



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS DE SEUDOBULBOS
DE ORQUÍDEAS MEXICANAS UTILIZADAS EN EL ARTE PLUMARIA**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ANA MARIA LÓPEZ MONTAÑEZ



TUTOR: Dra. Araceli Peña Álvarez AÑO: 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

A la Dra, Araceli P. Peña Álvarez por el tiempo y conocimientos compartidos durante la dirección de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Gerardo A. Salazar Chávez por proporcionarme los ejemplares de las especies de orquídeas estudiadas en este trabajo, y por el tiempo dedicado a resolver mis dudas.

A mis padres Magdalena y Alfonso por apoyarme siempre de manera incondicional.

Y especialmente a Adán y Cynthia por su apoyo incondicional, su paciencia, por formar la familia que tenemos y por ser una motivación para seguir adelante.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 101 de Cromatografía de Gases, del Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado, Edificio “B” de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1 Familia Orchidaceae.....	5
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	5
2.1.2 Características morfológicas de las orquídeas.....	6
2.2 Usos de las orquídeas.....	9
2.2.1 Usos de las orquídeas en México durante la época prehispánica y colonial.....	9
2.3 El <i>tzauhtli</i> y orquídeas que lo producen	10
2.4 Preparación del <i>tzauhtli</i> en las épocas prehispánica y colonial.....	13
2.5 Usos tradicionales del <i>tzauhtli</i> durante la época prehispánica y colonial.....	14
2.5.1 Arte Plumaria.....	14
2.5.2 Otros usos del <i>tzauhtli</i>	17
2.6 Compuestos analizados en los seudobulbos de orquídeas en el presente trabajo	17
2.6.1 Carbohidratos.....	17
2.6.1.1 Gomas de origen vegetal.....	18
2.6.1.2 Carbohidratos en seudobulbos y cormos de orquídeas.....	20
2.6.2 Métodos de análisis de gomas de origen vegetal.....	21
2.6.2.1 Extracción y purificación.....	21
2.6.2.2 Análisis.....	21
2.6.3 Lípidos	22
2.6.3.1 Ácidos grasos.....	23
2.6.3.2 Incidencia de los ácidos grasos en la naturaleza.....	24
2.6.4 Identificación de lípidos en diferentes tejidos vegetales.....	25

2.6.4.1	Lípidos en orquídeas.....	26
2.6.5	Métodos de análisis de lípidos.....	27
2.6.5.1	Extracción y purificación.....	27
2.6.5.2	Análisis.....	28
2.7	Cromatografía de Gases (CG).....	28
2.7.1	Cromatografía de Gases a Alta Temperatura.....	29
2.7.1.1	Columnas.....	29
2.7.1.2	Sistema de inyección.....	30
Inyección <i>Cool On-Column</i> (COC).....		31
Inyección con Temperatura de Evaporación Programada (PTV).....		33
2.7.1.3	Detectores.....	33
2.8	Análisis estadístico multivariado.....	33
2.8.1	Análisis de Componentes Principales.....	34
2.8.2	Aplicaciones del PCA para la diferenciación de plantas.....	35
3.	Objetivos.....	36
3.1	Objetivo general.....	36
3.2	Objetivos particulares.....	36
4.	Metodología experimental.....	37
4.1	Disolventes y reactivos.....	37
4.2	Derivatizantes.....	37
4.3	Estándares.....	37
4.4	Muestras.....	38
4.5	Preparación de las muestras.....	39
4.6	Determinación de carbohidratos.....	40
4.6.1	Extracción de mucílago (polisacáridos).....	40
4.6.2	Hidrólisis parcial de polisacáridos.....	40
4.6.3	Derivatización de oligosacáridos obtenidos	41

4.6.4 Instrumentación y condiciones cromatográficas para analizar oligosacáridos	41
4.7 Determinación de ácidos grasos totales.....	42
4.7.1 Extracción de lípidos.....	42
4.7.4 Hidrólisis de lípidos.....	43
4.7.5 Esterificación de ácidos grasos.....	43
4.7.6 Identificación de ésteres metílicos de los ácidos grasos.....	44
4.7.7 Instrumentación y condiciones cromatográficas para la identificación de ácidos grasos	44
4.8 Determinación de lípidos simples.....	45
4.8.1 Derivatización de lípidos simples.....	45
4.8.2 Identificación de lípidos simples.....	46
4.8.3 Instrumentación y condiciones cromatográficas para la identificación de lípidos simples.....	46
5. Resultados y discusión.....	47
5.1 Determinación de carbohidratos.....	47
5.2 Determinación de lípidos.....	56
5.2.1 Extracción de lípidos totales.....	56
5.2.2 Determinación de ácidos grasos totales.....	57
5.2.3 Determinación de lípidos simples.....	65
5.3 Análisis de Componentes Principales para ácidos grasos.....	71
6. Conclusiones.....	75
7. Apéndice I.....	77
8. Apéndice II.....	81
9. Apéndice III.....	83
10. Referencias.....	84

RESUMEN

Se obtuvo por primera vez el perfil cromatográfico de carbohidratos que constituyen el mucílago de pseudobulbos de algunas de las especies de orquídeas que fueron empleadas en el Arte Plumaria por los mexicas (*Bletia campanulata*, *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Prosthechea citrina*, *Prosthechea concolor* y *Arpophyllum spicatum*); y dos especies de las cuales no se encontró registro que se usaran con el mismo fin por esta civilización (*Bletia purpurea* y *Prosthechea karwinskii*). El estudio se realizó mediante una metodología desarrollada previamente (Peña, *et al.*, 1994) que consiste en el análisis por Cromatografía de Gases a Alta Temperatura de los monosacáridos y oligosacáridos obtenidos después de una hidrólisis parcial. De esta manera se observa que *Bletia campanulata*, *Bletia purpurea*, *Laelia autumnalis* y *Prosthechea karwinskii*, presentaron el mismo perfil sin embargo, *Prosthechea concolor*, *Prosthechea citrina*, *Laelia speciosa* y *Arpophyllum spicatum* presentaron perfiles diferentes. Los resultados proveen dos posibilidades: no existe un solo perfil para el mucílago (*tzauhtli*) empleado en el Arte Plumaria o que sólo cuatro de las ocho orquídeas estudiadas pueden considerarse como productoras de *tzauhtli*.

Partiendo de una metodología optimizada previamente en el laboratorio, para diferentes tejidos vegetales (Martínez, 2007), se determinó cualitativamente mediante Cromatografía de Gases con detector de Ionización de Flama y Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas, la composición de ácidos grasos totales de los pseudobulbos de las mismas orquídeas. De este modo se identificaron doce diferentes ácidos grasos en cada orquídea: ácido octanoico (C8:0), nonanoico (C9:0), decanoico (C10:0), dodecanoico

(C12:0), tetradecanoico (C14:0), pentadecanoico (C15:0), hexadecanoico (C16:0), heptadecanoico (C17:0), octadecanoico (C18:0), cis-9-octacenoico (C18:1), cis,cis-9,12-octadecenoico (C18:2) y el bencenpropanoico (BP).

Por otro lado se determinaron los lípidos simples de los pseudobulbos o cormos de las cuatro orquídeas que presentaron un perfil de carbohidratos semejante (*B. campanulata*, *B. purpurea*, *P. karwinskii* y *L. autumnalis*) encontrando que los ácidos grasos provienen principalmente de monoglicéridos y diglicéridos. El β -sitosterol se encontró en proporciones muy pequeñas.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio fitoquímico de los miembros de la familia Orchidaceae se ha enfocado principalmente en metabolitos secundarios (Williams, 1979; Arditti, 1992; Xiao, *et al.*, 2000; Yang, *et al.*, 2005) pero se conocen pocos estudios recientes sobre compuestos que son producto de su metabolismo primario como los carbohidratos y lípidos (Arditti, 1992).

Con el objeto de contribuir a la caracterización química de algunas especies de orquídeas mexicanas, en el presente trabajo se determinó el perfil de carbohidratos, ácidos grasos totales y lípidos simples contenidos en los pseudobulbos y cormos de estas plantas, a manera de estudio preliminar.

En México durante la época prehispánica y colonial, el mucílago de ciertas especies de orquídeas se empleaba como adhesivo para elaborar piezas de Arte Plumaria. Este adhesivo era llamado por los mexicas *tzauhtli*. En el estudio más reciente que se conoce sobre carbohidratos en orquídeas (Peña *et al.*, 1995) se obtuvo el perfil característico de carbohidratos de *Bletia campanulata* y el del adhesivo con el que fue elaborada una pieza de Arte Plumaria (que data de los siglos XVI-XVII). Ambos perfiles coincidieron, pero para poder confirmar que la pieza realmente se elaboró con el mucílago de esta orquídea, es necesario analizar de la misma manera el mucílago de todas las especies que se empleaban con el fin mencionado, y de esta manera conocer si el *tzauhtli* tiene un perfil de carbohidratos característico.

Con el propósito de contar con otro parámetro para diferenciar las orquídeas que producen *tzauhtli*, también se determinaron los ácidos grasos totales y lípidos simples. Las determinaciones de lípidos en orquídeas se han realizado con técnicas antiguas como Cromatografía de Gases con columnas empacadas y Cromatografía Capa Fina (Holman, 1972). En el presente trabajo las determinaciones se realizan con Cromatografía de Gases Capilar (incluyendo la técnica a Alta Temperatura).

2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Orchidaceae

La palabra “orquídea” se deriva de la palabra griega *orchis*, que significa testículo, sugiriendo la similitud de los pseudobulbos o cormos de algunas de las especies de orquídeas a los órganos genitales masculinos. Orchidaceae es el nombre de la familia que forman estas plantas y aunque deriva de la palabra *orchis*, en la actualidad este término se emplea para identificar a un género europeo concreto (Zdenek, *et al.*, 2005).

La familia Orchidaceae es una de las más extensas y diversas de las monocotiledóneas que existen, se han estimado alrededor de 30 000 especies (Dressler, 1981; Arditti, 1992). Los miembros de esta familia son plantas perennes con diversas formas de vida, pueden ser epifitos, litófitos o terrestres. Las orquídeas han podido establecerse en ambientes muy variados de la Tierra, pero son particularmente abundantes en regiones tropicales.

2.1.1 Clasificación taxonómica

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de esta familia (Hágsater, *et al.*, 2005):

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Subdivisión: Angiospermae
Clase: Liliopsida
Subclase: Lilidae
Orden: Aspargales
Familia: Orchidaceae

Para la clasificación interna se han propuesto diferentes criterios. Algunos consideran las características morfológicas principalmente de la flor, pero gracias a la obtención de datos como las secuencias de ADN se han podido entender mejor sus relaciones filogenéticas.

Actualmente se reconocen cinco subfamilias dentro de la familia Orchidaceae, apostasioides, vanilloides, cyripedioides, orchidoides y epidendroides. En cuanto a las especies, aun existen desacuerdos sobre los límites entre una y otra (Hágsater, *et al.*, 2005).

2.1.2 Características morfológicas de las orquídeas

De acuerdo a la especie las raíces de las orquídeas son simples o ramificadas, carnosas o delgadas, pero como característica común, tienen una capa de células muertas llamada velamen cubriendo su epidermis. En estas plantas las raíces suelen ser un entorno idóneo para albergar hongos simbiotes constituyendo una micorriza. Además de fijar y absorber nutrientes, las raíces de las orquídeas pueden cumplir funciones específicas según la especie (Zdenek, *et al.*, 2005; Hágsater, *et al.*, 2005).

Los tallos de las orquídeas están formados por segmentos o internodos delimitados por nudos cicatrizales donde originalmente hubo hojas, vainas o escamas foliares. En orquídeas epífitas y terrestres cada temporada anual de crecimiento, uno o varios segmentos se engrosan dando origen a tallos aéreos o subterráneos llamados pseudobulbos (en epífitas) y cormos (en terrestres) respectivamente. Los pseudobulbos por lo general portan hojas y flores a lo largo de su estructura. Ambos tallos engrosados son utilizados por la planta como almacén de agua y sustancias de reserva, que en parte son utilizadas para producir flores, frutos y nuevos tallos (Dressler, 1981; Hágsater, *et al.*, 2005).

Sus hojas, en general son elípticas, con o sin articulaciones y con diferente tipo de vernación (plegada, convolutiva, etc.) (Arditii, 1992). Las hojas de diferentes especies de orquídeas presentan modificaciones y funciones específicas, un ejemplo, es el grado variable de

suculencia, que en algunas epífitas es aprovechado para almacenar agua (Hágsater, *et al.*, 2005).

Las inflorescencias pueden originarse casi en cualquier altura del tallo, pseudobulbo o cormo aunque en la mayoría de los géneros aparecen en la base o en el ápice. Las flores pueden presentarse en racimos o panículas y en ocasiones en forma solitaria, en ellas se presentan características que distinguen a estas plantas de otras monocotiledóneas. Entre dichas características destacan la unión parcial o total del pistilo y los estambres constituyendo una estructura llamada ginostemio. Otra característica particular es su simetría bilateral con tres sépalos y tres pétalos; uno de los pétalos está modificado y es conocido como labelo, éste se sitúa en posición opuesta al ginostemio. En las orquídeas los estambres se localizan en un solo lado de la flor, aunque la mayoría de las especies sólo presenta uno. Y por último, el polen forma agregaciones (a excepción de ciertas especies), y la mayor parte es liberada en unidades de cuatro granos que a su vez forman cuerpos llamados polinios (Dressler, 1981; Hágsater, *et al.*, 2005).

Los frutos de orquídeas generalmente son cápsulas que tienen contenidas a las semillas. Las semillas son muy pequeñas (de 0.3 mm a 5 mm de longitud), y el número de ellas por fruto varía entre unos miles y cuatro millones (Dressler, 1981; Hágsater, *et al.*, 2005).

En la Figura 1 se ilustra un ejemplar de *Bletia urbana* (orquídea terrestre).

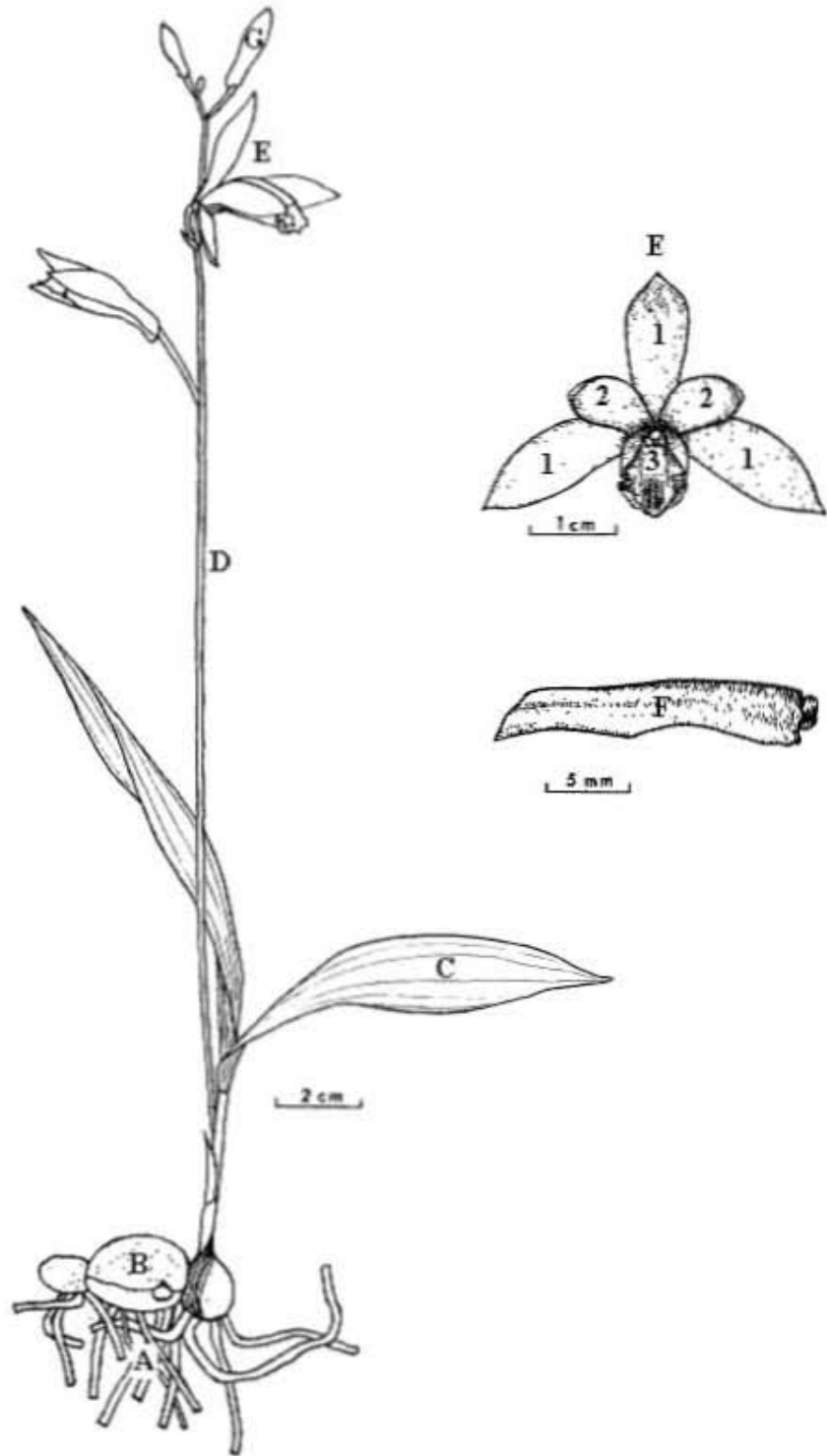


Figura 1. Morfología de *Bletia urbana*: A. Raíz, B. Cormo, C. Hoja, D. Inflorescencia, E. Flor (1.Sépalos, 2.Pétalos, 3. Labelo, F. Ginostemio), G. Fruto.
 Tomado de Dressler R. L., Notes on *Bletia* (Orchidaceae), Britonia, 20 (1968) 182 y modificado para este trabajo.

2.2 Usos de las orquídeas

Desde épocas antiguas y en distintas culturas a las orquídeas se les han dado diversos usos, el ornato es quizá el más común. Algunas especies de *vainilla* son mundialmente usadas como especias para fabricar saborizantes aunque también se les atribuyen propiedades medicinales. Otros usos que se conocen de las orquídeas son específicos de las regiones y culturas en que éstas crecen (Lawler, 1984; Arditti, *et al.*, 1984; Arditti, 1992).

2.2.1 Usos de las orquídeas en México durante la época prehispánica y colonial

El uso de las orquídeas en México tiene una tradición desde la época prehispánica. Uno de los usos más sobresalientes de las orquídeas durante el siglo XV, fue el pago de tributos con *vainilla* durante los reinados de *Moctezuma I* y *Axacayatl*, para emplearlo como aromatizante. *Moctezuma II* tomaba una bebida llamada “*chocolatl*” la cual era aromatizada con el fruto maduro de la orquídea y miel de abeja (García, *et al.*, 1981).

Con la llegada de los españoles, el médico Francisco Hernández por mandato del rey Felipe II de España documentó por primera vez la historia natural de México entre 1571 y 1577, en su obra “Historia de las plantas de la Nueva España”. Gracias a esta obra se sabe de algunas orquídeas conocidas por los mexicas, así como también los usos que se les daban. En su obra Hernández menciona que para curar o atenuar la disentería empleaban las especies *Arpophyllum spicatum* y *Epidendrum pastoris*; para curar heridas infectadas se empleaba el pseudobulbo de *Prosthechea citrina*; reducían la fiebre empleando el follaje de *Sobralia macrantha*, o hacían infusiones de *Laelia autumnalis*; con las flores de *Stanhopea hernandezii* y maíz rojo preparaban tortillas para reducir la fatiga producida por el sol (Hernández, 1959).

En el México precortesiano usaban *Encyclia citrina* para construir coronas, guirnaldas y ramilletes; en las celebraciones a los muertos se empleaba *Laelia autumnalis* con el mismo fin ornamental. Esta planta junto con *Laelia speciosa* sigue utilizándose para hacer dulces para los festejos del día de muertos (García, *et al.*, 1981).

Durante las épocas prehispánica y colonial las orquídeas tuvieron un papel muy importante en el arte, ya que el mucílago extraído de los seudobulbos o cormos de ciertas orquídeas, se utilizaba como adhesivo y aglutinante o mordente para realizar trabajos de pluma entre otros (García, *et al.*, 1981; González, 1994; Hágsater, *et al.*, 2005). Este mucílago fue nombrado por los náhuatl como *tzacuhtli* (Martínez, 1970; García, *et al.*, 1981) o *tzauhtli* (González, 1994; Urbina, 1903).

2.3 El *tzauhtli* y las orquídeas que lo producen

En 1571 Alonso de Molina tradujo la palabra *tzauhtli* al español como fécula pastosa (Molina, 1966). En el mismo siglo Fray Bernardino de Sahagún describió la fabricación de trabajos en los que se emplea este adhesivo, y usó las palabras pegamento o engrudo para referirse al *tzauhtli* (Sahagún, 1975). Francisco Hernández tradujo la palabra *tzauhtli* como gluten y describió diez especies de orquídeas cuyas raíces presentaban propiedades glutinosas, aunque menciona que solamente con dos de ellas se preparaba el adhesivo (Hernández, 1959).

En 1824 los naturalistas mexicanos Pablo de La Llave y principalmente Juan Lexarza, hicieron la descripción y su propia clasificación de alrededor de 50 orquídeas mexicanas originarias del centro de Michoacán (Mcvaug, 1983).

La mayoría de los autores que escribieron acerca del *tzauhtli* durante los siglos XIX y XX usaron los nombres dados por de La Llave y Lexarza para referirse a las orquídeas que le dan origen, sin embargo la clasificación taxonómica y nomenclatura de las orquídeas ha cambiado con el tiempo por lo que algunos de estos nombres ya no se usan en la actualidad (Dressler, 1981; González, 1994).

En 1903 el botánico mexicano Manuel Urbina y Altamirano separó las orquídeas de las que se extraía el *tzauhtli* del resto de las orquídeas mexicanas. Siguiendo la clasificación de La Llave y Lexarza, Urbina hizo una descripción de cada especie citando los lugares en donde se habían localizado hasta ese momento, y afirma que *Epidendrum pastoris* fue la más empleada para preparar el *tzauhtli* (Urbina, 1903). En la Tabla 1, se enlistan las orquídeas descritas por Urbina, con sus nombres náhuatl y el nombre científico dado por de La Llave y Lexarza (La Llave y Lexarza, 1881), otras solo como las menciona Urbina (1903) y casi todas con su nombre científico actual proporcionado por el Dr. Gerardo A. Salazar Chávez (investigador del Instituto de Biología, UNAM). Este último nombre es el que se empleó en el presente trabajo. La Figura 2 muestra los dibujos realizados por Francisco Hernández de *Laelia autumnalis* y *Epidendrum pastoris* en su obra (Hernández, 1959).

