



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS QUÍMICO DE RESIDUOS ORGÁNICOS
ARQUEOLÓGICOS. DESARROLLO DE BASES DE MATERIALES
DE REFERENCIA Y ESTUDIO GC-MS DE RESINAS
DITERPÉNICAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

CARMEN ESTHER PIÑA TORRES



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: José Manuel Méndez Stivalet

VOCAL: Lauro Bucio Galindo

SECRETARIO: Delia Paola Lucero Gómez

1er. SUPLENTE: Luis Alejandro Díaz Flores

2° SUPLENTE: Xochiquetzal González Rodríguez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA AL PATRIMONIO, INSTITUTO DE QUÍMICA.

LABORATORIO NACIONAL DE CIENCIAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL PATRIMONIO CULTURAL (LANCIC).

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Delia Paola Lucero Gómez

SUSTENTANTE (S):

Carmen Esther Piña Torres

Clara sometimes asks me if I dream. "Of course I dream," I tell her, "Everybody dreams." "But what do you dream about?" She'll ask. "The same thing everybody dreams about," I tell her, "I dream about where I'm going." She always laughs at that, "But you're not going anywhere. You're just wandering about." That's not true, not anymore. My journey is the same as yours, the same as anyone's. It's taken me so many years, so many lifetimes, but at last I know where I'm going, where I've always been going: Home, the long way 'round.

-The Doctor

Agradecimientos

Investigación realizada con el apoyo de la beca de titulación del Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT. (Proyecto IA203417).

El trabajo investigación se realizó, bajo el auspicio de CONACYT. (Proyectos LN 232619 y LN 260779).

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Paola Lucero por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, aunque solo fuera a prueba. Por el apoyo que me brindó en todo momento, y la confianza en mi trabajo. El ambiente de trabajo tan dinámico y sano que propició en el laboratorio, preocupándose siempre por nosotras y siendo realmente muy linda. Le agradezco mucho elegir no dejarnos solas aún después de las situaciones tan desfavorables en las que se vio envuelto nuestro trabajo en el laboratorio.

Agradezco a las restauradoras de la Coordinación Nacional de Conservación del Patrimonio Cultural (CNCPC) del Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH) Luisa Mainou y Luisa Straulino.

De igual forma agradezco a la Dra. María del Rosario Domínguez de la Universidad Autónoma de Campeche.

Al Dr. Francisco Javier Pérez Flores del Instituto de Química por su invaluable ayuda en la interpretación de algunos espectros de masas, muchas gracias.

También quiero agradecer al equipo dinamita, gracias por hacer del laboratorio un lugar genial para trabajar, por las risas, las bromas, los no cumpleaños, los videos, los burritos y las pizzas.

Quiero agradecer a mi familia, a mis padres que nunca me dejan sola, y a mi hermano con quien siempre puedo contar. A mis tíos y primos, todos, los Piña, los Torres, Salazar y Mondragón. En especial a Beatriz Piña, te llevo siempre en el corazón.

Agradezco a Marian, Laura y Wendy, por no dejarme sola a pesar de la distancia.

A Elenita y Paco, por hacer de la universidad un lugar más brillante y divertido.

A todas las personas que encontré en el camino y, voluntaria o involuntariamente hicieron de este camino uno más llevadero y divertido.

Finalmente, también quiero hacer patente a quienes pusieron de su parte para que este proceso resultara extenuante y tortuoso. Los técnicos de LANCIC-IQ que hicieron lo imposible para impedir el uso de los equipos y al Maestro Baldomero Esquivel, secretario técnico, que los apoyó en todo momento y, eligió ignorarnos. Al Dr. Fernando Cortés, secretario académico del IQ, que nos puso en claro que deberíamos agradecer que nuestra asesora no falleció.

A todos ellos, gracias. Porque me enseñaron que a veces el amor propio y el respeto a uno mismo y su trabajo es más importante que lo que los demás puedan hacer para detenerte.

