de los *n*-alcanos de la cera cuticular de las hojas de *P. alba* serían adecuadas para la utilización de este material como marcador natural de la ingestión.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA, Tandil, en el marco del proyecto PICT 9788 financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, P.I., M.L. Bakker, M.A. Brizuela & M.S. Cid. 2001. Contenido de *n*-alcanos en las principales especies de plantas de pasturas cultivadas del sudeste de Buenos Aires. *Revista Argent. Prod. Anim.* 21: 155.
- Bakker, M.L., P.I. Alvarado, H.L. Gonda, L.G. Hidalgo, M.H. Wade, D.E. Dalla Valle, M.C. Inza, M.J. Otero & M.M. Yuño. 2001. Contenido de *n*-alcanos en distintas partes de planta de raigrás perenne y *Lotus corniculatus*. *Revista Argent. Prod. Anim.* 21: 157.
- Cameron, K.D., M.A. Teece, E. Bevilacqua & L.B. Smart. 2002. Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Phytochemistry*. 60: 715-725.
- Dove, H. & R.W. Mayes. 1996. Plant wax components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *J. Nutr.* 126: 13-26.
- Dove, H., R.W. Mayes & M. Freer. 1996. Effect of species, plant part, and plant age on the *n*-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. *Aust. J. Agric. Res.* 47: 1333-1347.
- Kunst, L. & A.L. Samuels. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progr. Lipid Res.* 42: 51-80.
- Maffei, M., S. Badino & S. Bossi. 2004. Chemotaxonomic significance of leaf wax *n*-alkanes in the Pinales (Coniferales). *J. Biol. Res. (Thessaloniki)* 1: 3-19.

- Mayes, R.W. & H. Dove. 2000. Measurement of dietary nutrient intake in free ranging mammalian herbivores. *Nutr. Res. Rev.* 13: 107-138.
- Mayes, R.W., C.S. Lamb & P.M. Colgrove. 1986. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*, 107: 161-170.
- Oliván, M. & K. Osoro. 1999. Effect of temperature on alkane extraction from faeces and herbage. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*, 132: 305-312.
- Post-Beittenmiller, D. 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Rev. Pl. Physiol. Pl. Molec. Biol.* 47: 405-430.
- The Aspen FACE Experiment. [En línea]. Marzo 2005. <<http://aspenface.mtu.edu/index.html>> [consulta: 10 de marzo, 2005].