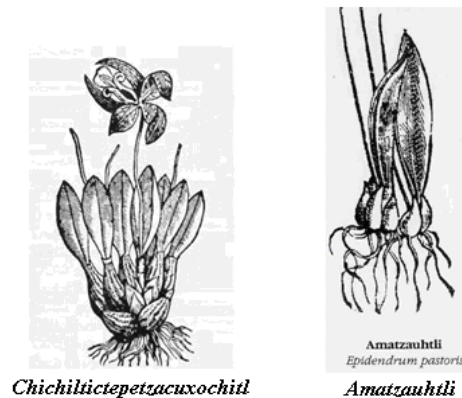


Figura 2. Dibujos de *Chichiltictepetzacuxochitl* (*Laelia autumnalis*) y *Amatzauhtli* (*Epidendrum pastoris*) por Francisco Hernández, en su obra “Historia de Las Plantas de la Nueva España”. Tomado de <http://nuevomundo.revues.org/index1674.html>.

Tabla 1. Nombres náhuatl y científicos de orquídeas clasificadas como productoras de *tzauhtli* de acuerdo a Urbina (1903).

Nombre náhuatl	Nombre científico	Nombre científico actual
<i>Tzacuhtli, Amatzauhtli</i>	<i>Epidendrum pastoris</i>	<i>Prosthechea pastoris</i>
<i>Atzauthli</i>	<i>Chranichis speciosa</i>	No se ha aclarado su identidad
<i>Acaltzauthli</i>	<i>Chranichis tubulares</i>	No se ha aclarado su identidad
<i>Tzacuxolchitl</i>	<i>Bletia campanulata</i>	<i>Bletia campanulata</i>
<i>Tzacuxolchitl</i>	<i>Bletia coccinea</i>	<i>Bletia coccinea</i>
<i>Tzauhxilotl</i>	<i>Arpophyllum spicatum</i>	<i>Arpophyllum spicatum</i>
<i>Itatepetzauohitl</i>	<i>Maxillaria liliacea</i>	<i>Govenia liliacea</i>
<i>Coztizacatzacuxochitl</i>	<i>Maxillaria superba</i>	<i>Govenia superba</i>
<i>Chichiltictepetzacuxochitl</i>	<i>Laelia autumnalis</i>	<i>Laelia autumnalis</i>
<i>Cozticoatzontecoxochitl</i>	<i>Cattleya citrina</i>	<i>Prosthechea citrina</i>
<i>Tonalxochitl</i>	<i>Epidendrum vitellinum</i>	<i>Prosthechea vitellina</i>
<i>Itzummaua</i>	<i>Laelia majalis</i>	<i>Laelia speciosa</i>
<i>Coatontecoxohitl</i>	<i>Stanhopea tigrina</i>	<i>Stanhopea hernandezii</i>
<i>Tlilxochitl</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	<i>Vanilla planifolia</i>
<i>Pipiihuahutli</i>	<i>Cypripedium irapeanum</i>	<i>Cypripedium irapeanum</i>

Aunque los pseudobulbos y cormos de muchas otras especies de orquídeas producen una sustancia mucilaginoso que puede servir como adhesivo, sólo el extraído de las que se presentan en la Tabla 1 fue llamado *tzauhtli* o *tzacuhtli*, a pesar de que aun en la actualidad en distintos pueblos estos nombres se emplean como nombres genéricos para las orquídeas mexicanas (Hágsater, *et al.*, 2005). En su trabajo Urbina menciona que los mexicas usaban las palabras *tzauhtli* o *tzaucuhitli* ya sea como prefijo, sufijo o intercalada cualquiera de las dos entre dos palabras más para aludir el color, disposición o forma de sus flores. Como eran plantas muy apreciadas por sus flores, a muchas se les dio nombre por la forma de la flor y no por la presencia del mucílago. Por esta razón en algunos nombres náhuatl no aparece la palabra *tzauhtli* o *tzacuhtli*.

El presente trabajo está basado en las especies que Urbina identificó como productoras de *tzauhtli*, así como en la investigación realizada por González (1994), la cual es una de las más actualizadas y completas respecto al tema. En dicho trabajo se presenta una monografía del *tzauhtli* y se comprueba químicamente su presencia como material constitutivo de un bien cultural.

Se trabajó con cinco especies de ellas *Arpophyllum spicatum*, *Bletia campanulata*, *Laelia speciosa*, *Laelia autumnalis* y *Prosthechea citrina*. También se trataron otras especies como *Bletia purpurea* la cual se empleaba con el mismo fin por los *tzeltales* (González, 1994); *Prosthechea concolor* la cual podría ser el *amatzauhtli* del que hablaba Hernández (Hágsater, et al., 2005); y *Prosthechea karwinskii*, que es una especie muy parecida a *Prosthechea citrina*, incluso algunos autores las denominan indistintamente. En el Apéndice II se describen algunas características generales de cada una de las especies estudiadas y en el Apéndice III su distribución en México y el hábitat en que crecen.

2.4 Preparación del *tzauhtli* en la época prehispánica y colonial

De acuerdo a Sahagún (1956) y Hernández (1959) los mexicas preparaban el *tzauhtli* de tres maneras diferentes. Después de la recolección y lavado de los pseudobulbos o cormos, los seccionaban en pedazos, los secaban al sol y los trituraban hasta hacerlos polvo. Este polvo podía almacenarse y en el momento en que se requería se disolvía en agua (en las fuentes consultadas no se menciona si el agua se usaba fría o caliente). Otro método era cocer los pedazos de pseudobulbos o cormos en agua y de ésta manera se extraía el adhesivo en el líquido. Un método más era emplear la sustancia secretada directamente de los pseudobulbos o cormos. Con el primer método el *tzauhtli* se obtiene con otros elementos como fibras de celulosa y

fécula ya que son insolubles en agua. La cantidad de fécula en los seudobulbos y cormos es pequeña (alrededor del 7%), pero la cantidad de fibras es variable dependiendo de la especie. En general los seudobulbos de orquídeas epífitas contienen mucho más fibra (Martínez, 1970).

2.5 Usos tradicionales del *tzauhtli* durante la época prehispánica y colonial

Las culturas mesoamericanas desde antes de la llegada de los españoles ya conocían diversos productos con propiedades adhesivas, la mayoría de origen vegetal. Durante las épocas prehispánica y colonial, el *tzauhtli* se empleó para la fabricación de diversos objetos pero el uso más común fue en la manufactura de objetos de pluma.

2.5.1 Arte Plumaria

Para los mexicas las plumas eran símbolo de lo precioso, divino, valioso y de la realeza, por lo que hacían un vasto uso de ellas (Castelló, *et al.*, 1997). El arte plumaria comenzó en la civilización mexicana como un oficio destinado a elaborar artículos para bailar; en la época de Moctezuma II llegó a su máximo desarrollo (Martínez, 1970). Este emperador unió a los artesanos de Tlatelolco y Tenochtitlan en Amantla, y los dividió en *tecpan amanteca* o “plumarios de la casa real” (hacían los atavíos del *tlatoani* y del dios *Huitzilopochtli*) y *calpixcan amanteca* o “plumarios del tesoro” (hacían los objetos que Moctezuma usaba en sus danzas rituales). Había otro grupo que trabajaba en sus propias casas, llamado *calla amanteca* o “plumarios domésticos”, quienes fabricaban escudos y justillos de plumas amarillas, además de objetos que ellos diseñaban para venderlos. En estos grupos plumarios, los maestros tenían aprendices que eran los encargados de preparar el *tzauhtli* (Martínez, 1970), pero no se ha encontrado documentado aun como se realizaba la recolección de orquídeas para su extracción.

Los *tecpan amanteca* y los *calla amanteca* se abastecían de plumas mediante el tributo o gracias a la crianza de aves. Esta última se llevaba a cabo en la casa de aves (*totocalli*) en donde había numerosas especies como águilas, patos, loros, papagayos, faisanes, colibríes, etc. y muchas más que en la actualidad ya están extintas. Por otra parte en los *tianquiz*, también encontraban materias primas como gomas, resinas, materias colorantes, instrumentos cortantes de cobre y hueso, e incluso plumas (Castelló, *et al.*, 1997).

Para crear mosaicos de pluma los *amantecas* primero colocaban el *tzauhtli* sobre una penca de maguey con superficie lisa y cóncava, encima ponían una capa de algodón cardado; después de secar al sol, se aplicaba otra capa del adhesivo para dejar la superficie lisa. Una vez preparada la capa, se desprendía de la penca del maguey y se dibujaba el modelo. El dibujo no lo hacía el plumario, había dibujantes especializados para hacerlos (*tlacuilos*) (Castelló, *et al.*, 1997; Sahagún, 1975). Después con *tzauhtli*, se pegaba una capa de plumas corrientes que constituía la “ensecadura de plumas” sobre la que se ensayaba la colocación de las plumas finas estudiando las mejores combinaciones. Posteriormente se recortaba el área comprendida dentro del trazo y se cubría con plumas finas pegadas con *tzauhtli*, una por una y alisándolas con una plegadera de hueso. En la Figura 3 se muestran imágenes del Códice Florentino en donde se aprecia la preparación del *tzauhtli* y la fabricación de trabajos de pluma.

También se confeccionaban animales como mariposas y lagartijas. Primero se hacía el esqueleto con cañuela de maíz, después se formaba el cuerpo recubriendo y llenando los huecos que quedaban, con una masa hecha de la médula de caña de maíz remolida y amasada con *tzauhtli*. La forma de la figura se mejoraba usando tezontle como abrasivo, y una vez terminada la superficie se pegaban las plumas con *tzauhtli* (Martínez, 1970).

Las plumas también eran colocadas en los objetos confeccionados cosiéndolas sobre tela o varillas de madera (Martínez, 1970, Sahagún, 1975).

Después de la conquista española, el arte de los “plumarios” prosiguió aunque con diferentes motivos, solo se representaban santos o escudos hispanos. A finales del siglo XVIII los mosaicos de pluma sufrieron una modificación, la cara y los miembros del cuerpo de figuras humanas se pintaron al óleo, debido a que el oficio del plumario ya no era únicamente de indígenas sino también de españoles quienes dejaron su influencia (Martínez, 1970; Castelló, *et al.*, 1997).



Preparación del pegamento por aprendices.



Amanteca aplicando pegamento sobre hoja de maguey.

Figura 3. Empleo de *tzauhtli* para fabricar mosaicos de pluma.
Imágenes del Códice Florentino, tomadas de <http://nuevomundo.revues.org/index1674.html>.

2.5.2 Otros usos del *tzauhtli*

Manuel Urbina (1903) y Hanz Lenz (1978) mencionan que el mucílago obtenido del *amatzauhtli* (señalada como *Epidendrum pastoris* de Michoacán por La Llave y Lexarza) “servía para dar el aderezo al papel” por los mexicas.

En la época prehispánica, se realizaban piezas de vaciadero, las cuales se hacían con el procedimiento llamado actualmente de *cera perdida*. Se especula que la arcilla utilizada para cubrir al objeto era mezclada con *tzauhtli*, para conferirle más cohesión (Martínez, 1970).

Los mexicas utilizaban los vegetales con propiedad glutinosa para curar enfermedades digestivas. Específicamente el *tzauhtli* se empleaba para curar la disentería, y en general para curar todas las enfermedades producidas por el calor (Hernández, 1959).

2.6 Compuestos analizados en los seudobulbos de orquídeas en el presente trabajo

2.6.1 Carbohidratos

Los aldehídos o cetonas polihidroxiados, así como los compuestos que por hidrólisis los forman, son llamados carbohidratos. Los carbohidratos son los compuestos más abundantes en la Tierra, prácticamente todos los animales y vegetales los sintetizan para emplearlos como almacén de energía o como moléculas estructurales (Fessenden, 1989).

De acuerdo al número de unidades elementales los carbohidratos comúnmente se dividen en tres clases, monosacáridos (no se pueden hidrolizar a compuestos más sencillos), oligosacáridos (constituidos por hasta ocho unidades de monosacáridos) y polisacáridos (polímeros de monosacáridos, en los cuales el grado de polimerización puede elevarse a varios miles) (Fessenden, 1989), los cuales pueden ser homopolímeros (como el almidón y la celulosa) o heteropolímeros (como las gomas, mucílagos y glucósidos) (Davies, *et al.*, 1969).

En la naturaleza los monosacáridos frecuentemente están metabolizados en forma de fosfato ésteres o en polisacáridos (Davies, *et al.*, 1969).

2.6.1.1 Gomas de origen vegetal

Las gomas son polímeros de alto peso molecular que al dispersarse en agua, se hinchan para formar geles, dispersiones pegajosas o soluciones viscosas; a los compuestos que producen estas últimas comúnmente se les denominan mucílagos, pero el término goma suele generalizar a ambas sustancias (Davies, *et al.*, 1969).

Las gomas son grandes moléculas flexibles, abiertas donde las fuerzas de unión secundarias (como los puentes de hidrógeno y fuerzas dipolo) se satisfacen por moléculas de agua. La relación entre la estructura molecular y las propiedades de las gomas, a pesar de que ha sido objeto de numerosos estudios, aun no se conoce completamente (Davies *et al.*, 1969; Mills y White, 1994).

La mayor parte de las gomas vegetales son polisacáridos, aunque existen excepciones como las resinas terpenoides. En general los polisacáridos de las gomas son heteroglicanos muy

ramificados, los cuales poseen algunas de las estructuras más complejas que se conocen. Solo se ha descrito la estructura de algunas gomas, ya que en general son muy complicadas; los pocos datos que existen indican que todas son muy distintas entre sí (Davies, *et al.*, 1969).

Los polisacáridos que constituyen a las gomas se dividen en tres principales clases. Polisacáridos con grupos glucurónico o galacturónico; estas gomas se forman generalmente como consecuencia de una lesión en las plantas y aparecen como exudaciones cristalinas endurecidas, como la goma arábiga (*Acacia Senegal*, *Acacia seyal*). Polisacáridos con grupos sulfato; este tipo de goma no ha sido encontrado en las plantas superiores, se encuentra en grandes cantidades en algas, como el agar (*Gelidium*) y la carragenina (*Chondrus crispus*). Y por último los polisacáridos neutros, que son glucomananos y galactomananos; los glucomananos se presentan en los bulbos, tubérculos, pseudobulbos y cormos de algunas plantas, y los segundos en semillas de leguminosas (Davies, *et al.*, 1969).

Desde tiempos muy antiguos (Era A.C.) las gomas extraídas de plantas han sido muy importantes económicamente y se siguen explotando en grandes cantidades. Uno de sus usos más significativos es como medio para las pinturas a base de agua y como adhesivos en trabajos de arte. Algunas de las gomas más usadas y estudiadas con tales fines son la arábiga (especies *Acacia*), tragacanto (especies *Astragalus*), cereza (especies *Prunus*), tamarindo (*Tamarindos indica*) y karaya (*Sterculia ureas*) (Mills and White, 1994).

2.6.1.2 Carbohidratos en pseudobulbos y tallos de orquídeas

Como se mencionó en la sección 2.1.2, los pseudobulbos y tallos de las orquídeas contienen sustancias de reserva que sirven para la formación de nuevas estructuras de la planta. Estas sustancias de reserva, conocidas con el nombre genérico “salep”, han sido empleadas principalmente como alimento desde épocas antiguas (año 300 A.C.) en Asia Menor y la región oriental del Mediterráneo. Con el tiempo el uso del “salep” se extendió al oriente de la India y China; oriente y norte de Europa; y Norteamérica con diferentes fines (Arditti, 1992).

De acuerdo a determinaciones de histólogos y químicos de mediados del siglo XIX la composición química del “salep”, es de 48.1% de mucílago, 27.3% de almidón, 1.2% de azúcares, 2.4% de celulosa, 5% de proteínas, 0.4% de grasas, trazas de ácido acético, 8.5% de agua y 2.1% de cloruros y fosfatos de potasio y calcio (Arditti, 1992).

El mucílago presente en el “salep” consta de glucomanano (Smith y Montgomery, 1959), el cual a su vez, consta de residuos de D-manopiranosil y D-glucopiranosil unidos por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$. Las proporciones de hexosas en el glucomanano de diferentes orquídeas varía de una especie a otra, pero la que predomina es tres moles de manosa por mol de glucosa (Buchala, *et al.*, 1974).

La composición química del mucílago de especies de orquídeas europeas, principalmente las pertenecientes al género *orchis*, ha sido ampliamente estudiada (Arditti, 1992) sin embargo, con respecto a especies mexicanas solo existe un documento (Peña, *et al.*, 1995) en el que se estudia la composición de oligosacáridos que constituyen el mucílago de *Bletia campanulata*.

2.6.2 Métodos de análisis de gomas de origen vegetal

2.6.2.1 Extracción y purificación

Todas las gomas se disuelven total o parcialmente en agua y disolventes polares (Sanz, *et al.*, 2007). Las gomas que no son exudadas se extraen fácilmente colocando las semillas o la planta directamente en agua; también han sido extraídas después de secar el material biológico y triturarlo para disolverlo en agua, aunque de esta manera se obtiene mayor cantidad de otros constituyentes de la planta. La disolución se puede acelerar elevando moderadamente la temperatura.

La disolución de goma obtenida requiere ser filtrada o centrifugada para remover las impurezas insolubles. Si el análisis lo requiere, deben eliminarse impurezas como iones inorgánicos y proteináceos, lo cual se puede lograr acidificando la solución acuosa, y precipitando con etanol (Smith and Montgomery, 1959). El producto obtenido de la purificación debe secarse antes del análisis, para lo cual se emplea la destilación azeotrópica del agua con benceno-etanol o la liofilización (Smith y Montgomery, 1959).

2.6.2.2 Análisis

La identificación de carbohidratos que constituyen a las gomas, y las gomas empleadas en trabajos de arte, se ha logrado gracias a la determinación de los residuos de azúcares y ácido urico después de su hidrólisis (Mills y White, 1994). Durante muchos años se ha empleado la hidrólisis ácida (Smith y Montgomery, 1959; Sanz, *et al.*, 2007) pero recientemente también se emplea la metanólisis (Bleton, *et al.*, 1996). Para la hidrólisis ácida se ha empleado

principalmente ácido sulfúrico (Smith and Montgomery, 1959), ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético (Sanz, *et al.*, 2007) a diferentes concentraciones y condiciones térmicas. Una técnica más reciente para acortar los tiempos de reacción emplea la irradiación con microondas, obteniendo buenos rendimientos y escasa descomposición de los azúcares lábiles (Colombini, *et al.*, 2002; Bonaduce, *et al.*, 2007).

Las técnicas de análisis mas comúnmente empleadas actualmente son la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas o con detectores como Ionización de Flama (Sanz, *et al.*, 2007; Bonaduce, *et al.*, 2007; Chiantore, *et al.*, 2009), Electroforesis Capilar (Sanz, *et al.*, 2007; Gröβl, *et al.*, 2005) y Resonancia Magnética Nuclear (León de Pinto, *et al.*, 1993A, 1993B, 2000).

Cuando se emplean técnicas cromatográficas para el análisis de carbohidratos es necesario preparar sus respectivos derivados. Para incrementar la volatilidad en Cromatografía de Gases e incrementar la sensibilidad en Cromatografía de líquidos y Electroforesis Capilar (Sanz, *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se realiza una hidrólisis parcial de acuerdo a la metodología desarrollada por Peña *et al.* (1995) para obtener un perfil característico de oligosacáridos de diferentes gomas.

2.6.3 Lípidos

El término lípido generalmente se restringe a los ácidos grasos y a sus derivados esteres o amidas naturales, así como a compuestos relacionados a ellos biosintéticamente (Christie

1987). Los lípidos tienen como característica común el ser solubles en disolventes orgánicos. Estos compuestos se han clasificado de muchas formas, una de las más generales los divide en simples y complejos tomando en cuenta los productos de su hidrólisis, los lípidos simples al ser hidrolizados producen uno o dos diferentes tipos de productos por mol y los complejos producen tres o más productos por mol (Christie, 1987).

Los lípidos simples están constituidos únicamente por ácidos grasos y componentes alcohólicos, el alcohol generalmente es un glicerol, pero también existen con un alcohol de cadena larga o un esteroil. Los ácidos libres, aunque se encuentran en proporciones muy pequeñas en tejidos animales y vegetales, y los esteroides también son considerados lípidos simples.

Existen tres clases de lípidos complejos glicerofosfolípidos, glicoglicerolípidos y esfingolípidos. Los glicerofosfolípidos al hidrolizarse producen glicerol, ácidos grasos, fósforo inorgánico y un compuesto polihidroxilado. Los glicoglicerolípidos después de su hidrólisis se obtiene glicerol, ácidos grasos y carbohidratos, al hidrolizarse los esfingolípidos producen ácidos grasos, fósforo inorgánico y carbohidratos u otro compuesto orgánico (Christie, 1987).

2.6.3.1 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son compuestos que constan de una cadena hidrocarbonada lineal generalmente sólo con un grupo carboxilo terminal, pueden ser completamente saturados o contener de uno o hasta seis dobles enlaces, cuya configuración generalmente es *cis*.

Existe diferente nomenclatura para identificar a los ácidos grasos, en la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos con la fórmula, nombre sistemático, nombre común y designación corta (Christie, 1987). En la designación corta el primer número corresponde al número de carbonos de la cadena y el segundo al número insaturaciones, las posiciones del doble enlace se indican entre corchetes. En el presente trabajo se antepuso la letra C a la designación corta para hacer referencia al ácido graso y las letras EM cuando se trata del éster metílico.

Tabla 2. Fórmula y diferentes nombres de algunos ácidos grasos.

Fórmula	Nombre sistemático	Nombre trivial	Designación corta
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	Decanoico	Cáprico	10:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Dodecanoico	Láurico	12:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	Tridecanoico	No tiene	13:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Tetradecanoico	Mirístico	14:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	Pentadecanoico	No tiene	15:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Hexadecanoico	Palmítico	16:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis-9-hexadecenoico	Palmitoléico	16:1 [9]
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$	Heptadecanoico	Margárico	17:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Octadecanoico	Estearico	18:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis-9-octadecenoico	Oléico	18:1 [9]
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis,cis-9,12-octadecadienoico	Linoléico	18:2 [9,12]
$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico	Linolenico	18:3 [9,12,15]
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Eicosanoico	Araquídico	20:0

2.6.3.2 Incidencia de los ácidos grasos en la naturaleza

Los ácidos grasos más comunes de origen animal y vegetal contienen un número par de átomos de carbono (de 4 a 24), se ha observado que los provenientes de animales son estructuralmente más simples que los de origen vegetal ya que estos últimos pueden contener mayor variedad de grupos funcionales como enlaces acetilénicos, enlaces acetilénicos y etilénicos conjugados, grupos alénicos, ciclopropanos, ciclopropenos, ciclopentenos, epóxidos, hidróxidos, cetonas, furanos y dobles enlaces con configuración *trans*. En ambos reinos los mas comunes son el

palmitico (C16:0), palmitoleico (C16:1 [9]), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 [9]), linoleico (C18:2 [9,12]) y linolenico (C18:3 [9,12,15]) (Christie, 1987; Buchanan, *et al.*, 2000).