Avant propos

Presentaciones en póster

Piña, C., Arroyo, E., Falcón, T., Kirby, J., & Lucero, P. (2016) Preliminar results on the extraction of madder from historic textiles by HPLC-DAD. Simposio anual del Instituto de Química.

Piña, C., & Lucero, P. (2016) Estudio de resinas naturales presentes en objetos arqueológicos por medio de GC-MS. Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural. Reunión anual.

Ponencias

Lucero, P., Piña, C., Vázquez, A., & Nieto, S. (24 de octubre de 2016). Análisis Químico de residuos arqueológicos de cacao: Desarrollo de una metodología de manejo, pretratamiento y análisis de muestras usando HPLC-QTOF. Reunión Temática sobre Residuos Químicos en Objetos y Contextos Patrimoniales. Mérida, Yucatán.

Lucero, P., Piña, C., Vázquez, A., & Domínguez, M. (6 de septiembre de 2017). Estudio GC-MS de los residuos orgánicos extraídos de un incensario Maya en Champotón. RED de Ciencias Aplicadas a la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural. Tercera Reunión General. Ciudad de México.

Artículo aceptado (Anexo 3)

Piña-Torres, C., Nieto, S., Bucio, L., Belio, I., Vega, R., Mathe, C., Vieillescazes C., & Lucero-Gómez, P. Analytical strategy based on Fourier transformed infrared spectroscopy, principal component analysis and linear discriminant analysis to suggest the botanical origin of resins from *Bursera*. Application to archaeological Aztec Samples. *Journal of Cultural Heritage*.

Capítulo de libro

Piña, C. & Lucero, P. (2016). La química y el arte. En *La química entre nosotros*. Ciudad de México: Dirección General de Divulgación de la Ciencia, FQ-IQ, UNAM.

Tabla de contenido

Lista de figuras	iv
Lista de tablas	ix
Lista de abreviaturas	x
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2 HIPÓTESIS	1
3 OBJETIVO GENERAL.....	2
4 OBJETIVOS PARTICULARES	2
5 JUSTIFICACIÓN	3
6 ANTECEDENTES	4
6.1 Características físicas de las resinas	5
6.2 Distribución de los pinos en México	6
6.2 Características de los pinos	9
6.3 Explotación de las resinas de pino en México	10
6.4 Uso de los copales en México Prehispánico	12
6.5 Características químicas de las resinas.....	14
6.6 Resinas de Pinaceae	16
6.7 Los terpenos como marcadores moleculares	18
6.8 La cromatografía de gases	21
6.9 Espectrometría de masas	23
6.9.1 Espectrómetro de cuadrupolo simple.....	24
6.10 Tratamiento de muestras	27

6.11	Análisis de componentes principales (PCA).....	29
7	INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE.....	30
8	REACTIVOS	31
9	EXPERIMENTACIÓN.....	31
9.1	Muestreo de resinas de pino	31
9.1.1	Muestras certificadas botánicamente.....	31
9.1.2	Muestras de origen botánico desconocido.....	34
9.1.3	Muestras comerciales	36
9.1.4	Muestras arqueológicas	39
9.2	Derivatización de las resinas.....	41
9.3	Análisis por Cromatografía de gases-espectrometría de masas.....	41
10	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	41
10.1	Resultados del estudio de muestras certificadas botánicamente	44
10.2	Resultados de muestras de resinas de origen desconocido.	49
10.3	Resultados del estudio de muestras comerciales	56
10.4	Resultados del estudio de muestras arqueológicas	74
10.4.1	Incensario antropomorfo Maya	74
10.4.2	Muestra obtenida de ofrenda a Tláloc	82
10.5	Cuantificación, curva de calibración.....	84
11	CONCLUSIONES.....	85
12	BIBLIOGRAFÍA.....	89
13	ANEXOS	96