Los ácidos grasos con número de carbonos impar, como ya se mencionó, son muy raros en la naturaleza sin embargo, se han llegado a encontrar en muy pocas plantas, en peces, algas y bacterias (Buchanan, *et al.*, 2000).

2.6.4 Identificación de lípidos en diferentes tejidos vegetales

Se han realizado numerosos estudios mediante Cromatografía de Gases sobre la composición lipídica en plantas con diferentes objetivos como su simple caracterización (Revinthi-Moranthi; *et al.*, 1985; Guil, *et al.*, 1996; Woodbury, *et al.*, 1998; Kang-Lyung, *et al.*, 1999; Lixia, *et al.*, 2000; de La Cruz, *et al.*, 2000; Rizov and Doulis, 2001; Blokker, *et al.*, 2002; entre otros). Otros estudios como en plantas de *Agave*, se han enfocado en las propiedades organolépticas que los lípidos le confieren a bebidas derivadas de la misma como el tequila (Martínez, 2007) y el mezcal (Peña *et al.*, 2004).

La composición lipídica de los organismos se ha pretendido utilizar para clasificarlos taxonómicamente. Antes de los años setenta ya se conocía la composición lipídica de muchos organismos, pero al no encontrar entidades lipídicas que puedan servir como marcadores únicos en cada especie esta información no se había podido emplear con tal fin. En 1978 Holman desarrolló un método matemático con el que demostró que los datos cuantitativos de la composición de ácidos grasos pueden aprovecharse para describir y clasificar a las especies.

2.6.4.1 Lípidos en orquídeas

El estudio de los lípidos en la familia *Orchidaceae* es muy escaso. En la literatura se encontraron reportados muy pocos trabajos al respecto. Arditti (1992) menciona que en 1971 se aislaron los primeros esteroides de orquídeas: campesterol, sitosterol y sigmasterol libres o conjugados en las especies *Cattleya* y *Arandina*. El mismo autor menciona que más tarde (no menciona la fecha) investigadores de la Universidad de Michigan encontraron que los pseudobulbos de algunos híbridos de la especie *Cymbidium* contienen sitosterol, sigmasterol y campesterol en una razón de 70:25:5.

Con respecto a los ácidos grasos sólo se encontró un documento (Holman and Nichols, 1972) en el que se caracterizan los lípidos de hojas, espigas, pseudobulbos y raíces, de algunas orquídeas (*Phalaenopsis*, *Cattleya* y *Cymbidium*). En los tres géneros se encontraron altas proporciones de ácidos grasos con número impar de átomos de carbono (de C15:0 a C23:0). Los ácidos grasos encontrados fueron C15:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C19:0, C18:2, C18:3, C20:0, C21:1, C20:2, C22:0, C23:0 y C24:0.

El estudio de Holman, se llevó a cabo empleando técnicas como Cromatografía de Capa Fina (CCF) para separar las diferentes clases de lípidos y Cromatografía de Gases (CG) con columnas empacadas acoplado a Espectrometría de Masas, para analizarlos. En el presente trabajo se determinó la composición de ácidos grasos totales y lípidos simples mediante Cromatografía de Gases a Alta Temperatura con detector de Ionización de Flama (HT-CG FID) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-EM).

2.6.5 Métodos de análisis de lípidos

2.6.5.1 Extracción y purificación

La extracción de lípidos de materiales biológicos usualmente se realiza con disolventes orgánicos (Fishwick and Wright, 1977; Christie, 1987). Los lípidos que tienen grupos no polares, son altamente solubles en disolventes como hexano, benceno o ciclohexano y en disolventes ligeramente polares como cloroformo o dietileter. En disolventes alcohólicos su solubilidad incrementa con la longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol; y entre mas corta sea la longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos, aumenta su solubilidad en disolventes polares. Los lípidos polares son muy solubles en disolventes como metanol, etanol y cloroformo. Cuando se trata de tejidos vegetales o animales, en general no es necesario calentar la mezcla de tejido con disolvente (Christie, 1987). Los disolventes mas usados son las mezclas de cloroformo-metanol (2:1 v/v) (Fishwick y Wright, 1977) como en el método Bligh-Dyer (1959) y el método de Folch (1957) que han sido usados por muchos años para la extracción de lípidos.

Para la extracción de lípidos se han empleado aparatos como el Soxhlet (Brooks *et al.*, 1998) y recientemente se han empleado técnicas extracción con fluidos supercríticos, microondas (Sahena, *et al.*, 2009), ultrasonido y líquidos presurizados (Flores, 2006).

Cuando se emplean disolventes orgánicos polares para extraer lípidos de tejidos biológicos también se extraen compuestos como azúcares, urea, aminoácidos y sales. Para remover estos contaminantes del extracto lipídico se puede realizar una pre-extracción del tejido con ácido acético al 25%; esta disolución también ayuda a desactivar las enzimas lipofilicas. Otro método

muy empleado para eliminar impurezas de un extracto lipídico que se encuentra en una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) es adicionar un cuarto de agua o de una disolución salina (como KCl 0.88%) del volumen total de la mezcla para después agitar y separar (Christie, 1987).

2.6.5.2 Análisis

El extracto lipídico obtenido, es una mezcla de diferentes clases de lípidos, y para obtener a cada una en estado puro se requieren ciertas técnicas. Para separar a cada clase de lípidos simples de los lípidos complejos es común emplear cromatografía de adsorción; posteriormente el extracto puede ser fraccionado nuevamente por cromatografía de adsorción o cromatografía de exclusión hasta obtener la fracción requerida. Cada clase de lípidos puede ser identificada por su comportamiento cromatográfico relativo a sus respectivos estándares. También las técnicas espectroscópicas son útiles, la Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas, son una herramienta en la elucidación de su estructura (Christie, 1987).

Algunas clases de lípidos requieren ser derivatizados para poder analizarlos por Cromatografía de Gases. Un ejemplo son los ácidos grasos. Con esta técnica es necesario convertirlos a derivados de esteres metílicos para volatilizarlos (Christie, 1987; Shantha, 1992).

2.7 Cromatografía de Gases (CG)

La Cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una móvil y una estacionaria. En Cromatografía de Gases la muestra se volatiliza para distribuirse en un gas inerte que transporta a los analitos (fase móvil)

y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (fase estacionaria). Los analitos se reparten en la fase estacionaria líquida de acuerdo a su presión de vapor relativa y afinidad por la fase estacionaria (McNair, 1984).

Para que un soluto pueda ser analizado por Cromatografía de Gases requiere ser volátil. Los solutos que no poseen esta característica a condiciones ambientales pueden ser volatilizados mediante procedimientos de derivatización; cuando volatilizan a temperaturas muy altas, se requiere elevar aun más la temperatura en el sistema cromatográfico para poder evaporarlos. Una alternativa para realizar el análisis de estos compuestos es la Cromatografía de Gases a Alta Temperatura (High Temperatura Gas Chromatography, HT-CG) (Peña, 1993).

2.7.1 Cromatografía de Gases a Alta Temperatura

La Cromatografía de Gases Capilar a Alta Temperatura (HT-GC), es una técnica cromatográfica que opera en el intervalo aproximado de 325-430° C y que se emplea para analizar compuestos térmicamente estables a esas temperaturas. Instrumentalmente esta técnica requiere columnas y detectores que soporten temperaturas de 325 a 430° C, y un sistema de inyección no discriminativo (Peña, 1993). A continuación se presenta una breve descripción de los componentes más importantes del sistema.

2.7.1.1 Columnas

Las columnas para HT-GC son construidas con materiales inertes como acero inoxidable, níquel y borosilicato, pero las más empleadas por su estabilidad son las de sílice fundida

recubiertas de poliimida. La poliimida que se fabrica actualmente es térmicamente estable a temperaturas superiores a 400° C (Peña, 1993).

Las fases estacionarias mas eficientes en HT-GC son las metil siliconas, difenil dimetil siliconas con grupos fenilo en un porcentaje del 20 al 65% (Peña, 1993) y las carborano silicona (McNair y Millar, 1997). Estas fases estacionarias son térmicamente estables y se pueden fabricar con alta pureza (Peña, 1993).

2.7.1.2 Sistema de inyección

Una desventaja de las técnicas de inyección más empleadas en CG (*split/splitless*), es la transferencia de los analitos de una zona de inyección (inyector) a una cámara donde primero son evaporados y posteriormente transportados (por el gas acarreador) a la columna capilar que se encuentra en el horno. De esta manera la concentración inicial de algunos analitos no entra completamente a la columna. Otra desventaja se presenta cuando se requiere analizar solutos que volatilizan a temperaturas muy elevadas, ya que el inyector tiene que alcanzar también altas temperaturas ocasionando la degradación de algunos analitos y produciendo a su vez, discriminación.

La técnica HT-GC requiere que la muestra sea introducida en la columna sin alteraciones, sin discriminación y sin que el procedimiento de inyección contribuya al ensanchamiento del pico (Sandra, 1985).

Existen dos técnicas de inyección que cumplen estos requisitos: *Cool On-Column* (COC) y Temperatura de Evaporación Programada (*Programmed Temperature Vaporizing, PTV*). La inyección *Cool On-Column* es la más empleada para trabajar con HT-GC (Peña, 1993).

Inyección *Cool On-Column* (COC)

El termino “inyección *on-column*” se refiere a la colocación directa de la muestra líquida dentro de la columna. En este tipo de inyección todos los dispositivos externos a la columna con los que la muestra pueda tener contacto son evitados. La zona de inyección, es decir, el interior de la cabeza de la columna, es calentada dentro del horno por lo tanto no hay un paso de evaporación previo a una temperatura superior a la de la columna. Por esta razón la técnica es conocida como “*Cool On-Column*” (Grob, 1991).

El puerto de inyección en COC permanece a temperatura ambiente gracias a un flujo de aire frío producido comúnmente por un ventilador. Un restrictor y una válvula rotatoria permiten la entrada de la jeringa a la columna mientras se mantiene la presión del gas acarreador en la cabeza de la columna. El sistema de enfriamiento asegura la transferencia de la muestra líquida de la jeringa a la columna (Peña, 1993). La Figura 4 muestra un esquema con los principales elementos de un inyector *Cool On-Column*.

La colocación de la muestra dentro de la columna se logra gracias a jeringas con agujas extremadamente finas (agujas de 0.3 mm d.i. para columnas de 0.32 mm d.i. y 0.2 mm d.i. para columnas de 0.25 mm d.i.), las hay de acero inoxidable o de sílice fundida. La longitud de las agujas debe ser adaptada al inyector usado ya que debe pasar a través de el y alcanzar pocos milímetros del interior de la columna (Hewlet Packard, 1989; Peña, 1993).

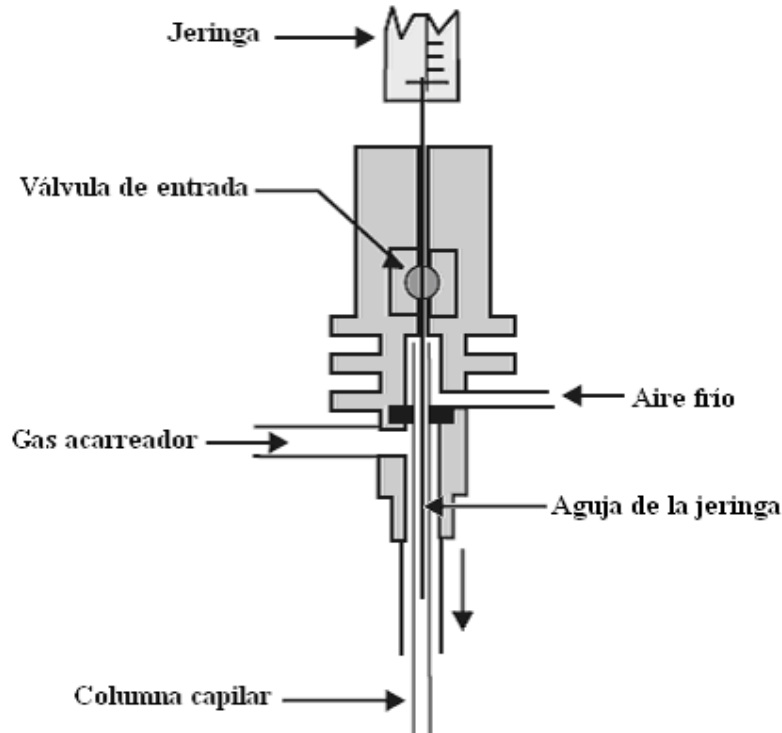


Figura 4. Inyector *Cool On-Column*.

Con esta técnica de inyección es común utilizar precolumnas desactivadas (no recubiertas o delgadamente cubiertas) conocidas como *retention gap*. Los *retention gap* sirven para evitar pérdida de la resolución y divisiones en los picos provocadas por la partición inicial de la muestra en vapor y microgotas de líquido. La longitud y tipo de desactivación del *retention gap*, depende del volumen inyectado y la polaridad del disolvente. La regla general es 1m de *retention gap* por μl inyectado (Hewlet Packard, 1989).

Como se puede apreciar el inyector *Cool On-Column* elimina la discriminación de la muestra, dado que la muestra líquida es introducida dentro de la columna fría; los analitos no sufren alteraciones ya que no son expuestos a tensión térmica (el proceso cromatográfico comienza a

relativamente bajas temperaturas) y provee resultados exactos y precisos (Hewlet Packard, 1989).

Inyección con Temperatura de Evaporación Programada (PTV)

El inyector de Temperatura de Evaporación Programada (PTV) abarca modalidades como la inyección *split*, *splitless*, *cool on-column* o inyección por flujo de disolvente. La inyección de la muestra con el PTV se realiza dentro de un inserto (*liner*) frío colocado antes de la columna. Consecutivamente la muestra se evapora y se transfiere a la columna capilar. La evaporación de la muestra comienza después del retiro de la aguja mediante el calentamiento del evaporador a la temperatura presente (Peña, 1993).

2.7.1.3 Detectores

La utilidad de un detector en CG depende de la sensibilidad, estabilidad, límite de detección y linealidad. En HT-GC pueden emplearse varios detectores como Ionización de Flama, Captura de Electrones y Detección de Nitrógeno-Fósforo. También puede ser combinada con métodos espectroscópicos como Espectrometría de Masas y Emisión Atómica (Peña, 1993).

2.8 Análisis estadístico multivariado

Para el caso en el que se miden varias variables para cada sistema en estudio suele decirse que se tienen datos multivariantes. Estos datos pueden emplearse para la discriminación, clasificación y comparación, y pueden ser tratados de diferentes maneras una de ellas es el Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Components Analysis*).

2.8.1 Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales conocido por sus siglas en inglés como PCA (*Principal Component Analysis*) es una técnica estadística que permite reducir la cantidad de datos en estudio, perdiendo la menor información posible. El objetivo del PCA es encontrar componentes principales Z_1, Z_2, \dots, Z_n que sean combinaciones lineales de las variables originales X_1, X_2, \dots, X_n , que describen a cada sistema, es decir:

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1n}X_n$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2n}X_n$$

etc.

los coeficientes a_{11}, a_{12}, \dots , se eligen de manera que las nuevas variables, a diferencia de las originales no se encuentren correlacionadas unas con otras. Para que pueda reducirse el número de datos, las componentes principales se eligen de manera que la primera componente principal (CP1), Z_1 , recoja la mayor parte de la variación y así sucesivamente. En consecuencia, cuando haya correlación significativa el número de CPs útiles será mucho menor que el número de variables originales. El PCA se puede entender como una rotación de los ejes de manera que el primer componente principal, CP1, se encuentra en la dirección de máxima variación, el segundo componente principal, CP2, se encuentra en la dirección de la siguiente mayor variación y así sucesivamente, frecuentemente CP1 y CP2 acumulan la mayor parte de la variación en el conjunto de datos por lo que estos pueden representarse en sólo dos dimensiones en vez de las n originales. Se pueden construir tantos componentes principales como dimensiones tiene el espacio definido por las variables manifiestas (Miller y Miller, 2002).

Existen programas de cómputo que realizan los cálculos, lo cual hace versátil este modo de analizar los datos, ya que proporcionan valores como los de la variación que acumula cada componente principal y los coeficientes en las combinaciones lineales que le dan origen a cada componente principal.

2.8.2 Aplicaciones del PCA para la diferenciación de plantas

El PCA ha resultado una herramienta muy útil cuando se requiere analizar una gran cantidad de datos obtenidos sobre la composición química en tejidos vegetales, entre otras aplicaciones. Esta herramienta estadística ha facilitado la comparación de perfiles cromatográficos de compuestos como terpenos (Jorge y Trugo, 2003; Santos, 2008), compuestos volátiles (Mildner-Szkudlarz, *et al.*, 2003) y ácidos grasos (Mongrand, *et al.*, 2001; Martínez, 2007), permitiendo diferenciar a las plantas por su composición química, incluso a nivel taxonómico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar diferentes especies de orquídeas mexicanas utilizadas en el Arte Plumaria, mediante el perfil de carbohidratos y lípidos por Cromatografía de Gases, para contribuir a su estudio químico.

3.2 Objetivos particulares

- ◆ Obtener el perfil de carbohidratos presentes en los seudobulbos en diferentes especies de orquídeas mexicanas utilizadas en el Arte Plumaria.

- ◆ Adecuar una metodología para determinar los ácidos grasos totales y lípidos simples presentes en los seudobulbos de las especies de orquídeas estudiadas.

- ◆ Aplicar la metodología anterior para determinar la distribución general de ácidos grasos totales presentes en los seudobulbos de las especies estudiadas.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Disolventes y reactivos

Piridina (GR) Baker (Xalostoc Edo. México); hidróxido de sodio (98%), bicarbonato de sodio (100.2%), ácido clorhídrico (37.2%), clorhidrato de hidroxilamina (100.6%), diclorometano (GR), metanol (99.9%), hexano (GR), 1-butanol (99.7%), hidróxido de potasio (98%), sulfato de sodio anhidro (99.4%), cloruro de sodio (99.5%) y ácido sulfúrico (98.6%), todos abastecidos de J. T. Baker (Xalostoc Edo. México); isooctano (GR) Fisher (N.Y., USA), ácido trifluoroacético (GR \geq 98%) Sigma (USA), nitrógeno líquido (Intituto de Investigaciones en Materiales, UNAM) y agua sometida a filtración en un sistema purificador y desionizador (Barnstead Thermoline, modelo 04747).

4.2 Derivatizantes

1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano HMDS (98%) Aldrich Chemical Company (USA), trifluoruro de boro en metanol (10%) Eastman (N.Y., USA) y Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida BSTFA, REGIS (USA).

4.3 Estándares

Para la determinación de oligosacáridos se emplearon los siguientes estándares: sacarosa, D(+)-galactosa, L(+)-arabinosa, L(+)-ramnosa, rafinosa, D(-)-fructosa, D(+)-glucosa E. Merck (Darmstadt). Para la determinación de ácidos grasos libres, acilgliceroles y esteroides se emplearon los estándares: ácido decanoico (99%), ácido hexadecanoico (97.9%) y ácido cis,cis-

9,12-octadecenoico (99%) Chem Service (Italia); monopalmitín (99%), diestearín (99%), tripalmitín (99%), triestearín (99%) y ácido octadecanoico (99%) Sigma Aldrich (México); monolinoleín (99%), dipalmitín (99%), cis-9-octadecenoico (99%) NU-CHECK-PREP (Elysian, USA); ácido tridecanoico (98%) Sigma Aldrich (Alemania) y β -sitosterol (\approx 60%) Fluka (Francia).

4.4 Muestras

Se estudiaron pseudobulbos y cormos de ejemplares vivos de ocho especies de orquídeas. Seis de ellas son mantenidas en cultivo, y fueron proporcionadas e identificadas botánicamente por el Dr. Gerardo A. Salazar Ch. quien conserva ejemplares de respaldo en su herbario personal. Estas especies son *Laelia speciosa*, *Laelia autumnalis*, *Prosthechea karwinskii*, *Prosthechea concolor*, *Prosthechea citrina* y *Arpophyllum spicatum*. La especie *Bletia campanulata* se compró en el mercado de Jamaica y fue identificada por la M. en C. Lilia Rico. La especie *Bletia purpurea* se compró en el mercado de flores Cuemanco y el pseudobulbo fue identificado por el Dr. Gerardo A. Salazar Ch.

Para estandarizar la toma de los pseudobulbos y cormos en las especies mantenidas en cultivo, se contó en retroceso la posición de los mismos partiendo del brote mas joven. De esta manera se tomaron el cuarto y quinto brotes; de las especies con pseudobulbos mas grandes (*Laelia speciosa* y *Laelia autumnalis*) sólo se tomó el cuarto brote. La Tabla 5 muestra los datos de cada ejemplar.

Tabla 5. Especies de orquídeas estudiadas en el presente trabajo; datos sobre su procedencia y ejemplares de respaldo.

Especie	No. de colecta	Localidad	No. brote
<i>Arpophyllum spicatum</i>	Salazar 6745	Guerrero, El Monte	4° y 5°
<i>Bletia campanulata</i>	S/N	mercado de Jamaica	indeterminado
<i>Bletia purpurea</i>	S/N	mercado de Flores Cuemanco	indeterminado
<i>Laelia autumnalis</i>	Salazar 6838	Michoacán, Indaparapeo	4°
<i>Laelia speciosa</i>	Salazar S/N	Hidalgo, Metztitlan	4°
<i>Prosthechea citrina</i>	Salazar 7469	Guerrero, Bálsamo	4° y 5°
<i>Prosthechea concolor</i>	Salazar 6460	Guerrero, Omiltemi,	4° y 5°
<i>Prosthechea karwinskii</i>	Salazar 6629	Oaxaca, Pápalo	4° y 5°

4.5 Preparación de las muestras

A todos los pseudobulbos se les retiraron hojas y raíces para lavarlos con agua destilada. Los tallos y hojas de la especie *Arpophyllum spicatum* se utilizaron para el análisis ya que no posee pseudobulbos o cormos, la Figura 4 se presentan las imágenes del material biológico empleado.

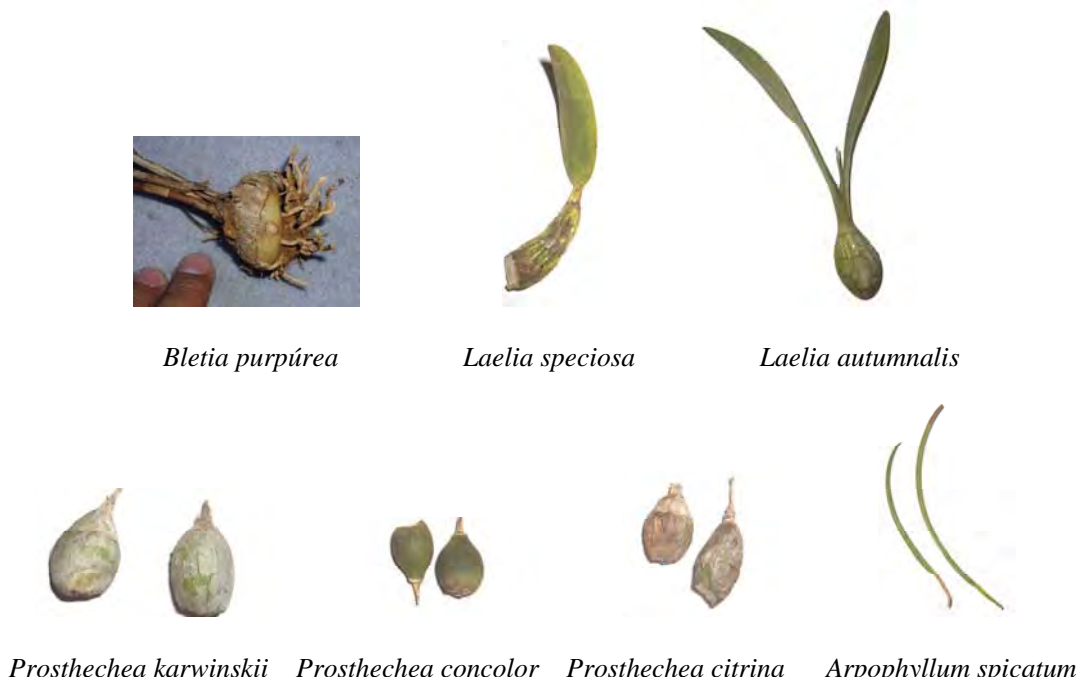


Figura 4. Material biológico empleado en el presente estudio.

4.6 Determinación de carbohidratos

4.6.1 Extracción de mucílago (polisacáridos)

Los seudobulbos o cormos frescos utilizados para extraer el mucílago fueron cortados en piezas muy pequeñas y colocados en un vaso de precipitados de 150 ml o 200 ml, se adicionaron 10 ml de agua destilada por gramo de muestra, la mezcla se calentó a 54 ± 1 °C durante 15 min. Después de enfriar a temperatura ambiente el mucílago extraído se decantó a dos matraces bola de 50 ml para liofilizar. En la Tabla 6 se presentan los pesos de seudobulbo y cormos empleados de cada especie.

Tabla 6. Pesos de los seudobulbos y cormos frescos empleados para extraer polisacáridos.

Especie	Peso (g)
<i>Arpophyllum spicatum</i>	4.353
<i>Bletia campanulata</i>	6.366
<i>Bletia purpurea</i>	12.879
<i>Laelia autumnalis</i> *	10.335
<i>Laelia speciosa</i> *	2.305
<i>Prosthechea citrina</i>	6.900
<i>Prosthechea concolor</i>	3.694
<i>Prosthechea karwinskii</i>	12.697

* El seudobulbo se dividió en dos porciones, una para extraer carbohidratos y otra para extraer lípidos.

4.6.2 Hidrólisis parcial de polisacáridos

Se tomaron aproximadamente 30 mg de mucílago liofilizado y se colocaron en un vial de reacción, se adicionaron 2 ml de ácido sulfúrico 0.05M. El vial con la disolución se colocó en un sistema de reflujo durante 2 h. Al concluir el tiempo de reflujo se permitió a la disolución enfriar a temperatura ambiente para poder neutralizarla con NaOH 2N y liofilizarla.

4.6.3 Derivatización de oligosacáridos obtenidos

Se pesaron aproximadamente 30 mg del hidrolizado liofilizado (obtenido en la sección 4.6.2) y se colocaron en un vial de reacción, se adicionaron 500 µl de una disolución de clorhidrato de hidroxilamina al 2.5%, la disolución se calentó a 80 °C en un horno durante 15 min. Después de enfriar la disolución a temperatura ambiente, se adicionaron 450 µl de hexametildisilano y 50 µl de ácido trifluoroacético. La mezcla se calentó nuevamente a 80 °C por 15 min. Al concluir la reacción se permitió enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente el disolvente se evaporó bajo corriente de nitrógeno. Los derivados obtenidos se disolvieron en 5 ml de isooctano, de esta disolución se inyectó 1 µl al CG. El procedimiento se realizó por duplicado.

4.6.4 Instrumentación y condiciones cromatográficas para analizar oligosacáridos

Se empleó un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de flama (Hewlett Packard 5890 Serie II), con sistema de inyección *Cool On-Column* y control electrónico de presión. *Software HP Chemstation* version A.03.34. Columna capilar de sílice fundida para alta temperatura (ZB-5HT: 5% fenil, 95% polidimetilsiloxano, 15 m x 0.25 mm x 0.10 µm, Zebrón Phenomenex, USA). Se empleó hidrógeno como gas acarreador.

Programa de temperatura: temperatura inicial 40 °C durante 1 min, incrementando 15 °C/min hasta 150 °C, volviendo a incrementar a 4 °C/min hasta 170 °C, y finalmente incrementando a 8 °C/min hasta 370 °C manteniéndose así durante 15 min.

El puerto de inyección permaneció con la función *Oven Track On* (3 °C por encima de la temperatura del horno) y la temperatura del detector fue de 370 °C.

4.7 Determinación de ácidos grasos totales

4.7.1 Extracción de lípidos

Para extraer los lípidos de las especies *Bletia campanulata*, *Bletia purpurea*, *Prosthechea concolor* y *Arpophyllum spicatum* se empleó el material biológico liofilizado después de la extracción de polisacáridos. Para la extracción de lípidos de *Laelia speciosa*, *Laelia autumnalis*, *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea citrina* se liofilizaron nuevos pseudobulbos frescos, Tabla 7.

Tabla 7. Peso de pseudobulbos frescos empleados para extraer lípidos de las especies de orquídeas estudiadas.

Especie	Peso (g)
<i>Laelia autumnalis</i>	7.242
<i>Laelia speciosa</i>	2.373
<i>Prosthechea citrina</i>	5.733
<i>Prosthechea karwinskii</i>	11.370

Los pseudobulbos o cormos liofilizados se colocaron en un mortero de porcelana, con ayuda del pistilo se maceraron hasta obtener casi un polvo. El polvo se colocó en un matraz erlenmeyer de 25 ml y se adicionaron 20 ml de diclorometano. El matraz se colocó en el ultrasonido por 2 h, cada 15 min durante la extracción se adicionó la cantidad de diclorometano que había sido evaporado hasta ese momento (esta extracción ya había sido optimizada en el laboratorio anteriormente).

Se colocaron 250 µl de una disolución de ácido tridecanoico de 2020 ppm (en hexano) como estándar interno en un matraz volumétrico de 5 ml, se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se aforó con el extracto lipídico obtenido previamente. El extracto así adicionado con estándar interno se empleó en todas las siguientes determinaciones.

4.7.2 Hidrólisis de lípidos

Para obtener los ácidos grasos totales se transfirieron 2 ml del extracto lipídico (sección 4.7.1) a un vial de reacción y se llevaron a sequedad bajo corriente de N₂, se adicionaron 1.5 ml de una disolución de KOH/MeOH al 5% y se calentaron a 80 °C durante 60 min. Después de enfriar a temperatura ambiente se adicionaron 2 ml de agua destilada y 2 ml de diclorometano, se agitó durante 1 min con ayuda del vortex. A la fase acuosa se le adicionó 1 ml de disolución HCl/MeOH al 10% y 2ml de diclorometano, la disolución resultante se agitó durante 1 min en el vortex. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se decantó a un vial de reacción y se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ para su posterior esterificación. El procedimiento se llevó a cabo por duplicado.

4.7.3 Esterificación de ácidos grasos

Para poder analizar a los ácidos grasos mediante cromatografía de gases se formaron los ésteres metílicos de ácidos grasos.

Al residuo obtenido después de la hidrólisis se le adicionó 1ml de una disolución de HCl al 10% en MeOH y 1ml de una disolución de BF₃/MeOH al 10%, la mezcla se calentó a 80 °C durante 60 min. Después de enfriar a temperatura ambiente se adicionaron 2 ml de hexano y se

neutralizó con NaHCO_3 al 4%, se agitó durante 1 min. La fase orgánica se extrajo dos veces más con 2 ml de hexano cada una y se lavó con 4 ml de agua destilada, posteriormente se secó con sulfato de sodio. La solución final se concentró a 1 ml bajo corriente de nitrógeno para después inyectar 1 μl al CG.

4.7.4 Identificación de esteres metílicos de ácidos grasos

Para la identificación de los ácidos grasos como ésteres metílicos se empleó el tiempo de retención relativo **trr**, de los estándares correspondientes. La presencia de los analitos se confirmó mediante CG-EM.

4.7.5 Instrumentación y condiciones cromatográficas para la identificación de ácidos grasos

Se empleó el equipo descrito en la sección 4.6.4., con columna capilar ZB-WAX (fase líquida 100% polietilenglicol, 30m x 0.25mm x 0.25 μm , Zebrón Phenomenex, USA).

Programa de temperatura: temperatura inicial de 40 °C durante 1 min, incrementando a 10 °C/min hasta 250 °C para permanecer isotérmicamente durante 10 min. La temperatura del detector fue de 250 °C. El puerto de inyección permaneció con la función *Oven Track On* (3 °C arriba de la temperatura del horno). Se empleó hidrógeno como gas acarreador, a un flujo constante de 2.44 ml/min.

Para la confirmación de los compuestos se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Pakcard 5890, con inyector split/splitless modo split 15/1, acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett

Pakard 5971 (con impacto electrónico y analizador cuadrupolar), software HP G1034C versión C.03.00. Columna capilar (ZB-5: 5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30m x 0.25mm x 0.25µm, marca Zebrón Phenomenex, USA). Se empleó helio como gas acarreador.

Programa de temperatura: temperatura inicial 40 °C, incrementando a 10 °C /min hasta 300 °C manteniéndose así durante 15 min. La temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 280 °C, y la temperatura de la fuente de ionización en 175 °C. El potencial de ionización fue de 70 eV y la adquisición se realizó en modo barrido total (SCAN) de 50 a 550 *m/z*.

4.8 Determinación de lípidos simples

Se colocó 1ml del extracto lipídico, obtenido en la sección 4.7.2, en un vial de reacción de 5 ml y se evaporó el disolvente bajo corriente de nitrógeno, se adicionaron 2 ml de agua destilada, 1 ml de disolución saturada de cloruro de sodio y 2 ml de butanol al 10% en hexano, la mezcla se agitó durante 1 min. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se decantó a un vial de reacción y se concentró a 0.5 ml bajo corriente de nitrógeno para su posterior derivatización.

4.8.1 Derivatización de lípidos simples

A la disolución obtenida en la sección 4.8 se adicionaron 100µl de BSTFA, 100µl de HMDS y 50µl de piridina, se colocó en un horno a 80 °C durante 60min. Después de enfriar a temperatura ambiente se inyectó 1µl al CG.

4.8.2 Identificación de lípidos simples

Para la identificación conjunta de ácidos grasos libres, esteroides y acilglicéridos se emplearon los tiempos de retención relativos **trr**, de los estándares correspondientes.

4.8.3 Instrumentación y condiciones cromatográficas para la identificación de lípidos simples

Se empleó el equipo y columna descritos en la sección 4.6.4. Se utilizó hidrógeno como gas acarreador.

Programa de temperatura: temperatura inicial 45 °C durante 1.5 min, incrementándose a 20 °C/min hasta 250 °C, para incrementarse después a 10 °C/min hasta 380 °C permaneciendo así durante 10.25 min. La temperatura del detector fue de 380 °C y el puerto de inyección permaneció con la función *Oven Track On* (3 °C por encima de la temperatura del horno). Se empleó hidrógeno como gas acarreador, a un flujo constante de 2.44 ml/min.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de carbohidratos

Para obtener el perfil de carbohidratos del mucílago extraído de los pseudobulbos de orquídeas se empleó una metodología anteriormente desarrollada en el laboratorio cuyo trabajo fue publicado en 1995 (Peña, *et al.*, 1995). En dicho trabajo se demuestra que el perfil de los azúcares libres obtenido después de la hidrólisis total del mucílago, no es lo suficientemente específico para diferenciar entre mucílagos de diferentes orquídeas, ya que en general se descomponen en los mismos monosacáridos. Por lo anterior se propuso realizar la hidrólisis parcial bajo condiciones suaves (H_2SO_4 0.05M con 2h de reacción), esperando obtener perfiles característicos de carbohidratos separados en mono, di y trisacáridos, como se logró en el trabajo mencionado.

Para la identificación se establecieron intervalos de tiempos de retención correspondientes a los mono, di y trisacáridos a partir de los derivados OX-TMS de carbohidratos estándares: arabinosa, ramnosa, fructosa, galactosa, glucosa, sacarosa y rafinosa, la Tabla 6 muestra estos valores. La Tabla 7 presenta los carbohidratos identificados en las muestras con los diferentes grados de polimerización (GP).

Tabla 6. Tiempos de retención de estándares de carbohidratos derivatizados a OX-TMS.

Grado de polimerización	Estándar	tr (min)
GP1	Arabinosa	9.651
	Ramnosa	10.304
	Fructosa	11.916
	(sin y anti)	12.009
	Galactosa	12.564
	Glucosa (sin y anti)	12.742 12.911
GP2	Sacarosa	20.339
GP3	Rafinosa	26.384

GP1, 2, 3 = grado de polimerización = mono, di o tri sacáridos respectivamente.

Tabla 7. Carbohidratos identificados en las ocho especies de orquídeas estudiadas.

Especie de orquídea	GP1	GP2	GP3
<i>Arpophyllum spicatum</i>	●	●	—
<i>Bletia campanulata</i>	●	●	●
<i>Bletia purpurea</i>	●	●	●
<i>Laelia autumnalis</i>	●	●	●
<i>Laelia speciosa</i>	●	●	—
<i>Prosthechea citrina</i>	●	●	●
<i>Prosthechea concolor</i>	●	●	●
<i>Prosthechea karwinskii</i>	●	●	●

GP1, 2, 3 = grado de polimerización = mono, di o trisacáridos respectivamente.

Después de realizar la hidrólisis parcial del mucílago de cada orquídea y su posterior conversión a derivados oxima trimetilsilil (OX-TMS), se obtuvieron los perfiles de carbohidratos de las ocho especies estudiadas. En la Tabla 8 se muestran las áreas del conjunto de picos correspondientes a los grados de polimerización GP1, GP2 y GP3 (mono, di y tri sacáridos respectivamente), con la diferencia porcentual obtenida para dos ensayos realizados al mucílago. En la mayoría de los perfiles se observa una diferencia menor o

cercana al 10% a excepción de las especies *L. speciosa*, y *L. autumnalis* en las cuales la variación es mayor al 10%. Esta variación podría deberse a errores en la preparación de esas muestras sin embargo, el perfil de mono, di y trisacáridos no se vió afectado.

Tabla 8. Unidades de área del conjunto de picos correspondientes a cada grado de polimerización.

Orquídea	Grado de polimerización		A1	A2	% diferencia
	GP1	GP2			
<i>Arpophyllum spicatum</i>	GP1	GP2	1296925	1599115	13.5
	GP2	GP3	140579.5	161411	12.9
	GP3		16570	16345.5	1.3
<i>Bletia campanulata</i>	GP1	GP2	2504122	2576369.5	2.8
	GP2	GP3	637015.5	615434.5	3.4
	GP3		18477	17003	8.0
<i>Bletia purpurea</i>	GP1	GP2	5323876	5488067.5	3.0
	GP2	GP3	1215974.5	1425823	14.7
	GP3		292741.5	289160.5	1.2
<i>Laelia autumnalis</i>	GP1	GP2	7210699	5562417.5	22.8
	GP2	GP3	968717	742082	23.4
	GP3		193967	153854.5	20.7
<i>Laelia speciosa</i>	GP1	GP2	962780.5	718958.5	25.3
	GP2	GP3	40633.5	29985	26.2
	GP3		595	434.5	26.9
<i>Prosthechea citrina</i>	GP1	GP2	3414466	3778061.5	9.6
	GP2	GP3	226891.5	242195.5	6.3
	GP3		35825	32078	10.5
<i>Prosthechea concolor</i>	GP1	GP2	2008293	1861583.5	7.3
	GP2	GP3	303371	275177	9.3
	GP3		101854.5	113130.5	10.0
<i>Prosthechea karwinskii</i>	GP1	GP2	6192601	6649235	6.9
	GP2	GP3	725846	752904	3.6
	GP3		156607	138899	11.3

GP1, 2, 3 = grado de polimerización = mono, di o trisacáridos respectivamente.
A1, A2 = área promedio (n=2) correspondientes a dos diferentes ensayos.

Los cromatogramas de las Figuras 5 a 12 muestran el perfil de carbohidratos obtenido de cada especie de orquídea analizada. En todos ellos se observa que la proporción de monosacáridos es mayor que la de disacáridos, y la proporción de éstos a su vez es mayor que la de trisacáridos.

Al comparar el perfil de carbohidratos de las orquídeas estudiadas, se observa que de acuerdo a la proporción de los diferentes grados de polimerización identificados, existe semejanza entre *B. campanulata* (Figura 5), *L. autumnalis* (Figura 6), *B. purpurea* (Figura 7) y *P. karwinskii* (Figura 8) aunque estas dos últimas no están reportadas como productoras de *tzauhtli*. Los cuatro perfiles mencionados coinciden con el perfil de *B. campanulata*, obtenido bajo las mismas condiciones reportado con anterioridad (Peña, *et al.*, 1995).

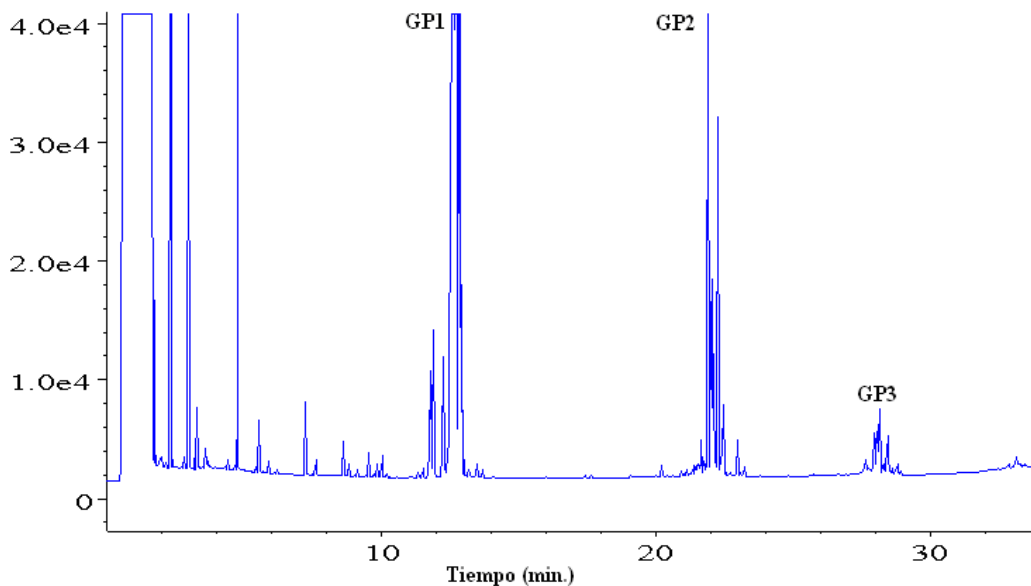


Figura 5. Cromatograma de OX-TMS de carbohidratos después de la hidrólisis parcial del mucílago de *Bletia campanulata*.

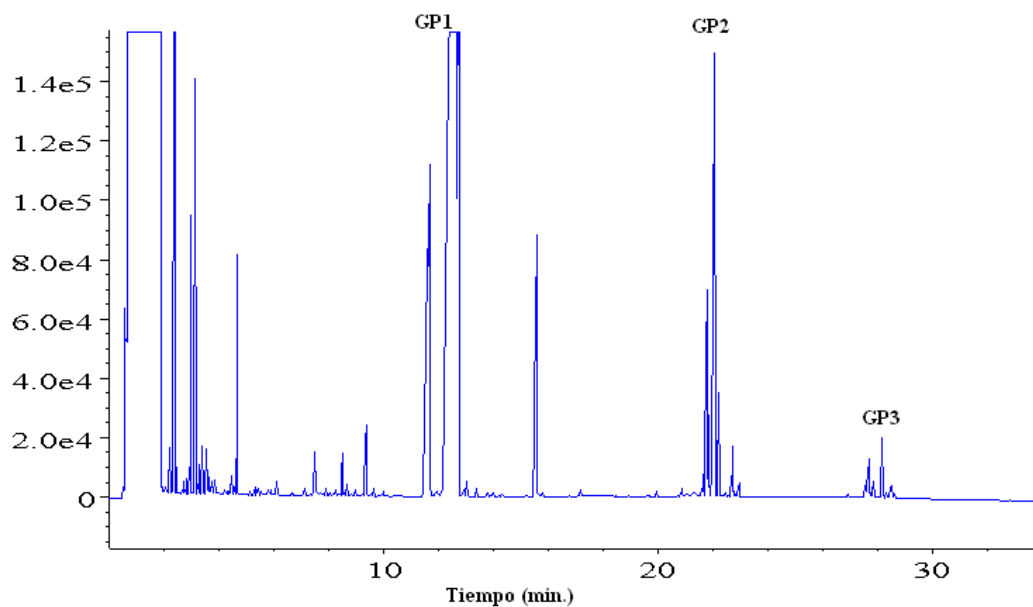


Figura 6. Cromatograma de OX-TMS de carbohidratos después de la hidrólisis parcial del mucílago de *Laelia atumnalis*.

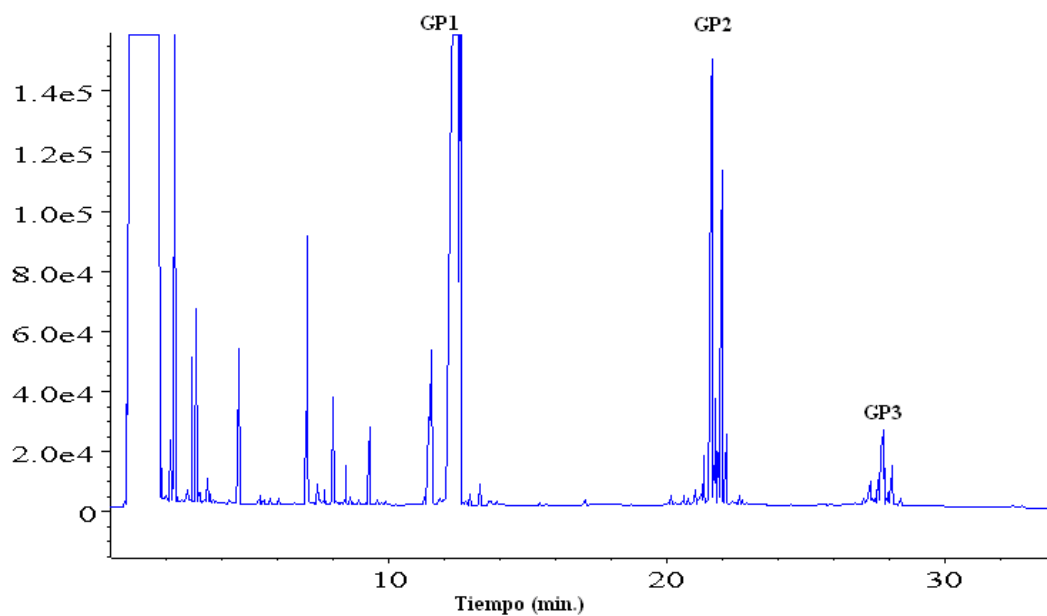


Figura 7. Cromatograma de OX-TMS de carbohidratos después de la hidrólisis parcial del mucílago de *Bletia purpurea*.