13.1	Anexo 1	96
13.1.1	Espectros de Masas de las moléculas encontradas en las muestras de resina de pino	96
13.2	Anexo 2	97
13.2.1	Cromatogramas obtenidos de resinas de pinos certificados botánicamente	97
13.2.2	Cromatogramas obtenidos de resinas de pinos de muestras de origen botánico desconocido	102
13.2.3	Cromatogramas de resinas de origen comercial	109
13.3	Anexo 3	117

Lista de figuras

Figura 1 Tipos de copales vendidos en el mercado de Sonora de la Ciudad de México.....	6
Figura 2 Distribución de los taxa de los pinos en México (Sánchez-González, 2008).....	8
Figura 3 Volumen de producción forestal no maderable en México (no incluye tierra de monte) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016).....	11
Figura 4 Producción forestal no maderable por producto (2015) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016).	11
Figura 5 Tzapotlatena (Martínez-Cortés, 1970).....	13
Figura 6. Constituyentes químicos de resinas de coníferas.	15
Figura 7 Labdanos, pimaranos y abietanos diterpenoides presentes en resinas de Pinaceae	17
Figura 8 Mecanismo de la biosíntesis del ácido abiético (Bohlmann & Keeling, 2006).	18
Figura 9 Rutas de isomerización y oxidación de ácidos abietanos. El grado de oxidación de un ácido (A-E) está representado por la posición vertical del compuesto (Van den Berg, et al., 2000).	20
Figura 10 Esquema de un cromatógrafo de gases.....	22
Figura 11 Cromatograma hipotético	22
Figura 12 El negativo y positivo de una molécula neutra y sus fragmentaciones subsecuentes (Dettmer & Engewald, 2014).	25
Figura 13 Cuadrupolo del espectrómetro de masas. (a) Arreglo de los cuatro electrodos A, A, B, B de una forma hiperbólica que sirve para crear un campo simétrico. (b) Arreglo esquemático de un cuadrupolo (March & Todd, 2005).....	26
Figura 14 Información accesible de un espectro de masas. e.g. 3-clorbifenilo. El (Dettmer & Engewald, 2014).....	27
Figura 15 Fragmentos característicos de compuestos sililados.	28
Figura 16 Muestreo de resinas de pino	31
Figura 17 Mapa de los estados donde fue colectada la resina comercial.	36
Figura 18 Espectros de masas de (a) ácido pimárico y (b) isómero conformacional del ácido pimárico, α	44
Figura 19 Distribución en el hiperespacio del análisis de componentes principales y loading plot para resinas certificadas.	46

<i>Figura 20 Distribución en el hiperespacio de muestras de resinas identificadas como Pinus montezumae por medio del análisis de componentes principales.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 21 Muestras cuya composición sugiere como origen Pinus Montezumae (a) pino 12, (b) pino 16, (c) pino 17, (d) pino 18, (e) pino 2.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 22 Distribución en el hiperespacio de la muestra 19 y muestras certificadas del análisis de componentes principales.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 23 Cromatograma de la muestra pino 19.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 24 Cromatograma de Pinus pseudoestrobus</i>	<i>53</i>
<i>Figura 25 Distribución en el hiperespacio de la muestra 20 y de las muestras certificadas en el análisis de componentes principales.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 26 Cromatograma de la muestra de pino 20, origen botánico P. lumholtzii.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 27 Distribución en el hiperespacio de la muestra identificada como Abies religiosa por medio del análisis de componentes principales.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 28 Cromatograma de la muestra 22.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 29 Distribución en el hiperespacio de muestras cuyo origen botánico solo fue posible descartar. Análisis de componentes principales.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 30 Distribución en el hiperespacio de la muestra Coll2.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 31 Cromatograma de Coll2</i>	<i>60</i>
<i>Figura 32 Vegetación en México de INEGI agrupada por CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2012)</i>	<i>61</i>
<i>Figura 33 Distribución en el hiperespacio de las muestras comerciales TuxA1 y TuxA3.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 34 Cromatogramas de las muestras (a) TuxA1 y (b) TuxA3.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 35 Distribución en el hiperespacio de las muestras comerciales identificadas como Pinus douglasiana</i>	<i>64</i>
<i>Figura 36 Cromatograma de MilB2, identificado como Pinus douglasiana.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 37 Distribución en el hiperespacio de las muestras MilA1 y OaxC3 identificadas como Pinus maximartinezii.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 38 Cromatogramas de las muestras identificadas como Pinus maximartinezii. (a) OaxC3, (b) MilA1.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 39 Distribución en el hiperespacio de la muestra TuxA2 identificada como Pinus edulis.</i>	<i>68</i>

Figura 40 Cromatograma de TuxA2	69
Figura 41 Distribución en el hiperespacio de SonA1.....	69
Figura 42 Cromatograma de SonA1	70
Figura 43 Distribución en el hiperespacio de MilA2.....	71
Figura 44 Cromatograma de MilA2.....	71
Figura 45 Distribución en el hiperespacio de SonP1	72
Figura 46 Cromatograma de SonP1	73
Figura 47 Distribución en el hiperespacio de las muestras de especies desconocidas.....	73
Figura 48 Cromatograma de la muestra tomada del fondo de la pieza.....	74
Figura 49 Cromatograma de la muestra tomada del exterior de la Pieza 8.....	76
Figura 50 Estructura de las moléculas encontradas en las muestras tomadas en el incensario.	77
Figura 51 <i>Ficus petiolaris</i> "amate amarillo".....	79
Figura 52 Distribución del género <i>Ficus</i> en México (Serrato, et al., 2004).	79
Figura 53 <i>Brosium alicastrum</i> (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).80	
Figura 54 Distribución geográfica de <i>Brosimum alicastrum</i> en México (Rzedowsky, 2006)....	81
Figura 55 Cromatograma de la muestra ofrenda a Tláloc	82
Figura 56 Espectro de masas del compuesto identificado como α	96
Figura 57 Espectro de masas del compuesto identificado como β	96
Figura 58 Espectro de masas del compuesto identificado como γ	96
Figura 59 Cromatograma <i>Pinus cembroides</i>	97
Figura 60 Cromatograma <i>Pinus rudis</i>	97
Figura 61 Cromatograma <i>Pinus pseudoestrobis</i>	97
Figura 62 Cromatograma <i>Pinus patula</i>	98
Figura 63 Cromatograma <i>Pinus montezumae</i>	98
Figura 64 Cromatograma <i>Pinus devoniana</i>	98
Figura 65 Cromatograma <i>Pinus maximartinezii</i>	99
Figura 66 Cromatograma <i>Pinus douglasiana</i>	99
Figura 67 Cromatograma <i>Pinus oocarpa</i>	99
Figura 68 Cromatograma <i>Pinus lumholtzii</i>	100
Figura 69 Cromatograma <i>Pinus edulis</i>	100

<i>Figura 70 Cromatograma Pinus leiophylla</i>	100
<i>Figura 71 Cromatograma Abies religiosa</i>	101
<i>Figura 72 Cromatograma Juniperus flaccida</i>	101
<i>Figura 73 Cromatograma muestra Pino 1</i>	102
<i>Figura 74 Cromatograma muestra Pino 2</i>	102
<i>Figura 75 Cromatograma muestra Pino 3</i>	102
<i>Figura 76 Cromatograma muestra Pino 4</i>	103
<i>Figura 77 Cromatograma muestra Pino 5</i>	103
<i>Figura 78 Cromatograma muestra Pino 6</i>	103
<i>Figura 79 Cromatograma Pino 7</i>	104
<i>Figura 80 Cromatograma muestra Pino 8</i>	104
<i>Figura 81 Cromatograma muestra Pino 9</i>	104
<i>Figura 82 Cromatograma muestra Pino 10</i>	105
<i>Figura 83 Cromatograma muestra Pino 11</i>	105
<i>Figura 84 Cromatograma muestra Pino 12</i>	105
<i>Figura 85 Cromatograma muestra Pino 13</i>	106
<i>Figura 86 Cromatograma muestra Pino 14</i>	106
<i>Figura 87 Cromatograma muestra Pino 15</i>	106
<i>Figura 88 Cromatograma muestra Pino 16</i>	107
<i>Figura 89 Cromatograma muestra Pino 17</i>	107
<i>Figura 90 Cromatograma muestra Pino 18</i>	107
<i>Figura 91 Cromatograma muestra Pino 19</i>	108
<i>Figura 92 Cromatograma muestra Pino 20</i>	108
<i>Figura 93 Cromatograma muestra Pino 21</i>	108
<i>Figura 94 Cromatograma muestra Pino 22</i>	109
<i>Figura 95 Cromatograma CamL1</i>	109
<i>Figura 96 Cromatograma ColL2</i>	109
<i>Figura 97 Cromatograma MerA1</i>	110
<i>Figura 98 Cromatograma MerA2</i>	110
<i>Figura 99 Cromatograma MerA3</i>	110
<i>Figura 100 Cromatograma MerA4</i>	111