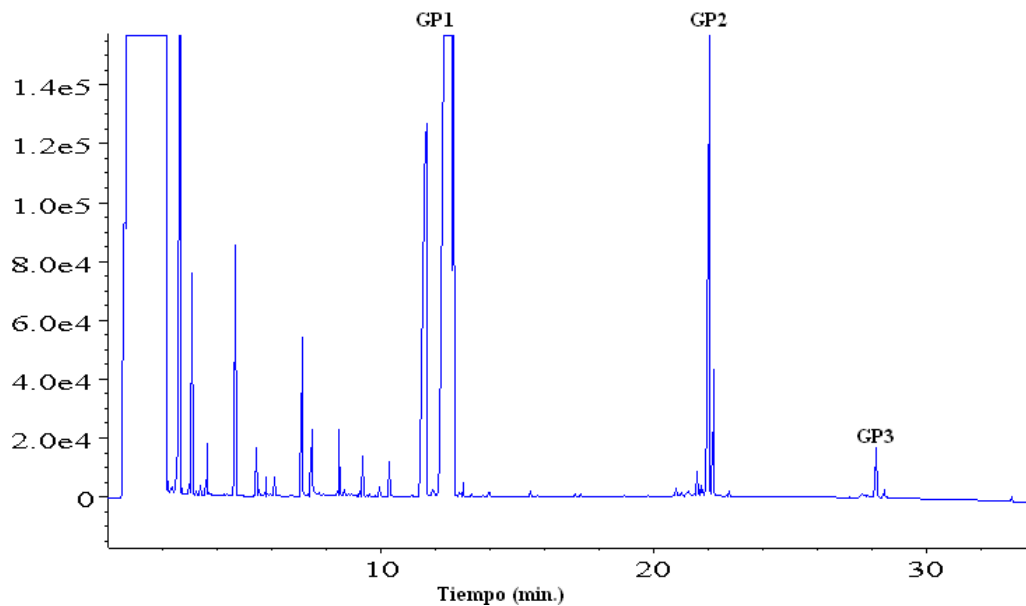


Figura 8. Cromatograma de OX-TMS de carbohidratos después de la hidrólisis parcial del mucílago de *Prosthechea karwinskii*.

Por otro lado, las orquídeas, *P. concolor*, *P. citrina*, *L. speciosa* y *A. spicatum* presentan un perfil diferente a las cuatro orquídeas anteriores. El perfil de *P. concolor* (Figura 9) y el perfil de *P. citrina* (Figura 10) se asemejan en cuanto a la proporción de di- y trisacáridos pero la proporción de monosacáridos es diferente. El perfil de *L. speciosa* (Figura 11) y el de *A. spicatum* (Figura 12) son diferentes al perfil de las otras orquídeas, mostrando en general el menor contenido de carbohidratos. En ambos la proporción de disacáridos es la más pequeña con respecto a las otras especies, y los trisacáridos prácticamente no se detectaron.

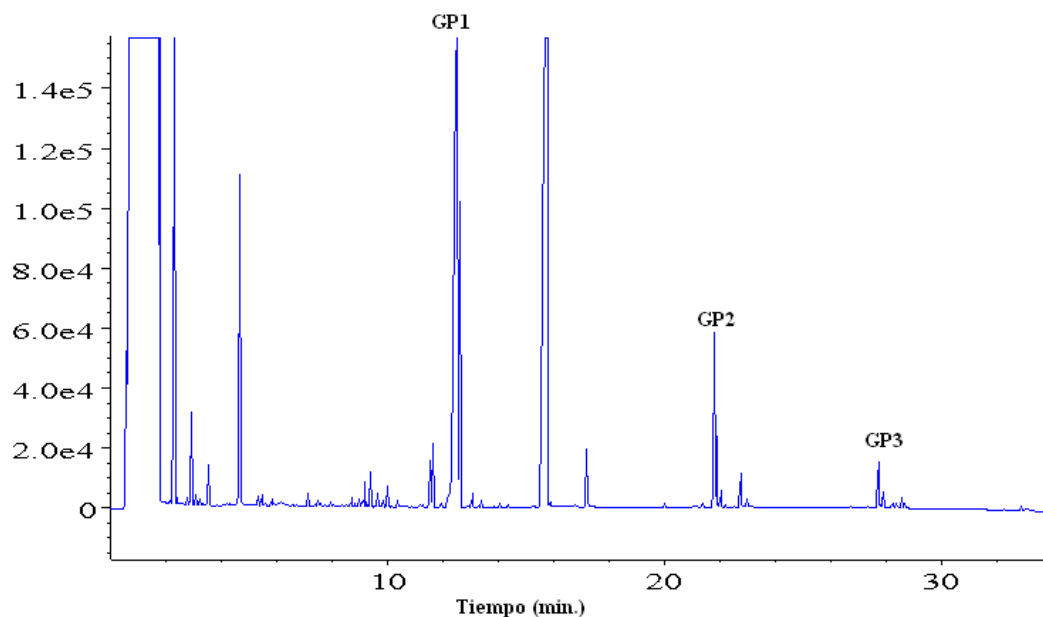


Figura 9. Cromatograma de OX-TMS de carbohidratos después de la hidrólisis parcial del mucílago de *Prosthechea concolor*.

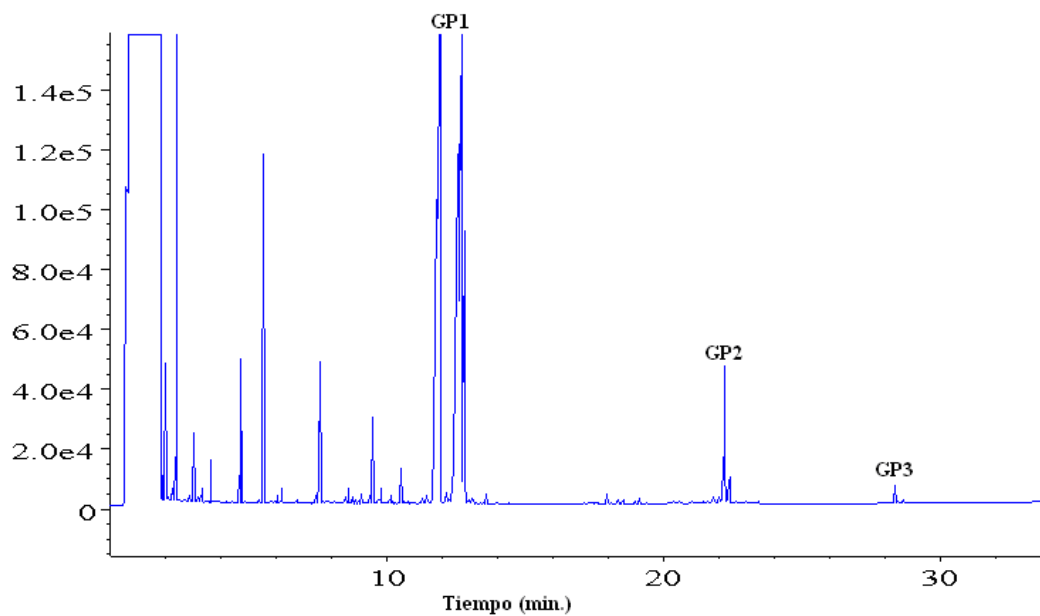


Figura 10. Cromatograma de OX-TMS de carbohidratos después de la hidrólisis parcial del mucílago de *Prosthechea citrina*.

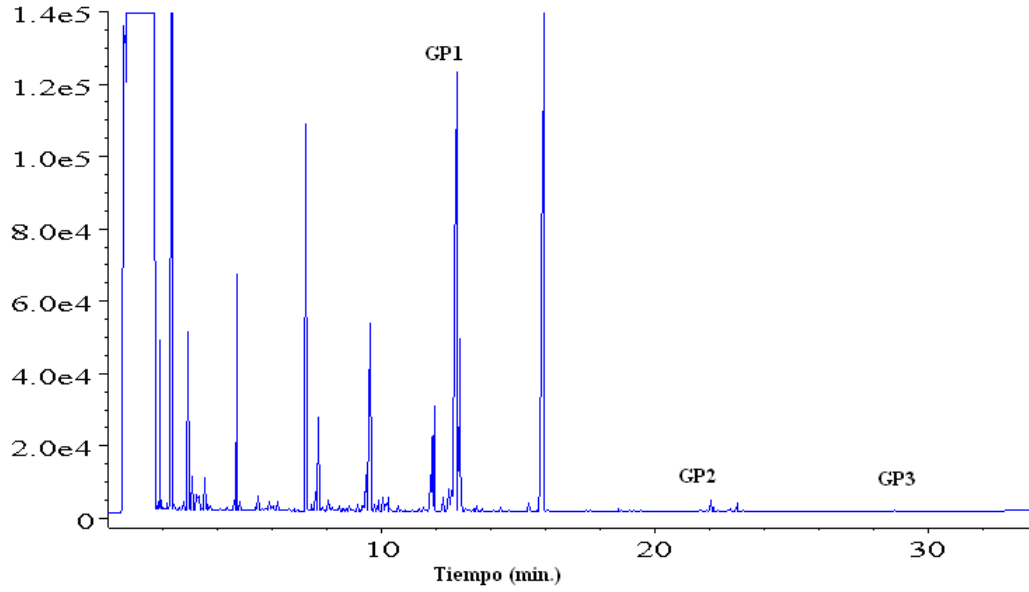


Figura 11. Cromatograma de OX-TMS de carbohidratos después de la hidrólisis parcial del mucílago de *Laelia speciosa*.

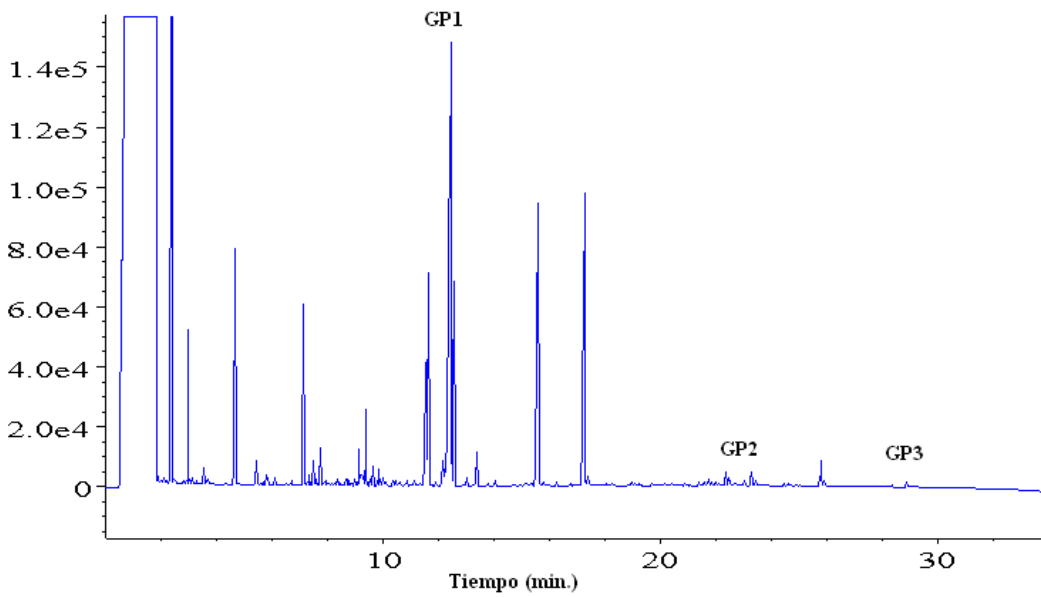


Figura 12. Cromatograma de OX-TMS de carbohidratos después de la hidrólisis parcial del mucílago de *Arpophyllum spicatum*.

Como se observa, se obtuvieron diferentes perfiles de carbohidratos; un perfil para cuatro orquídeas (*B. campanulata*, *L. autumnalis*, *B. purpurea* y *P. karwinskii*) el cual coincide con el reportado con anterioridad (Peña et al., 1995) y un perfil diferente para cada una de las otras orquídeas estudiadas. Por lo que se podría pensar que no existe un único perfil de carbohidratos específico para el *tzauhtli*. Otra posibilidad que proporcionan estos resultados, es que de las orquídeas estudiadas sólo cuatro producen un mucílago que corresponde al *tzauhtli*; y las otras cuatro a pesar de estar reportadas en la literatura como productoras de este mucílago, no lo producen.

El perfil de carbohidratos de los mucílagos estudiados no permite agrupar botánicamente a las orquídeas que le dieron origen, debido a que las cuatro especies que presentaron el mismo perfil poseen diferencias botánicas. Sólo *B. campanulata* y *B. purpurea* pertenecen al mismo género y son orquídeas terrestres; *L. autumnalis* y *P. karwinskii* pertenecen a géneros diferentes y ambas son epífitas.

Por otro lado las orquídeas que presentan perfiles diferentes coinciden en algunas características. *P. concolor* y *P. citrina* pertenecen al mismo género, pero *L. speciosa* y *A. spicatum* pertenecen a géneros diferentes sin embargo, las cuatro son epífitas. En el caso particular de *A. spicatum* las diferencias en su perfil de carbohidratos podrían deberse a que el análisis se realizó con el tallo y la hoja (debido a la ausencia de pseudobulbos o cormos en esta especie).

Lo anterior podría demostrar que la forma de vida o género al que pertenece cada especie estudiada no es determinante en su producción de carbohidratos.

5.2 Determinación de lípidos

5.2.1 Extracción de lípidos totales

Para la extracción de lípidos totales en los pseudobulbos primero se empleó el método Bligh-Dyer (1959) modificado, optimizado anteriormente en el laboratorio (Martínez, 2007). Se empleó un sistema de diclorometano-metanol (2:1 v/v) como disolvente de extracción. La extracción se realizó con una muestra de pseudobulbo fresco de *L. speciosa* a la cual se adicionó ácido tridecanoico como estándar interno. El extracto lipídico se sometió a hidrólisis y esterificación (Martínez, 2007) para obtener los metil ésteres de los ácidos grasos totales y poder analizarlos por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama (CG-FID).

Posteriormente se realizó la extracción con el mismo procedimiento, a una muestra liofilizada de pseudobulbo de la misma orquídea. También se sometió a hidrólisis y esterificación, y posteriormente se analizó por CG. En este caso los picos en el cromatograma presentaron un tamaño considerablemente menor, indicando una menor extracción de lípidos. Este comportamiento se atribuyó a que la muestra estaba liofilizada y por lo tanto carecía de agua; y el agua separa a los componentes celulares de los lípidos extraídos en el sistema diclorometano-metanol.

Debido a estos resultados se decidió realizar la extracción de lípidos mediante ultrasonido utilizando diclorometano como disolvente extractante. Esta técnica se eligió ya que había sido empleada en el laboratorio anteriormente para la extracción de lípidos en pseudobulbos de orquídeas, y en algunos trabajos reportados en la literatura (Flores *et al.*, 2006).

La extracción con ultrasonido se basa en la ruptura de las membranas celulares por acción mecánica, liberando los componentes de los tejidos sin importar el contenido de agua. En la literatura se ha reportado la comparación de las técnicas Soxhlet, ultrasonido y líquidos presurizados para la extracción de ácidos grasos en tejidos vegetales secos (Flores *et al.*, 2006); y se muestra que con las tres técnicas se obtuvieron los mismos resultados cualitativos sin embargo, las extracciones con ultrasonido y con líquidos presurizados tienen la ventaja de requerir menor tiempo de extracción y menor volumen de disolvente que el Soxhlet.

5.2.2 Determinación de ácidos grasos totales

Se esterificó una mezcla de estándares de ácidos grasos (C10:0, C13:0, C16:0, C18:0, C18:1[9], C18:2[9,12]) para su posterior análisis mediante CG-FID, de la cual se obtuvo un cromatograma con buena resolución y forma de los picos correspondientes a los ésteres metílicos de ácidos grasos. La Tabla 9 muestra los tiempos de retención relativos **trr** de los estándares utilizados para la identificación.

Tabla 9. Tiempos de retención relativos de estándares de ácidos grasos como ésteres metílicos.

Estándar	trr
EM10:0	0.787
EM13:0 EI	1.000
EM16:0	1.186
EM18:0	1.299
EM18:1 [9]	1.311
EM18:2 [9,12]	1.337

EM = éster metílico

10:0 ac. decanoico, 13:0 ac. tridecanoico, 16:0 ac. hexadecanoico, 18:0 ac. Octadecanoico, 18:1 ac. cis-9-octadecenoico, 18:2 ac. cis,cis-9,12-octadecenoico.

A pesar de que la adición del estándar interno a las muestras solo se usó como referencia para predecir los tiempos de retención de los ácidos grasos contenidos en cada muestra, también nos permitió observar el desempeño del método. Al analizar los ésteres metílicos de los ácidos grasos identificados en las muestras, se observa que el tamaño del pico correspondiente al estándar interno varía en todas las muestras como se puede apreciar en los diferentes cromatogramas (Figuras 13 a 20). Este comportamiento podría atribuirse al efecto de matriz. Las determinaciones se realizaron por duplicado, y en ambos ensayos se identificaron los mismos ácidos grasos. Las áreas de los picos correspondientes a los ácidos grasos identificados tuvieron diferencias porcentuales mayores al 10%, y por otro lado no se realizaron experimentos para calcular el % de recobro del método. Sin embargo, el método permitió conocer la presencia de ácidos grasos totales en los pseudobulbos y cormos estudiados en forma cualitativa como una primera aproximación a su estudio.

Mediante CG-FID se identificaron en total cuatro ácidos grasos lineales como ésteres metílicos en cada una de las ocho orquídeas analizadas, dos saturados y dos insaturados todos con número par de átomos de carbono. En la Tabla 10 se presentan los ácidos grasos identificados en los pseudobulbos y cormos de cada especie de orquídea. Cabe destacar que los cuatro ácidos grasos determinados son muy frecuentes en el reino vegetal y animal (Christie, 1987).

Tabla 10. Ácidos grasos como ésteres metílicos en los pseudobulbos de diferentes especies de orquídeas identificados mediante CG-FID.

Especie de orquídea	EM10:0	EM16:0	EM18:0	EM18:1[9]	EM18:2[9,12]
<i>Arpophyllum spicatum</i>	—	•	•	•	•
<i>Bletia campanulata</i>	—	•	•	•	•
<i>Bletia purpurea</i>	—	•	•	•	•
<i>Laelia autumnalis</i>	—	•	•	•	•
<i>Laelia speciosa</i>	—	•	•	•	•
<i>Prosthechea citrina</i>	—	•	•	•	•
<i>Prosthechea concolor</i>	—	•	•	•	•
<i>Prosthechea karwinskii</i>	—	•	•	•	•

EM = éster metílico del ácido graso correspondiente.

Los ácidos grasos identificados como ésteres metílicos en las orquídeas se muestran en los cromatogramas de las Figuras 13 a 20. La resolución obtenida entre los ácidos grasos con el mismo número de carbonos (EM18:0 y EM18:1[9]) oscila entre 1.5 y 1.7 la cual se considera buena.

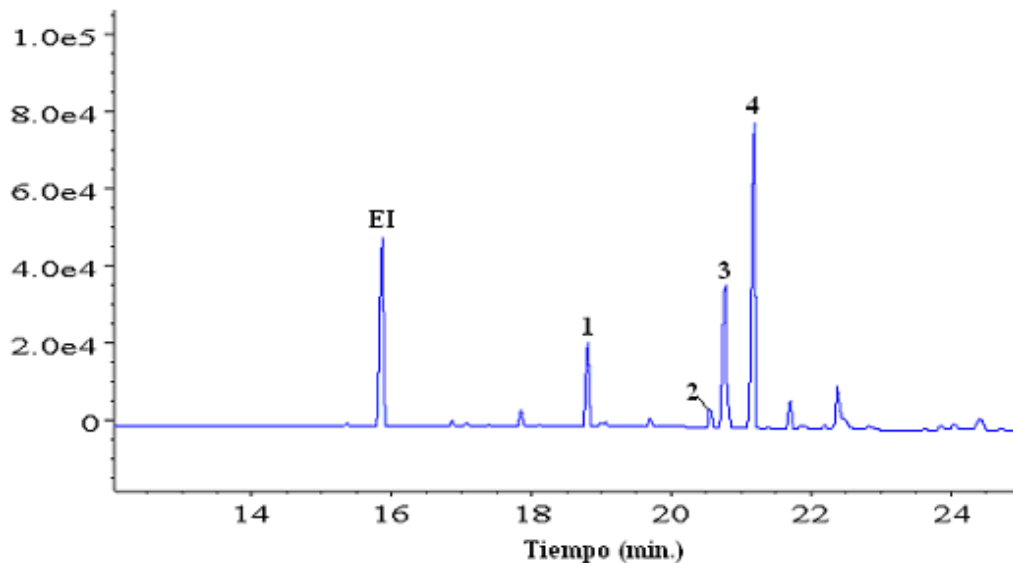


Figura 13. Cromatograma de esteres metílicos de los ácidos grasos de *Bletia campanulata*: EI = estándar interno, 1.EM16:0, 2.EM18:0, 3.EM18:1[9], 4.EM18:2[9,12].

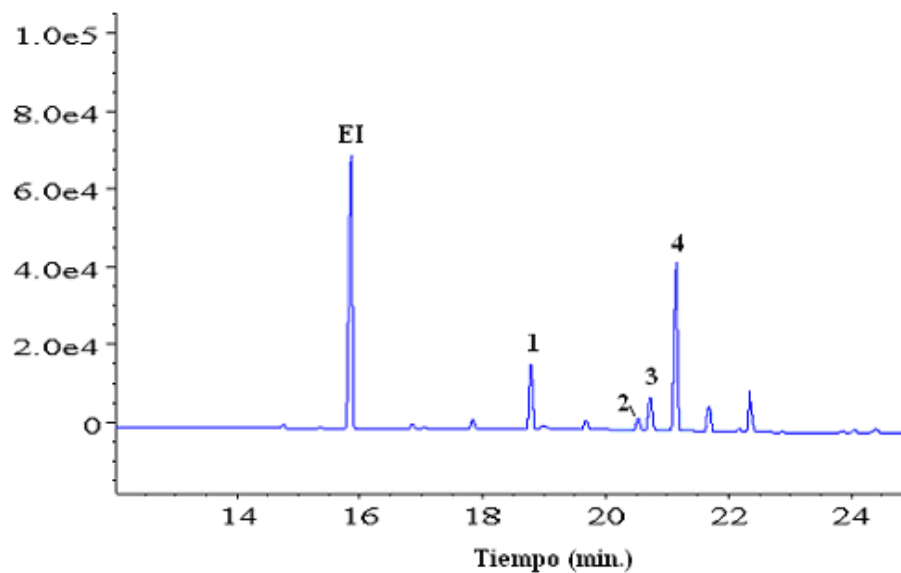


Figura 14. Cromatograma de esteres metílicos de los ácidos grasos de *Bletia purpurea*: EI = estándar interno, 1.EM16:0, 2.EM18:0, 3.EM18:1[9], 4.EM18:2[9,12].