<i>Figura 101 Cromatogrma MerA5</i>	111
<i>Figura 102 Cromatograma MilA1</i>	111
<i>Figura 103 Cromatograma MilA2</i>	112
<i>Figura 104 Cromatograma MilB2</i>	112
<i>Figura 105 Cromatograma MixA1</i>	112
<i>Figura 106 Cromatograma OaxC3</i>	113
<i>Figura 107 Cromatograma SonA1</i>	113
<i>Figura 108 Cromatograma SonA2</i>	113
<i>Figura 109 Cromatograma SonP1</i>	114
<i>Figura 110 Cromatograma TolA1</i>	114
<i>Figura 111 Cromatograma TuxA1</i>	114
<i>Figura 112 Cromatograma TuxA2</i>	115
<i>Figura 113 Cromatograma TuxA3</i>	115
<i>Figura 114 Cromatograma TuxA4</i>	115
<i>Figura 115 Cromatograma TuxA5</i>	116

Lista de tablas

Tabla 1 Diversidad de las familias de coníferas mexicanas. 7	
Tabla 2 Distribución de coníferas por región geográfica. 8	8
Tabla 3 Distribución de los pinos según los tipos de suelo (Food and Agriculture Organization of United Nations, s.f.)..... 10	10
Tabla 4 Muestras de pinos certificados 32	32
Tabla 5 Muestras de pino de origen botánico desconocido..... 34	34
Tabla 6 Muestras de copales comerciales que contuvieron moléculas diterpénicas..... 37	37
Tabla 7 Muestras arqueológicas analizadas. Incensario de Origen Maya -Champotón, Campeche. 39	39
Tabla 8 Muestras arqueológicas analizadas. Ofrenda a Tláloc, Huexotla, Texcoco. Estado de México. 40	40
Tabla 9 Tiempo de retención de las moléculas estudiadas. 42	42
Tabla 10 Fragmentación de los espectros de masas de las moléculas encontradas. 43	43
Tabla 11 Composición molecular de resinas de Pinaceae certificadas botánicamente analizadas. 44	44
Tabla 12 Resumen del análisis de componentes principales de resinas certificadas..... 45	45
Tabla 13. Correlación componentes-variables del análisis de componentes principales de resinas certificadas..... 48	48
Tabla 14 Composición molecular de resinas de origen botánico desconocido..... 49	49
Tabla 15 Especies identificadas en las muestras comerciales 57	57
Tabla 16 Moléculas encontradas en muestras comerciales de resina de pino. Asignación de Compuestos: (I) Ac. Pimárico, (II) Ac. Isopimárico, (III) Ác. Palústrico, (IV) Ác. Dehidroabiético, (V) Ác. Abiético, (VI) Ác. Sandacopmárico, (a) Sandacopimaral, (b) Isopimaral, (c) Palustrial, (d) Levopimaral, (e) Dehidroabietal, (f) Abietal, (g) Pimaral; (α), (β) y (γ) son compuestos diterpénicos no identificados. 58	58
Tabla 17 Moléculas encontradas en la muestra tomada en el interior del incensario..... 75	75
Tabla 18 Moléculas encontradas en la muestra del exterior del Incensario 76	76
Tabla 19 Moléculas encontradas en el perfil de la muestra de la ofrenda a Tláloc 83	83
Tabla 20 Información estadística de las curvas de calibración..... 84	84