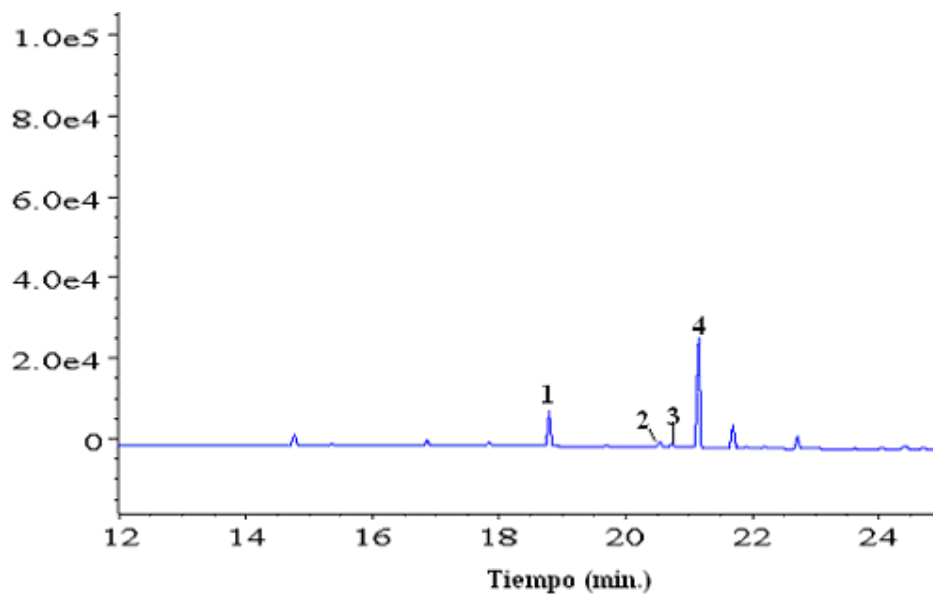


Figura 15. Cromatograma de esteres metílicos de los ácidos grasos de *Laelia autumnalis*: 1.EM16:0, 2.EM18:0, 3.EM18:1[9], 4.EM18:2[9,12].

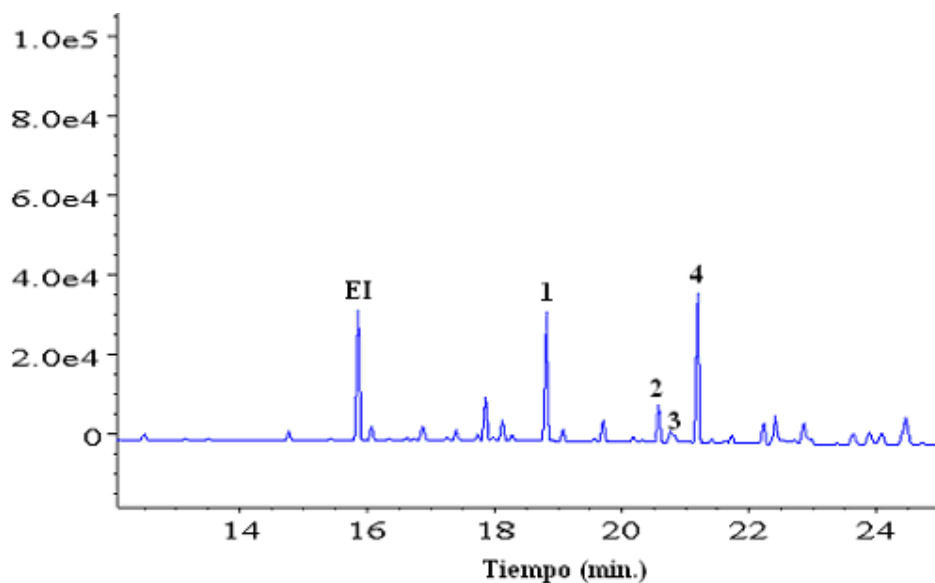


Figura 16. Cromatograma de esteres metílicos de los ácidos grasos de *Prosthechea karwinskii*: EI = estándar interno, 1.EM16:0, 2.EM18:0, 3.EM18:1[9], 4.EM18:2[9,12].

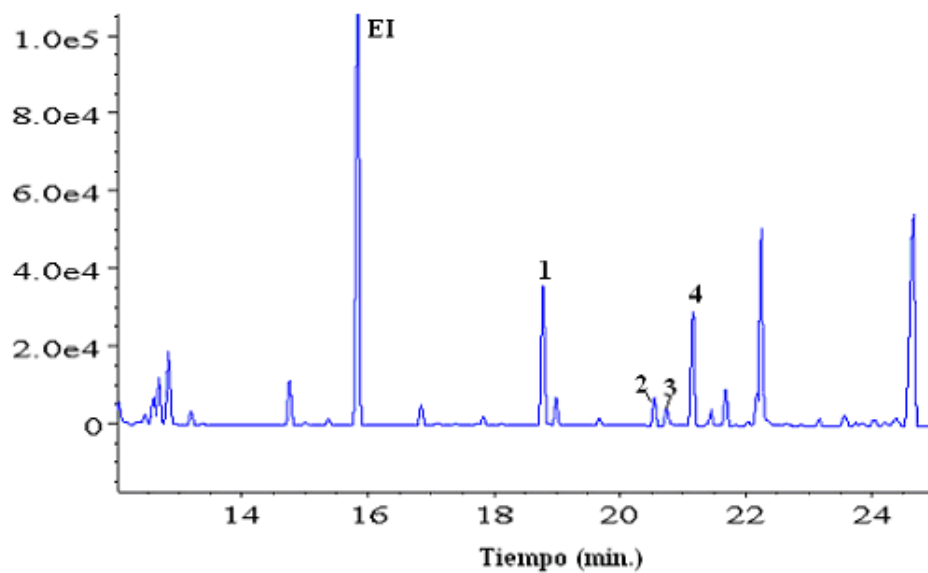


Figura 17. Cromatograma de esteres metílicos de los ácidos grasos de *Prosthechea concolor*: EI = estándar interno, 1.EM16:0, 2.EM18:0, 3.EM18:1[9], 4.EM18:2[9,12].

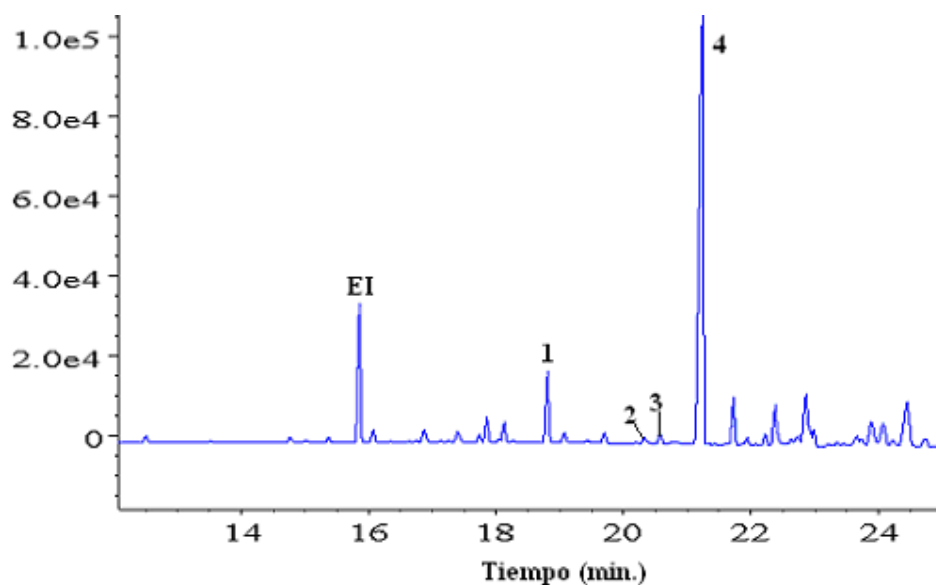


Figura 18. Cromatograma de esteres metílicos de los ácidos grasos de *Prosthechea citrina*: EI = estándar interno, 1.EM16:0, 2.EM18:0, 3.EM18:1[9], 4.EM18:2[9,12].

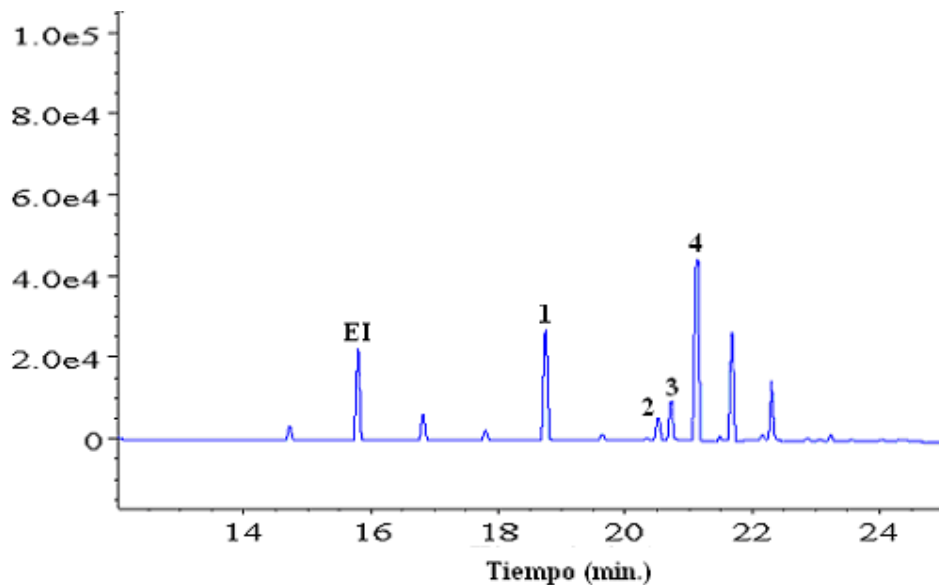


Figura 19. Cromatograma de esteres metílicos de los ácidos grasos de *Arpophyllum spicatum*: EI = estándar interno, 1.EM16:0, 2.EM18:0, 3.EM18:1[9], 4.EM18:2[9,12].

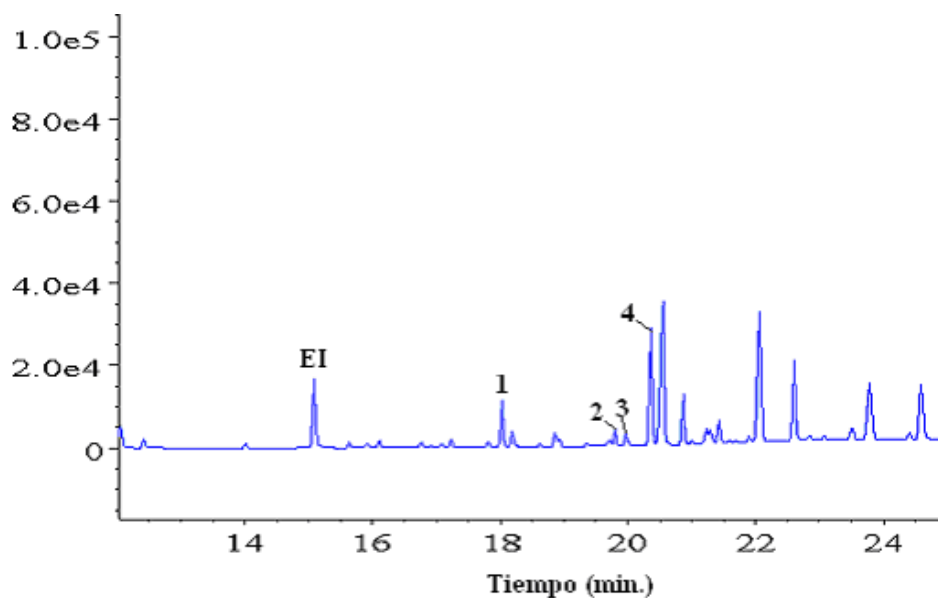


Figura 20. Cromatograma de esteres metílicos de los ácidos grasos de *Laelia speciosa*: EI = estándar interno, 1.EM16:0, 2.EM18:0, 3.EM18:1[9], 4.EM18:2[9,12].

El perfil de ácidos grasos identificado en cada orquídea estudiada fue comparado mediante el área normalizada correspondiente a cada pico. La Figura 21 presenta en forma gráfica estos datos y en ella se puede apreciar que la proporción de área de cada ácido graso varía de una especie a otra. En el perfil de cada orquídea el ácido palmítico (EM16:0) y el ácido linoleico (EM18:2[9,12]) se encuentran en mayor proporción excepto en *B. campanulata*, ya que en este perfil se observa mayor proporción de ácido oleico (EM 18:1[9]) que de ácido palmítico (EM16:0); a su vez, esta especie fue la que presentó la mayor proporción de ácido oléico (EM 18:1[9]) y *P. concolor* presentó la mayor proporción de los ácidos palmítico (EM16:0) y esteárico (EM18:0). Por otro lado *A. spicatum*, *B. campanulata* y *P. concolor* contienen la mayor proporción de ácidos grasos totales (determinados con CG-FID) con respecto al resto de las orquídeas estudiadas.

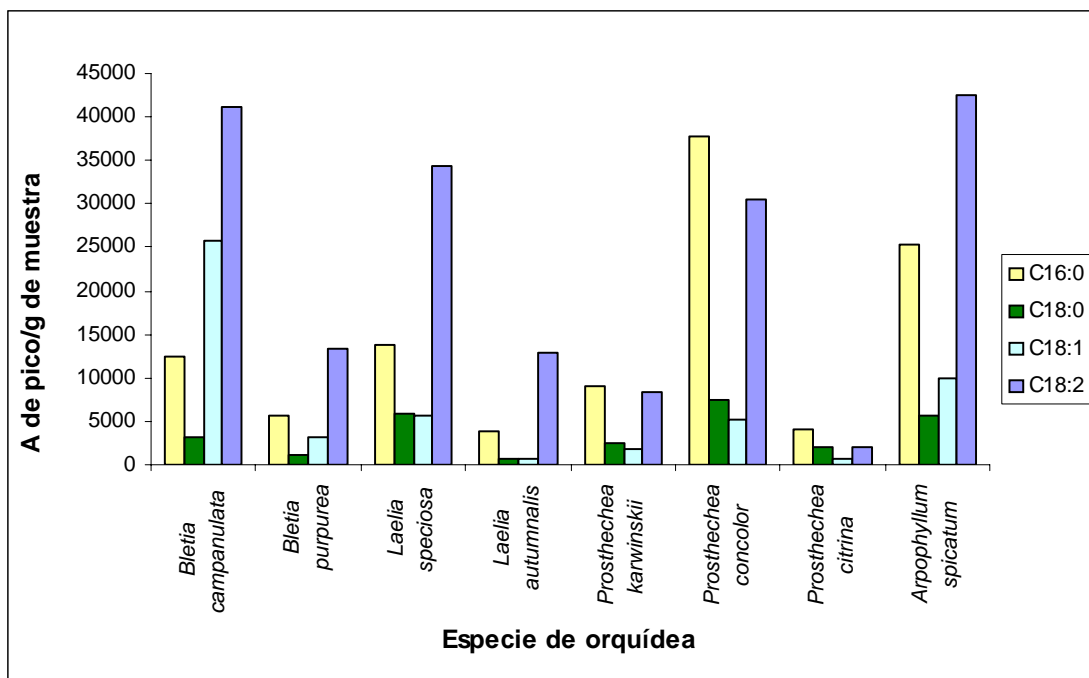


Figura 21. Proporciones de ácidos grasos determinados en los pseudobulbos de las especies de orquídeas estudiadas.

La identidad de los analitos se confirmó empleando Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) identificando 7 ácidos grasos lineales más que los identificados previamente por CG-FID. Estos ácidos grasos son C8:0, C9:0, C10:0, C12:0, C14:0, C15:0 y C17:0 así como el ácido bencenpropanoico. En la Tabla 11 se enlistan los ácidos grasos identificados en cada pseudobulbo o corno analizado.

Los ácidos grasos comúnmente encontrados en organismos superiores contienen un número par de átomos de carbono (Christie, 1982) sin embargo, en las ocho especies de orquídeas estudiadas se identificaron tres ácidos grasos con número de carbono impar (EM9:0, EM15:0 y EM17:0) aunque en proporciones muy pequeñas.

Tabla 11. Ácidos grasos identificados mediante CG-EM en los pseudobulbos de las especies estudiadas.

Compuesto	<i>Bletia campanulata</i>	<i>Bletia purpurea</i>	<i>Laelia speciosa</i>	<i>Laelia autumnalis</i>	<i>Prosthechea karwinskii</i>	<i>Prosthechea concolor</i>	<i>Prosthechea citrina</i>	<i>Arpophyllum spicatum</i>
EM8:0	•	•	•	•	•	—	—	•
EM9:0	•	•	•	•	•	•	•	•
EM10:0	—	—	•	•	•	•	•	•
EM12:0	•	•	•	•	•	•	•	•
EM14:0	•	•	•	•	•	•	•	•
EM15:0	•	•	•	•	•	•	•	•
EM16:0	•	•	•	•	•	•	•	•
EM17:0	—	•	—	•	•	•	•	•
EM18:0	•	•	•	•	•	•	•	•
EM18:1[9]	•	•	•	•	•	•	•	•
EM18:2[9,12]	•	•	•	•	•	•	•	•
EMBP	•	•	—	•	•	•	•	•

EM = éster metílico del ácido graso correspondiente, BP = bencenpropanoico

Por otro lado, Holman y Nichols (1972) determinaron la composición de ácidos grasos en pseudobulbos de diferentes géneros de orquídeas (*Phalaenopsis*, *Cattleya* y *Cymbidium*); en todos los pseudobulbos también encontraron ácidos grasos con número impar de átomos de carbono (incluyendo al C15:0 y C17:0) mediante CG-EM. La presencia de estos ácidos grasos podría atribuirse a la contaminación de los pseudobulbos con microorganismos ya que se sabe que éstos sintetizan ácidos grasos con número impar de átomos de carbono (Christie, 1982; O'Leary, 1962).

5.2.2 Determinación de lípidos simples

El análisis de lípidos simples se llevó a cabo con dos objetivos, conocer el perfil de estos compuestos en las orquídeas estudiadas y conocer el tipo de lípidos simples que le dieron origen a los ácidos grasos totales identificados previamente. Para lo anterior se empleó una

metodología ya establecida en el laboratorio (Martínez, 2007). Para la identificación se establecieron intervalos de tiempos de retención relativos de estándares derivatizados de la misma manera (ac. tridecanoico C13:0, ac. hexadecanoico C16:0, ac. linoleico C18:2[9], monopalmitín MG16:0, monolinolein MG18:2[9], dipalmitín DG16:0, diestearín DG18:0, tripalmitín TG16:0, triestearín TG18:0 y β -sitosterol), la Tabla 12 muestra sus valores.

Se formaron los trimetilsilil derivados de ácidos grasos libres, glicéridos y esterole de los extractos lipídicos de *B. campanulata*, *B. purpurea*, *L. autumnalis* y *P. karwinskii* (obtenidos en el inciso 4.8.1 de la sección 4). La Tabla 13 muestra el área del conjunto de picos correspondientes a ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y β -sitosterol, con la diferencia porcentual obtenida en dos ensayos realizados. En el perfil de *B. purpúrea*, *B. campanulata* y *L. autumanlis* se observa una diferencia porcentual menor o cercana al 10%, el perfil de *P. karwinskii* mostró los coeficientes de variación más altos, pero todos fueron aceptables para la determinación cualitativa de estos compuestos.

Tabla 12. Intervalos de **trr** para estándares de ácidos grasos libres, esterole y acilglicerole.

Compuesto	Intervalos de trr
AG libres	1.000-1.262
MG	1.459-1.532
β -sitosterol	1.822
DG	2.184-2.361
TG	2.849-3.119

AG=ácidos grasos, MG=monoglicéridos, DG=diglicéridos, TG=triglicéridos.

Tabla 13. Unidades de área del conjunto de picos correspondiente a ácidos grasos libres, glicéridos y β -sitosterol, encontrados en las muestras.

Orquídea	Lípidos simples	A1	A2	% diferencia
<i>Bletia campanulata</i>	ac. grasos libres	276582	239865	13.3
	monoglicéridos	235038	203665	13.3
	digliceridos	62619	58029	7.3
	trigilceridos	31567	28740	9.0
	β -sitosterol	7359	7171	2.6
<i>Bletia purpurea</i>	ac. grasos libres	454600	411983	9.4
	monoglicéridos	13292	11968	10.0
	digliceridos	17644	20303	13.1
	trigilceridos	6859	6150	10.3
	β -sitosterol	3413	3100	9.2
<i>Laelia autumnalis</i>	ac. grasos libres	175566	195341	10.1
	monoglicéridos	25190	24546	2.6
	digliceridos	20063	19627	2.2
	trigilceridos	8393	7807	7.0
	β -sitosterol	4549	5004	9.1
<i>Prosthechea karwinskii</i>	ac. grasos libres	88329	94648	6.7
	monoglicéridos	2691	3155	14.7
	digliceridos	5129	4459	13.1
	trigilceridos	1961	1660	15.3
	β -sitosterol	1164	1459	20.2

A1, A2 = área normalizada promedio (n=2) correspondientes a dos diferentes ensayos.

Al igual que los perfiles de carbohidratos, y ácidos grasos totales estudiados anteriormente, los pseudobulbos y cormos analizados mostraron distintas proporciones de lípidos simples, la Tabla 14 muestra los compuestos identificados en cada especie.

Tabla 14. Lípidos simples presentes en las orquídeas analizadas.

Orquídea	AG libres	MG	DG	TG	β-sitosterol
<i>Bletia campanulata</i>	●	●	●	●	●
<i>Bletia purpurea</i>	●	●	●	—	●
<i>Laelia autumnalis</i>	●	●	●	—	●
<i>Prosthechea karwinskii</i>	●	●	●	●	●

AG=ácidos grasos, MG=monoglicéridos, DG=diglicéridos, TG=triglicéridos.