Lista de abreviaturas

°C	Grados Celsius
CA	California
cm	Centímetro
DHA	Ácido dehidroabiético
EI	Ionización por impacto electrónico
eV	Electrón volts
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GGPP	Geranil difosfato
HMDS	Hexametildisilazano
IPP	Isopentil pirofosfato
m	Metro
MEP	Meteritritol difosfato
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de masas
NIST	National Institute of Standards and Technology
PCA	Análisis de componentes principales
TBS	Silil dimetil terbutilo
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilano
EUA	Estados Unidos de América

1 Planteamiento del problema

A pesar de la abundancia de literatura que concierne a la composición molecular de las resinas de pino en el mundo (Arrabal, et al., 2005), el estudio de resinas en pinos mexicanos se limita a solo dos especies de pino mexicano (*Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*) (Maya Zepeda, 2006).

Concretamente el estudio del perfil molecular de las resinas de pinos mexicanos se ha centrado en el estudio de ácidos diterpénicos de las especies antes mencionadas.

La literatura que concierne al estudio de la composición molecular de las resinas de pino en otras partes del mundo ha reportado diferentes constituciones, las moléculas que componen estas mezclas son principalmente diterpenos y sesquiterpenos presentes en cantidades moderadas. Los diterpenos presentes en las resinas de pino dependen de la especie y su origen geográfico (Arrabal, et al., 2005; Rezzi, et al., 2005).

Establecer el perfil molecular de las resinas de pino es importante para realizar la identificación de la especie a la que pertenecen las muestras de resina provenientes de objetos del patrimonio cultural o de origen comercial que erróneamente se catalogan como copales.

En realidad “el copal genuino” o de primera calidad, tiene un origen botánico distinto.

2 Hipótesis

Es posible realizar la deducción del origen botánico de resinas diterpénicas comerciales o arqueológicas mexicanas comparando su perfil molecular, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con aquel que presentan las resinas obtenidas de pinos cuyo origen botánico es conocido y su perfil molecular ha sido determinado empleando GC-MS.

3 Objetivo General

Desarrollar un protocolo que permita inferir el origen botánico de resinas diterpénicas mexicanas comercializadas en mercados tradicionales del país con particular énfasis en la zona que corresponde a Mesoamérica, con el fin de aplicar esta metodología de identificación a resinas arqueológicas o artísticas.

4 Objetivos Particulares

Constituir un repositorio de resinas de *Pinaceae* de origen certificado para obtener su perfil molecular y emplearlo como referencia para realizar la identificación de resinas de origen desconocido a futuro, en especial la de resinas arqueológicas y comerciales.

Colectar resinas de mercados permanentes y anuales en el centro y sur de la República Mexicana, que formarán también parte del repositorio de materiales de referencia.

Desarrollar un protocolo de pre-tratamiento de análisis adecuado para el estudio de resinas diterpénicas por medio de GC-MS.

Desarrollar un protocolo GC-MS que permita caracterizar la composición diterpénica a nivel molecular, de las resinas de interés.

Analizar las muestras de resinas comerciales y de origen botánico certificado siguiendo el protocolo y metodología analítica desarrollados.

Construir un modelo quimiométrico acoplando el análisis de componente principal (PCA) con los resultados de cromatografía de gases para la interpretación de resultados.

Aplicar los protocolos desarrollados para el estudio de resinas comerciales a resinas arqueológicas para sugerir su origen botánico.

5 Justificación

De acuerdo con la bibliografía revisada, hasta la fecha no se ha definido con precisión una estrategia para la caracterización a nivel molecular de resinas mexicanas de *Pinaceae*, la identificación de un perfil molecular preciso es necesaria si se desea identificar su origen botánico.