Para observar las proporciones de lípidos simples identificados en cada pseudobulbo o cormo, se presentan los cromatogramas obtenidos en las Figuras 22 a 25. Las cuatro orquídeas presentan mayor proporción de ácidos grasos libres que de mono y diglicéridos. La especie *B. campanulata* y *L. autumnalis* presentaron mayor proporción de monoglicéridos que de diglicéridos; en cambio *B. purpúrea* y *P. karwinskii* presentaron mayor proporción de diglicéridos que de monoglicéridos. En cuanto a los triglicéridos en todas las muestras se observaron proporciones muy pequeñas, *B. campanulata* (Figura 22) presenta la mayor cantidad seguida por *B. purpurea* (Figura 23) sin embargo, *P. karwinskii* (Figura 24) y *L. autumnalis* (Figura 25) prácticamente carecen de ellos.

En las cuatro especies se observó la presencia de β -sitosterol la cual es pequeña con respecto a los ácidos grasos libres y glicerol, los picos no identificados alrededor del mismo, podrían tratarse de otros esteroides como stigmasterol y campesterol, los cuales forman parte de las membranas vegetales (Davies, *et al.*, 1969) y que además ya han sido identificados en otras especies de orquídeas (Arditti *et al.*, 1984).

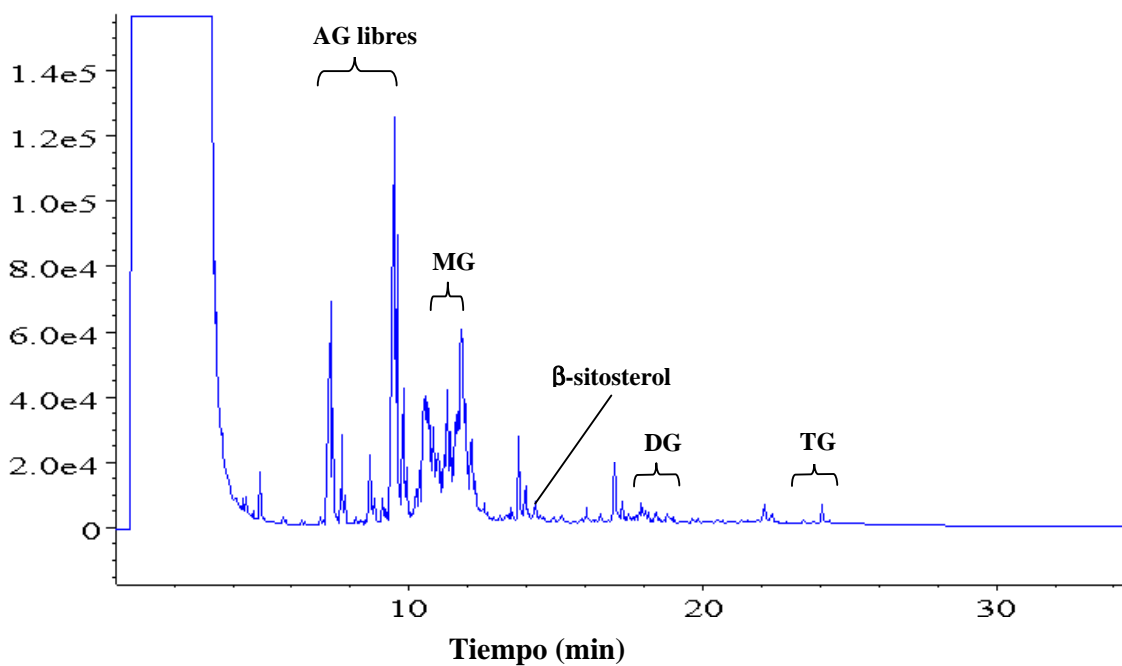


Figura 22. Cromatograma de trimetilsilil derivados de lípidos simples de *Bletia campanulata*: AG = ácidos grasos libres, MG = monoglicéridos, DG = diglicéridos, TG = triglicéridos.

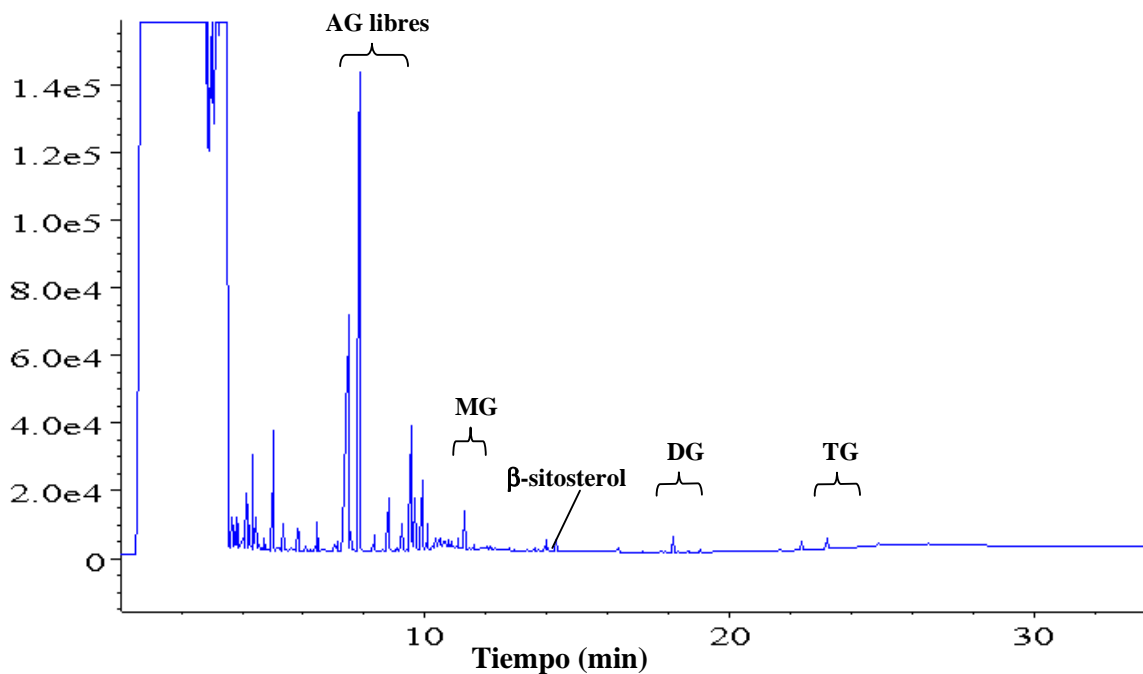


Figura 23. Cromatograma de trimetilsilil derivados de lípidos simples de *Prosthechea karwinskii*: AG = ácidos grasos libres, MG = monoglicéridos, DG = diglicéridos, TG = triglicéridos.

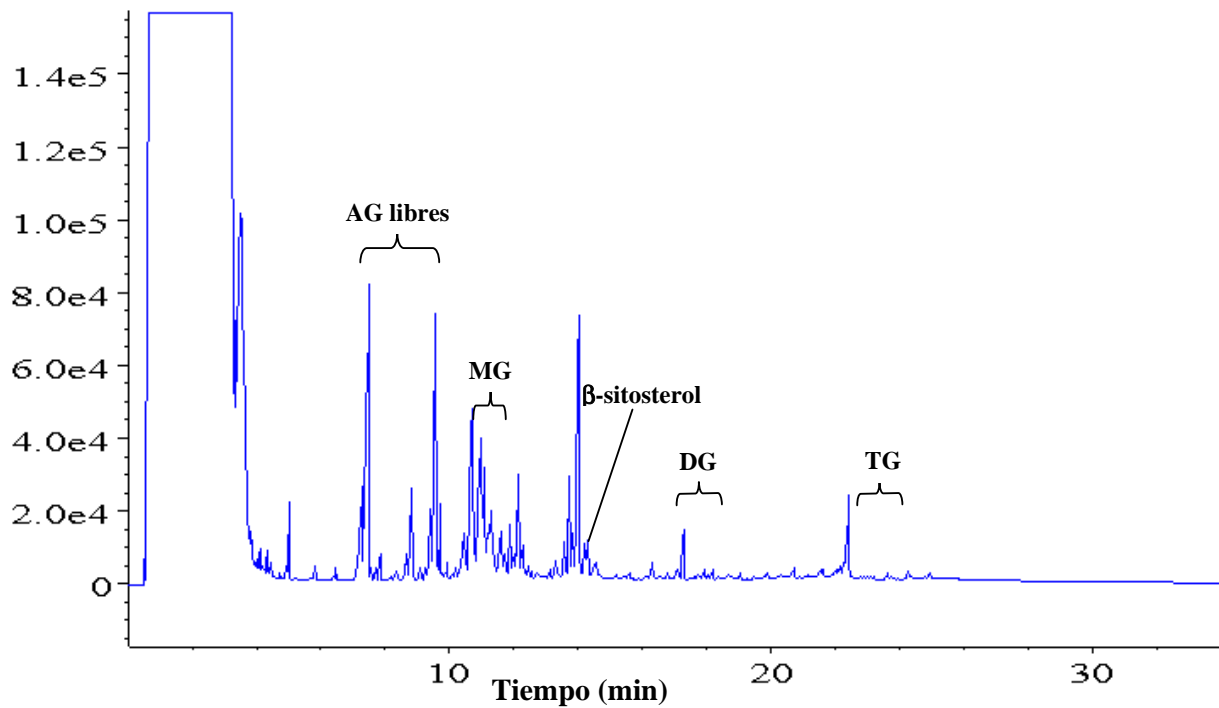


Figura 24. Cromatograma de trimetilsilil derivados de lípidos simples de *Bletia purpurea*: AG = ácidos grasos libres, MG = monoglicéridos, DG = diglicéridos, TG = triglicéridos.

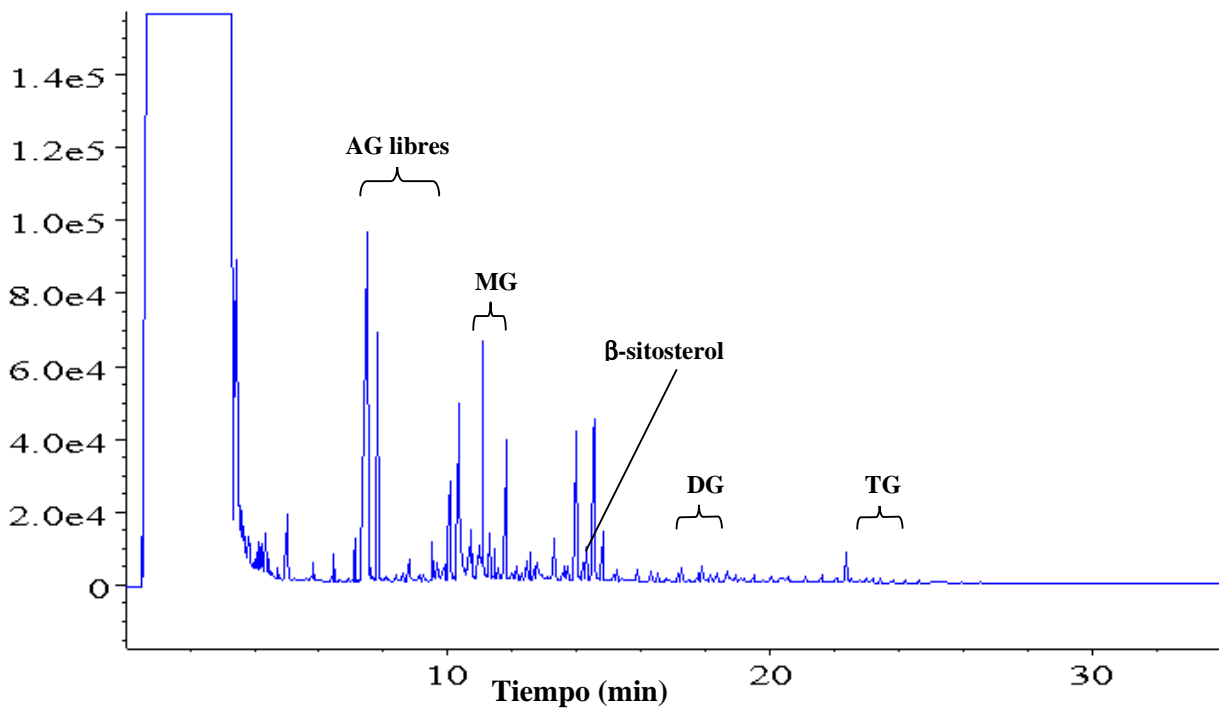


Figura 25. Cromatograma de trimetilsilil derivados de lípidos simples de *Laelia autumnalis*: AG = ácidos grasos libres, MG = monoglicéridos, DG = diglicéridos, TG = triglicéridos.

5.3 Análisis de Componentes Principales para ácidos grasos

Con el fin de discernir si existían similitudes entre los perfiles de ácidos grasos totales de las orquídeas estudiadas se empleó el Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*).

Se utilizó el programa *Statgraphics Centurion XV* para aplicar el PCA a las 8 orquídeas y los 12 ácidos grasos identificados en cada una de ellas (con el promedio de las áreas obtenidas en dos ensayos). Después de ingresar y procesar los datos en el programa se obtuvieron los diagramas de componentes principales en dos y tres dimensiones.

En la Figura 26 se expone el diagrama de los dos primeros componentes principales. Analizando sólo el primer componente principal, el cual de acuerdo al programa explica el 60.849% de la variación, se observa que las diferentes especies se separan en tres grupos, el primero formado por *B. purpurea* (B), *L. speciosa* (C), *L. autumnalis* (D) y *P. concolor* (F), el segundo por *B. campanulata* (A), *P. citrina* (G) y *A. spicatum* (H), y el tercer grupo por *P. karwinskii* (E) los cuales se indican con un marco rojo en dicha figura. Con la influencia del segundo componente, el cual expresa una variación del 22.831%, los elementos se concentran en cuatro grupos marcados con óvalos de color negro en la Figura 26, el primero formado nuevamente por *B. purpurea* (B), *L. speciosa* (C), *L. autumnalis* (D) y *P. concolor* (F), el segundo por *B. campanulata* (A), y *P. citrina* (G) ya que *A. spicatum* (H), que también se agrupaba junto con ellos en el primer componente, ahora se separa conformando un tercer grupo, y un cuarto grupo constituido solo por *P. karwinskii* (E).

Diagrama de dispersión 2D

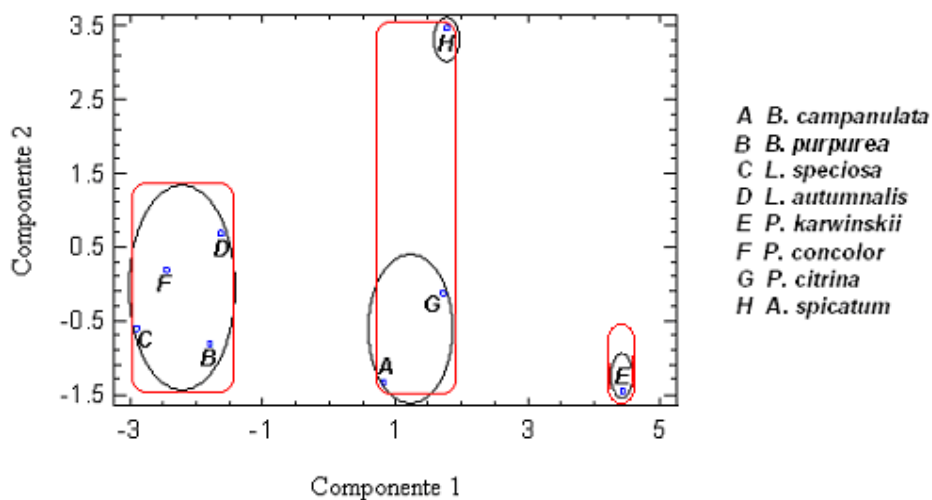


Figura 26. Diagrama de los dos primeros componentes principales para el análisis de ácidos grasos en seudobulbos de orquídeas.

En la Figura 27 se exhibe el diagrama que representa el efecto resultante de adicionar un tercer componente principal a los datos tratados en la Figura 26. Este último componente sólo manifiesta el 12.962% de la variación total, es decir, los dos primeros componentes explican prácticamente toda la variación que existe en los datos. De este modo observamos que los grupos formados con los dos primeros componentes se mantienen igual al considerar al tercer componente principal, lo que demuestra que este último componente principal ya no explica una variación considerable en los datos. A pesar de que la perspectiva presentada en el diagrama de la Figura 27 no permite apreciar la separación de *P. karwinskii* y *A. spicatum* como dos grupos separados, las coordenadas proporcionadas por el programa (E= 4.44, -1.46, 1.76, H= 1.78, 3.47, -0.15) demuestran su separación.

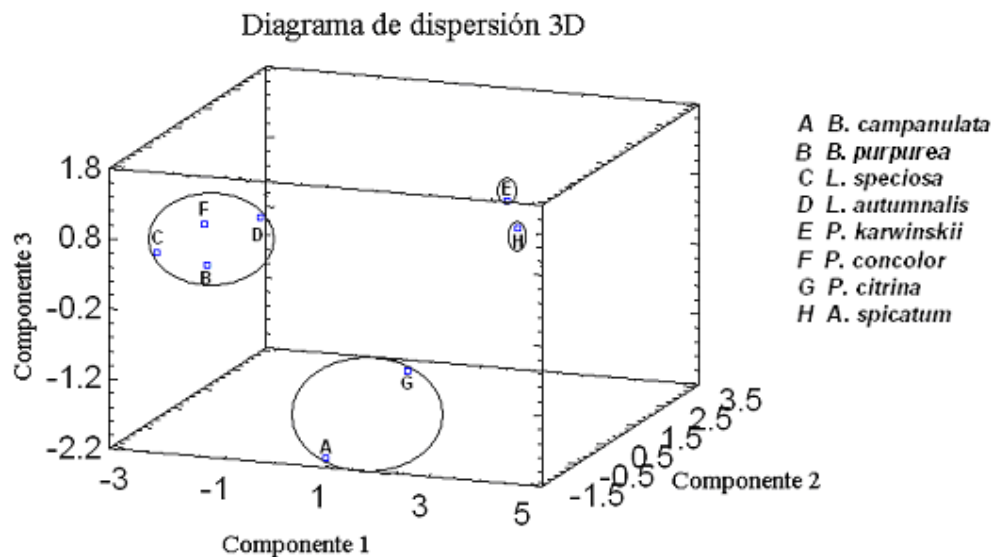


Figura 27. Diagrama de los primeros tres componentes principales en el análisis de ácidos grasos en pseudobulbos de orquídeas.

Como ya se mostró *B. campanulata* (Figura 5), *L. autumnalis* (Figura 6), *B. purpurea* (Figura 7), y *P. karwinskii* (Figura 8) tienen un perfil semejante de carbohidratos sin embargo, no coinciden en su perfil de ácidos grasos (Figuras 13, 15, 14, y 16 respectivamente). La proporción de ácidos grasos totales en los cormos o pseudobulbos de las orquídeas estudiadas es menor con respecto a los carbohidratos, pero no presentan una tendencia específica relacionada a éstos. Por lo anterior el perfil de ácidos grasos no permitió diferenciar o clasificar a las orquídeas que producen *tzauhtli*.

La proporción de carbohidratos y ácidos grasos totales identificados en los pseudobulbos y cormos no coincide entre especies que pertenecen al mismo género como *Bletia campanulata* y *Bletia purpurea*, o *Prosthechea karwinskii*, *Prosthechea concolor* y *Prosthechea citrina*, las cuales no se agruparon en el PCA como se hubiera esperado. Para relacionar la composición

química de estas plantas con su clasificación taxonómica, es necesario realizar el estudio con diferentes individuos de la misma especie; y por otra parte deben considerarse también factores como el estado fenológico de las plantas y la edad exacta del seudobulbo o cormo.

6. CONCLUSIONES

I. Se obtuvo por primera vez el perfil de carbohidratos que constituyen el mucílago de pseudobulbos o cormos de las orquídeas *Bletia purpurea*, *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Prosthechea citrina*, *Prosthechea karwinskii*, *Prosthechea concolor*, *Arpophyllum spicatum* y se confirmó el de *Bletia campanulata*. Así como también el perfil de ácidos grasos totales de las mismas especies y el perfil de lípidos simples de *Bletia campanulata*, *Bletia purpurea*, *Laelia autumnalis* y *Prosthechea karwinskii*.

II. El perfil de carbohidratos obtenido de las especies *B. campanulata*, *B. purpurea*, *P. karwinskii* y *L. autumnalis*, es semejante y coincide con el perfil de *B. campanulata* reportado previamente (Peña *et al.*, 1995), pero diferente del resto de las especies estudiadas. De lo anterior se infiere que no existe un solo perfil para el mucílago empleado en el Arte Plumaria (*tzauhtli*), pero también se podría considerar que sólo cuatro de las ocho especies de orquídeas estudiadas pueden clasificarse como productoras de *tzauhtli*.

III. Los ácidos grasos totales encontrados en los pseudobulbos y cormos estudiados son: octanoico (C8:0), nonanoico (C9:0), decanoico (C10:0), dodecanoico (C12:0), tetradecanoico (C14:0), pentadecanoico (C15:0), hexadecanoico (C16:0), heptadecanoico (C17:0), octadecanoico (C18:0), cis-9-octacenoico (C18:1), cis,cis-9,12-octadecenoico (C18:2) y el bencenpropanoico (BP), siendo los de mayor proporción el palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoléico (C18:2).

IV. En general los ácidos grasos totales identificados en los pseudobulbos y cormos de las orquídeas estudiadas se encontraban en estado libre.

7. Apéndice I

Glosario de términos botánicos

Cotiledón. Hojas primordiales que constituyen a la semilla y se encuentran en el embrión (Strasburger, 1994).

Entrenudo. Zona del eje que se encuentra entre los nudos (Strasburger, 1994).

Fenología. Estudia la relación entre los factores climáticos y los ciclos de los seres vivos.

Filogenia. Historia evolutiva de los organismos, basada en cambios del material genético, ontogenia y apariencia física de los individuos capaces de reproducirse cambiando paulatinamente (Strasburger, 1994).

Ginostemio. Estructura con forma de columna constituida por el estambre (o los dos estambres fértiles que contiene la flor) unido parcialmente con el pistilo y los estigmas. Se encuentra en el centro de la flor (Strasburger, 1994).

Inflorescencia. Distinta posibilidad de ramificación (Strasburger, 1994).

Micorriza. Define la simbiosis entre un hongo (*mycos*) y las raíces (*rhizos*) de una planta. Como en otras relaciones simbióticas, ambos participantes obtienen beneficios. En este caso la planta recibe del hongo principalmente nutrientes minerales y agua, y el hongo obtiene de la planta hidratos de carbono y vitaminas que no puede sintetizar. En la Naturaleza esta simbiosis se produce espontáneamente. Es posible que un mismo hongo forme la micorriza con más de una planta a la vez, estableciéndose de este modo una conexión entre plantas distintas; esto facilita la existencia de plantas parásitas que extraen todo lo que necesitan del hongo micobionte y las otras plantas con las que éste también

establece simbiosis. Así mismo, varios hongos (en ocasiones de especies diferentes) pueden micorrizar una misma planta al mismo tiempo (Strasburger, 1994).

Monocotiledóneas. Nombre científico Liliopsida. Dentro de las angiospermas (plantas con flores), son las plantas cuyo embrión solamente presentan un cotiledón (Strasburger, 1994).

Nudo. Puntos de inserción que están engrosados en los tallos de muchas plantas (Strasburger, 1994).

Ontogenia. Parte de la Biología del desarrollo llamada también morfogénesis u ontogénesis. Describe el desarrollo de un organismo desde el óvulo fertilizado hasta su forma adulta (Strasburger, 1994).

Panículas. Inflorescencia compuesta de racimos en la que los mismos van decreciendo de tamaño hacia el ápice (Strasburger, 1994).

Papiracea. De textura semejante al papel (Strasburger, 1994).

Pétalo. Hoja que forma parte de la corola de una flor (hojas florales). Generalmente los pétalos son llamativos y coloreados, y rodean las partes reproductivas (Strasburger, 1994).

Planta perenne. Planta que sólo florece después de un periodo frío (Strasburger, 1994).

Planta epífita. Tipo de planta que crece sobre otro vegetal usándolo solamente como soporte, pero que no lo parasita. Estas plantas son llamadas en ocasiones "planta aéreas", ya que no enraízan sobre el suelo. Las epifitas utilizan la fotosíntesis para proveerse de energía y (las que no son acuáticas) obtienen humedad del aire o de la lluvia que se deposita sobre la superficie de su anfitrión (Strasburger, 1994).

Planta litófito. Tipo de plantas que crecen sobre rocas. Las litófitas se alimentan de musgos de la piedra, los nutrientes disueltos en el agua de lluvia, desechos que haya en la roca, e incluso de sus propios tejidos muertos (Strasburger, 1994).

Planta terrestre. Tipo de plantas que se desarrollaron sobre la tierra (Strasburger, 1994).

Polinio. Estructura formada por la masa total de polen de cada saco polínico.

Primordio. Estado rudimentario en que se encuentra un órgano en formación (Strasburger, 1994).

Racemosa. Inflorescencia en la que su eje crece indefinidamente, mientras a los costados se producen yemas florales que se abren a medida que éste se desarrolla (Strasburger, 1994).

Rizodermis. Epidermis de la raíz constituida por una sola capa de células (Strasburger, 1994).

Rizoma. tallo subterráneo con varias yemas que crece de forma horizontal emitiendo raíces y brotes herbáceos de sus nudos. Los rizomas crecen indefinidamente, con el curso de los años mueren las partes más viejas pero cada año producen nuevos brotes, cubriendo de ese modo grandes áreas de terreno (Strasburger, 1994).

Sépalo. pieza floral que forma el cáliz de flor de una planta angiosperma. Los sépalos son los que envuelven a las otras piezas florales en las primeras fases de desarrollo, cuando la flor es sólo un capullo. Existe variedad considerable en la forma de los sépalos entre diferentes especies. A menudo los sépalos son muy reducidos, apareciendo como crestas (Strasburger, 1994).

Simbiosis. Es un tipo de interacción biológica entre dos o más organismos de distintas especies, en la que todos son beneficiados (Strasburger, 1994).

Simbiontes. Organismos involucrados en una simbiosis (Strasburger, 1994).

Suculencia. Característica de ciertos órganos de algunas plantas, en la cual se engrosan para permitir el almacenaje de agua en grandes volúmenes. Esta adaptación les permite

mantener reservas de líquido durante períodos prolongados, y sobrevivir así en entornos áridos y secos que son inhabitables para otras plantas (Strasburger, 1994).

Velamen. Rizodermis especializada que consta de células muertas. El velamen constituye una vaina esponjosa y blanquecina que rodea por completo a la raíz. Si el tiempo es seco, sus células están llenas de aire; pero cuando llueve se llenan de agua. Según algunos autores el velamen es un tejido que absorbe agua, según otros nunca se ha observado el paso de agua del velamen al córtex de la raíz. Su función principal parece ser la de protección mecánica, además de impedir la excesiva pérdida de agua de la raíz en períodos de deficiencia hídrica (Strasburger, 1994).

Vernación. También llamado como prefoliación. Es la disposición de los primordios foliares dentro de la yema antes de producirse la apertura de la misma y el desarrollo foliar completo. Se distinguen los siguientes tipos de vernación: circinada, conduplicada, convolutiva, corrugada, involuta, plana, plegada, reclinada, revoluta, supervoluta, etc. (Strasburger, 1994).

Vernación plegada. El primordio se pliega a lo largo de todos los nervios principales, como un abanico cerrado (Strasburger, 1994).

Vernación convolutiva. El primordio se enrolla longitudinalmente como un tubo, uno de sus bordes solapa al otro (Strasburger, 1994).

8. Apéndice II

Características generales de las orquídeas estudiadas en el presente trabajo.

Especie	Forma de vida	Seudobulbo o cormo	Hoja	Inflorescencias	Flor
<i>Arpophyllum spicatum</i> (Cribb, 2005)	Epífita	Carece de pseudobulbos o comos. Presenta vástagos con 3-6 internodos fuertemente comprimidos, encubiertos por vainas fibrosas.	Una hoja apical por tallo; alargada, carnosa y rígida; dorsalmente caída.	Solo surge una inflorescencia apical en el pseudobulbo. Racemosa.	De color magenta. Sépalos ovalados a elípticos; pétalos elípticos.
<i>Bletia campanulata</i> (McVaugh, 1983)	Terrestre	Cormos elipsoides, aplanados a globulares en posición horizontal.	De 2 a 3 hojas; largas y angostas, con forma elíptica.	Surgen del cormo. Racemosas.	De color rosa a púrpura. Con forma de campana, cerrada por los sépalos. Sépalos con forma elíptica; pétalos elíptico-ovoides. Labelo trilobado: el lóbulo medio con forma oblonga, de color púrpura con venas oscuras; lóbulos laterales erectos, cubriendo la columna.
<i>Bletia purpurea</i> (McVaugh, 1983)	Terrestre	Cormo con forma ovoide.	Largas y angostas, con forma elíptica.	Surge del cormo. Simples o paniculadas.	De color rosa-púrpura, rosa o blanca. Crece en posición erecta. Sépalos dorsales elípticos, sépalos laterales extendidos; pétalos formando una capucha sobre el labelo. Labelo trilobado: lóbulos laterales oscuros, lóbulo medio muy inclinado hacia la flor.
<i>Laelia autumnalis</i> (Halbinger, 1997)	Epífita o litófito.	Seudobulbos elipsoides o cónico-ovoides a subglobosos; cubiertos con envolturas papiráceas.	Usualmente 2 hojas por pseudobulbo; angostas elípticas, largas y carnosas.	Se originan del pseudobulbo maduro. Racemosa.	Sépalo dorsal lanceolado o elíptico angosto; sépalos laterales oblicuos o lanceolados de color oscuro; pétalos extendidos con forma lanceolada a elíptica, de color lila a magenta oscuro; labelo trilobado: lóbulos laterales blancos con rayas magenta, lóbulo medio de color liliáceo a magenta.

Características generales de las orquídeas estudiadas en el presente trabajo.

Especie	Forma de vida	Seudobulbo o cormo	Hoja	Inflorescencias	Flor
<i>Laelia speciosa</i> (Halbinger, 1997)	Epífita o litófito.	Seudobulbos globulares u ovoides ligeramente comprimidos; superficie rugosa cuando son viejos y envueltos por una vaina rayada cuando son jóvenes.	De 1 a 2 porseudobulbo; con forma lanceolada-elíptica, ligeramente carnosas.	Se originan delseudobulbo en desarrollo. Racemosa.	Sépalos extendidos lanceolados y pétalos extendidos con forma elíptica a rómbica, ambos en el mismo plano y de color rosa a liláceo-púrpura; sépalo dorsal erecto; sépalos laterales oblícuos; labelo blanco con márgenes coloridos, con 3 lobulos, el lóbulo medio de forma ovoide con manchas o líneas magenta; los lóbulos laterales erectos con forma ovoide u blonga.
<i>Prosthechea citrina</i> (McVaugh, 1983)	Epífita o litófito	Seudobulbos ovoides, cubiertos con envolturas papiráceas y agrupados en racimos.	De 2 a 4 porseudobulbo; angostas, elípticas y afiladas.	Surge delseudobulbo. Racemosa.	Flores pendientes, de color amarillo pálido a amarillo canario o naranja. La flor no abre completamente (tépalos erectos); labelo profundamente cóncavo; lóbulos laterales se sobreponen uno con otro ocultando la columna. La columna es 3 veces mas larga que ancha (Comunicación personal del Dr. Gerardo A. Salazar Chávez).
<i>Prosthechea karwinskii</i> (McVaugh, 1983)	Epífita o litófito	Seudobulbos ovoides, cubiertos con envolturas papiráceas y agrupados en racimos.	De 2 a 4 porseudobulbo; angostas, elípticas y afiladas.	Surge delseudobulbo. Racemosa.	Flores pendientes, de color amarillo pálido a amarillo canario o naranja; La flor abre ampliamente; labelo plano; lóbulos laterales no se sobreponen. La columna es 2 veces más larga que ancha (Comunicación personal del Dr. Gerardo A. Salazar Chávez).

9. Apéndice III

Distribución geográfica y hábitat en que crecen las especies de orquídeas estudiadas en el presente trabajo.

Especie	Distribución en México (Soto, 1988)	Hábitat
<i>Arpophyllum spicatum</i>	Edo. de Méx., Mich., Gro. y Oax.	Montañas boscosas con clima húmedo o mojado. (Crib, 2005)
<i>Bletia campanulata</i>	Sin., Son., Dgo., Nay., Ags., Gto., Jal., Mich., Edo. de Mex., Gro., Oax., Ver., y Chis.	Laderas rocosas y herbosas de bosques de encinos. (McVaugh, 1983)
<i>Bletia purpurea</i>	Jal., Mich., Edo. de Méx., Mor., Gro., Oax., Tam., S. L. P., Ver., Pue., Tab., Chis, Yuc., Q. Roo.	Lugares herbosos y húmedos entre las rocas y pencas de bosques secos y húmedos. (McVaugh, 1983)
<i>Laelia autumnalis</i>	Nay., Col., Jal., Mich., Edo. de Méx., Mor., D.F., Hgo y Gro.	Bosque seco o siempre verde de encino y pino-encino. (Halbinger, 1997)
<i>Laelia speciosa</i>	Dgo., Zac., Ags., Jal., Gto., Mich., Qro., Hgo., S. L. P. y Tam.	Bosques secos de encino. (Halbinger, 1997)
<i>Prosthechea citrina</i>	Jal., Mich., Gro. y Oax.	Bosques secos de encino y pino-encino. (McVaugh, 1983)
<i>Prosthechea karwinskii</i>	Mich., Gro. y Oax.	Bosques secos de encino y pino-encino.
<i>Prosthechea concolor</i>	Jal., Mich., Edo. de Méx., Mor., Gro., Oax. y Pue.	Lugares secos abiertos o mas comúnmente en lugares húmedos de bosques de encino y pino-encino (McVaugh, 1983).

10. REFERENCIAS

Arditti J., Fundamentals of Orchids. John Wiley and Sons, U.S.A., 1992.

Arditti J., Cribb P.J., Ernst R., Hamilton R. M., Hausen B. M., Kaemoto H., Lawler L., Tyson R., Rodriguez E., Seth CH., Stoessl A. and Tanaka R., Orchid biology- Reviews and perspectives. Vol. III, Cornell University Press, E.U.A, 1984.

Bleton J., Mejanelle P., Sansoulet J., Goursaund S. and Tchaplal A., Characterization of neutral sugars after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums. Journal of Chromatography A, 720 (1996) 27-49.

Bligh E. and Dyer W., A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37 (1959) 911.

Blokker P., Pel R., Akoto L. and Vreuls R. J. J., At-line gas chromatographic-mass spectrometric analysis of fatty acid profiles of green microalgae using a direct thermal desorption interface. Journal of Chromatography A, 959 (2002) 191.

Bonaduce I., Brecolaki H., Colombini M. P., Lluveras A., Restivo V. and Ribechini E., Gas-chromatographic-mass spectrometric characterization of plant gums in samples from painted works of art. Journal of Chromatography A, 1175 (2007) 275-282.

Brooks S. P. J., Retnayake W. N. M., Lampi B. J. and Hollywood R., Measuring total lipid content in rat carcasses: a comparison of commonly employed extraction methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (1998) 4214-4217.

Buchala A. J., Franz G. and Mejer H., A glucomannan from the tubers of *Orchids Morio*. Phytochemistry, 13 (1974) 63.

Buchanan B. B., Gruissem W. and Jones R. L., Biochemistry and molecular biology of plants. 1^a ed., American Society of Plant Physiologists, U.S.A, 2000.

Castelló Y. T., Portilla M. y Moreno O. M., El Arte Plumaria en México. Fomento cultural Banamex, México D.F., 1997.

Chiantore O., Riedo Ch. and Scalarone D., Gas chromatography-mass spectrometry analysis of products from on line pyrolysis/silylation of plant gums used as binding media. International Journal of Mass Spectrometry, 284 (2009) 35-41.

Christie W.W., Lipid analysis. Pergamon Press, 2^a ed., Great Britain, 1987.

Cribb P. J., Chase M. W. and Rasmussen F. N., Genera Orchidacearum. Epidendroideae. V.4, Parte 1, Oxford University Press, 1^a ed., Oxford, 2005.

Davies D. D., Giovenalli J. and Rees T., Bioquímica vegetal. Ediciones Omega, 1ª ed., Barcelona, 1969.

Dressler R. L., The Orchids: natural history and classification. Library of Congress cataloging in Publication Data, 1ª ed., U.S.A., 1981.

Dressler R. L., Notes on *Bletia (Orchidaceae)*. Britonia, 20 (1968) 182.

Fessenden R. J. and Fessenden J. S., Química orgánica. Grupo Editorial Iberoamérica, 2ª ed., México, 1989.

Fishwick M. and Wright A., Comparison of methods for the extraction of plant lipids. Phytochemistry, 16 (1977) 1507.

Flores P. V., Saffi J., Melecchi M.I., Abad F. C. Martinez M., Oliveira E. C. and Carabao E., Comparison of Soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichadianum Kunth*. Journal of Chromatography A, 1105 (2006) 115-118.

Folch J., Lees M. and Slone G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissues. Journal of Biological Chemistry, 54 (1957) 497-507.

García P. Ma. del R. y Peña M., Uso de las orquídeas en México desde la época prehispánica hasta nuestros días. Revista Orquídea, México, 8 (1) Marzo, 1981.

González T. R. C., El tzauhtli: adhesivo prehispánico obtenido a partir de orquídeas. Tesis Licenciatura, ENCRM-INAH., México, 1994.

Grob K., On-Column injection in capillary gas chromatography. Heidelberg, 2ª ed., H. Buch., 1991.

Größl M., Harrison S., Kaml I. and Kenndler E., Characterization of natural polysaccharides (plant gums) used as binding media for artistic and historic works by capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A, 1077 (2005) 80-89.

Guil J. L., Torija Mª E., Giménez J. J. and Rodríguez I., Identification of acids in wile plants by gas chromatography. Journal of Chromatography A, 719 (1996) 229.

Hágsater E., Soto A. M., Salazar C. G., Jiménez M. R., López M. R. y Dressler L. R., Las orquídeas de México. Productos Farmacéuticos, Instituto Chinoín, 1ª ed., México D.F., 2005.

Halbinger F. and Soto M., Laelias of Mexico. 1ª ed., Herbario AMO, México D.F., 1997.

Hernández F., Historia de las plantas de la Nueva España. Instituto de Biología, Imprenta Universitaria, México D.F., 1959.

Holman R. T. and Nichols P. C., Characterization of the lipids of some orchids. *Phytochemistry*, 11 (1972) 333.

Holman R. T., Quantitative chemical taxonomy based upon composition of lipids. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, 16 (1978) 9.

Jorge K. and Trugo L., Determination of Different Hop Varieties Using Headspace Gas Chromatography Data. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2003) 411-415.

Kang-Lyung and W., Kim J., New hydrolysis for extremely small amount of lipids and capillary gas chromatographic analysis as N(O)-tert-butyldimethylsilyl fatty acid derivatives compared with methyl ester derivatives. *Journal of Chromatography A*, 862 (1999) 199.

La Cruz de G., López H. and Simal L. J., Gas Chromatographic determination of the fatty-acid content of heat-treated green beans. *Journal of Chromatography A*, 981 (2000) 367.

Lawler L. J., *Etnobotany of the Orchidaceae*. In *Orchid biology: Reviews and perspectives*. ed. Arditti, vol.III, Ithaca: Cornell University Press, 1^a ed., 1984.

de La Llave P. y Lexarza J., *Novorum Vegetabilium Descriptiones*, Fasciculus I, Quadraginta descriptionens complectens auarum tredecim totidem genera nova exhibent. México 1824, reimpresso por la Sociedad Mexicana de Historia Natural, México 1881.

Lenz H., *El papel Indígena Mexicano*. Impreso por Rafael Loera y Chavez, Editorial Cultura, 1^a ed., México, 1978.

Leon de Pinto G., Martínez M., Sanabria L., Rincón F., Vera A., Beltrán O. and Clames C., The composition of two *Spondias* gum exudates. *Food Hydrocolloids*, 14 (2000) 259-263.

Leon de Pinto G., Rodríguez O., Martínez M. and Rivas C., Composition of *Cercidium praecox* Gum Exudates. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21 (1993) 297-300. (A)

Leon de Pinto G., Nava M., Martínez M. and Rivas C., Gum Polysaccharides of Nine specimens of *Lagundaria recemosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21 (1993) 463-466. (B)

Lixia Liu, Peter Howe, Ye-Fang Zhou, Zhi-Qiang Xu, Charles Hocart and Ren Zhang, Fatty acids β -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *Journal of Chromatography A*, 803 (2000) 207.

Martínez A. J. F., *Determinación de Lípidos Simples en Agave Mezcalero por Cromatografía de Gases*. Tesis Maestría, Facultad de Química, UNAM, 2007.

Martínez C. F., Pegamentos, gomas, y resinas en el México prehispánico. Resistol, 1ª ed., México, 1970.

Manirakiza P., Covaci A. and Schepens P., Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh and Dyer, and modified Bligh and Dyer extraction methods. *Journal of the Food Composition and Analysis*, 14 (2001) 93.

Mcvaug R., Flora novo-galiciana: a descriptive account of the vascular plants of western Mexico. University Michigan Press, U.S.A, 1983.

McNair H. and Miller J., Basic gas chromatography. *Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, 1ª ed., U.S.A, 1998.

Mildner-Szkudlarz S., Jelén H., Zawirska R. and Wasowics E., Application of headspace-solid phase microextraction and multivariate analysis for plant oils differentiation. *Food Chemistry*, 83 (2003) 515-522.

Miller J. N. and Miller J. C., Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Prentice Hall, 4ª ed., Madrid, España, 2002.

Mills J. S. and White R., The organic chemistry of museum objects. Butterworth-Heinemann, 2ª ed., Great Britain, 1994.

Molina fray A. de, Vocabulario Náhuatl–Castellano. 2ª ed. abreviada y modernizada por Ediciones Colofón, S. A., México, 1966.

Mongrand S., Badoc A., Patouille B., Lacomblez Ch., Chavent M., Cassagne C. and Bessoule J. J., Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition. *Phytochemistry*, 58 (2001) 101-115.

O’Learly W. M., The fatty acids of bacteria. *Bacteriological Reviews*, 26,4 (1962) 421.

O’Learly W. M., On the fatty acids of Pleuropneumonialike organisms. *Biochemical and biophysical research communications*, 8, 2 (1962) 87.

Peña A. A., Díaz L., Medina A., Labastida C., Capella S. and Vera L. E., Characterization of three Agave by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, A 1027 (2004) 131.

Peña A. A., Capella S. and González T. C., Characterization and Identification of the Mucilage Extracted from Orchids Bulbs (*Bletia campanulata*) by High Temperature Capillary Gas Chromatography (HT-CGC). *Journal of High Resolution Chromatography*, 18 (1995) 713.

Peña A. A., High Temperature Capillary Gas Chromatography (HT-CGC). Tesis Doctoral, Gante, Bélgica, 1993.

Revinthi-Moraiti K., Kmaitis M. E., Evangelatos G. and Kapoulas V. V., Identification and quantitative determination of the lipids of dried *Origanum dictamnus* leaves. Food Chemistry, 19 (1985) 15.

Risov I., Doulis A., Separation of plant membrane lipids by multiple solid-phase extraction. Journal of Chromatography A, 922 (2001) 347.

Sahagún, fray B. de, Historia general de las cosas de la Nueva España. Ed. Porrúa, Colección "Sepan cuantos...", No. 300, 3ª ed., México D.F., 1975.

Sandra P., Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography. Heidelberg, Vol. I, New York, 1985.

Sanz M. L. and Martínez-Castro I., Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. Journal of Chromatography A, 1153 (2007) 74-89.

Santos J. L., Identificación y Cuantificación de Terpenos en Agave Mezcalero por Microextracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. Tesis Maestría, UNAM, México, D.F., 2008.

Strasburger E., Noll. F., Schenk H. and Schimper A., Tratado de botánica. Ediciones Omega, 8ª ed castellana, Barcelona, 1994.

Shantha N. C., Gas chromatography of fatty acids. Journal of Chromatography A, 624 (1992) 37-51.

Smith F. and Montgomery R., The chemistry of plants gums and mucilage and some related polysaccharides. ACS Monograph No. 141, Reinold Publishing Corporation, New York, 1959.

Soto A. M. A., Listado Actualizado de las orquídeas en México. Revista Orquídea, (México) Vol. 11, 1988.

Urbina M., Notas acerca de los *tzauhtli* u orquídeas mexicanas. Anales del Museo Nacional de México, 2ª época, Tomo I, México, 1903.

Urbina M., Los amates de Hernández o higueras mexicanas. Anales del Museo Nacional de México, 1ª época, Vol. 7, México, 1903.

Williams C., The leaf flavonoids of the Orchidaceae. Phytochemistry, 18 (1979) 803-813.

Woodbury S. E., Evershed R. P. and Rossell J. B., ¹³C analyses of vegetable oil fatty acid components, determined by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis. Journal of Chromatography A, 805 (1998) 249.

Yang L., Zhengtao W. and Luoshan X., Simultaneous determination of phenols (bibenzyl, phenanthrene and fluorenone) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1104 (2005) 230-237.

Xiao-Ming Du, Ning-Yi Sun and Yukihiro Shoyama, Flavonoids from *Goodyera schlechtendaliana*. *Phytochemistry*, 53 (2000) 997-1000.

Zedenek J., *Enciclopedia de las Orquídeas*. Ed. LIBSA, 1ª ed., Madrid, 2005.