Este trabajo plantea la constitución de un repositorio de materiales de referencia, y a partir de este, la construcción de una base de datos con perfiles moleculares que permita la discriminación de orígenes botánicos de muestras de resinas diterpénicas, ya sean de origen comercial o pertenecientes al patrimonio cultural mexicano.

Los resultados obtenidos de los análisis de resinas de *Pinaceae* pertenecientes al patrimonio cultural permitirán inferir el origen geográfico de sus materiales constitutivos, así como elucidar información acerca de diversos aspectos de las culturas que produjeron estos objetos tales como su relación con el medio ambiente y su manejo de los recursos naturales, la descripción de las técnicas y tecnología usadas en su manufactura, las rutas de comercio, los aspectos rituales y su importancia y usos en épocas precisas del pasado.

De la misma manera servirán para observar la incorporación de las resinas en piezas arqueológicas. Esta información contribuirá con la identificación de elementos que permitan la autenticación, conservación y restauración adecuadas de estas obras del patrimonio.

6 Antecedentes

Desde la antigüedad, los materiales de naturaleza orgánica han sido empleados como ligantes en pinturas, adhesivos, impermeabilizantes, entre otros.

Las excavaciones arqueológicas permiten recuperar a menudo una amplia variedad de objetos y materiales que han sido recolectados, procesados y usados por la humanidad a través del tiempo. Debido a su largo periodo de enterramiento, algunos de estos materiales y objetos, especialmente aquellos de naturaleza orgánica, se encuentran parcial o totalmente alterados.

En el plano de la conservación cabe recordar que los materiales orgánicos son más sujetos a la degradación que los inorgánicos, de manera que, si se puede conocer la composición molecular de los primeros, se puede asegurar que los objetos antiguos del patrimonio cultural se conserven (Colombini & Modugno, 2009).

Por otro lado, la identificación de los materiales empleados en pinturas artísticas provee información valiosa para el reconocimiento de la técnica del artista y para la elaboración de un proyecto de restauración correcto, en particular el análisis del ligante. Esta ha sido una de las tareas principales de la química analítica en estudios de conservación en los últimos años (Russo & Avino, 2012).

Entre las diversas clases de materiales orgánicos usados como ligantes, las resinas naturales tienen la reputación de ser difíciles de identificar, debido a la similitud física entre diferentes tipos de las mismas, a su uso en forma de mezcla, y a los procesos de degradación a los que se ven sometidas con el paso del tiempo.

Otro uso que se le da a las resinas en el plano artístico es como capas protectoras –barnices- y adhesivos para objetos en museos, tales como esculturas pequeñas, pinturas, joyería y muebles, porque son pegajosas, hidrofóbicas, y fáciles de recolectar (Chivari, et al., 1995).

Según diferentes tratados europeos las resinas no solo se aplicaban directamente en su forma natural, sino que a menudo eran calentadas y sometidas a procesos parecidos a la destilación, para obtener materiales como alquitrán y brea (Osete-Cortina & Doménech-Carbó, 2005).

De acuerdo a las crónicas de Sahagún probablemente se aplicaban procesos de tratamiento con calor equivalentes para la transformación de resinas naturales desde la época precolombina en Mesoamérica (Martínez-Cortés, 1970).

6.1 Características físicas de las resinas

El término resina, se emplea de manera general para referirse a la savia o cualquier exudado de las plantas, ambos términos incluyen numerosas sustancias. A través de la historia escrita ha habido una tendencia a caracterizar la resina como un exudado pegajoso. Sin embargo, la vaguedad de esta definición ha llevado a una continua confusión con otros exudados, incluyendo a las gomas, mucílagos, aceites, ceras, y látex. Algunos de estos términos, a menudo se han usado como sinónimos de resina (Lucero, 2012).

Sin embargo, todos los exudados que han sido confundidos con resinas pueden ser distinguidos químicamente.

En el mercado nacional se encuentran diferentes tipos de copales, como se mencionó antes los copales se obtienen tradicionalmente de *Burseras*.

1. El copal de primera calidad es blanco o un poco verdoso, en el caso del copal limón. Son barras completas y grandes y contienen poca basura.
2. El copal de segunda lo conforman barras de resina, delgadas, pequeñas, algunas veces se encuentra mezclado con una sustancia granulosa y blanca, probablemente algún carbonato.
3. La mirra se compone se secciones de corteza embebidas en la resina.
4. El copal negro es la resina colectada directamente de los árboles, producida por raspaduras sin la intervención del hombre o por picaduras de ciertos insectos en la corteza.
5. El copal piedra o teocopal es producido por abejas de ciertas especies que mezclan copal con los granos de arena con que edifican sus nidos. Para algunos grupos étnicos este tiene una connotación simbólica muy importante (Linares & Bye, 2008).

6. Cabe resaltar que también se encuentran copales que se comercializan como sintéticos, sin embargo, estos son los que el presente trabajo identificó más adelante como resinas de pino, por medio de GC-MS.



Figura 1 Tipos de copales vendidos en el mercado de Sonora de la Ciudad de México.

6.2 Distribución de los pinos en México

De las seis familias de coníferas conocidas a nivel mundial, 4 están presentes en México, y son: *Cupressaceae*, *Pinaceae*, *Podocarpaceae* y *Taxaceae*. Las 2 familias restantes son la monotípica *Sciadopityaceae* (*Sciadopitys verticillata*) de Japón y la familia *Araucariaceae* representada por 3 géneros distribuidos en el hemisferio sur (Gernandt & Pérez-de la Rosa, 2014).

Se estima que hay 670 especies de coníferas a nivel mundial, de las cuales 94 (Tabla 1) tienen una distribución natural en México. En el país, el conjunto de bosque de coníferas ocupa cerca del 15% y más de 9/10 de esta superficie corresponde a los de *Pinus* o de *Pinus* y *Quercus*. Le siguen en importancia, en cuanto a la extensión, los bosques de *Juniperus* y los de *Abies*, siendo los restantes de distribución muy restringida y localizada (Rzedowsky, 2006).

Tabla 1 Diversidad de las familias de coníferas mexicanas.

Familia	Géneros	Especies	Taxa	Especies endémicas
<i>Cupressaceae</i>	4	29	35	13
<i>Pinaceae</i>	4	61	74	30
<i>Podocarpaceae</i>	1	3	3	0
<i>Taxaceae</i>	1	1	1	0
Total	10	94	113	43

En Norteamérica se reconocen tres regiones de alta diversidad de especies de pinos: 1) México, 2) California y 3) sureste de EUA (Farjon & Styles, 1997). Las especies de pinos de México llegan en el norte hasta EUA y Canadá y en el sur hasta Nicaragua en América Central.

En México se presume que existen alrededor de 61 especies de pinos, que representan más de 42% de las especies conocidas en el mundo: esta diversidad es aún mayor si se toma en cuenta las subespecies y variedades (Sánchez-González, 2008). La gran mayoría de los pinos mexicanos poseen una distribución geográfica restringida al territorio de este país y a algunas áreas vecinas y casi todos constituyen elementos dominantes o co-dominantes en la vegetación actual. Los pinares son comunidades vegetales muy características de México y ocupan vastas superficies de su territorio (Rzedowsky, 2006).

Los pinos de México se distribuyen en cinco regiones principales, con base en grupos particulares de especies (Tabla 2) (Figura 1):

- I. Baja California Norte y Sur
- II. Noroeste: Chihuahua, Durango, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Sonora y Zacatecas.
- III. Noreste: Coahuila, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí y Tamaulipas.
- IV. Centro: Aguascalientes, Colima, Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala y Veracruz.

- V. Sur, Macizo de Oaxaca, Sierra de San Cristóbal, Sierra de Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Campeche y Quintana Roo (Sánchez-González, 2008).

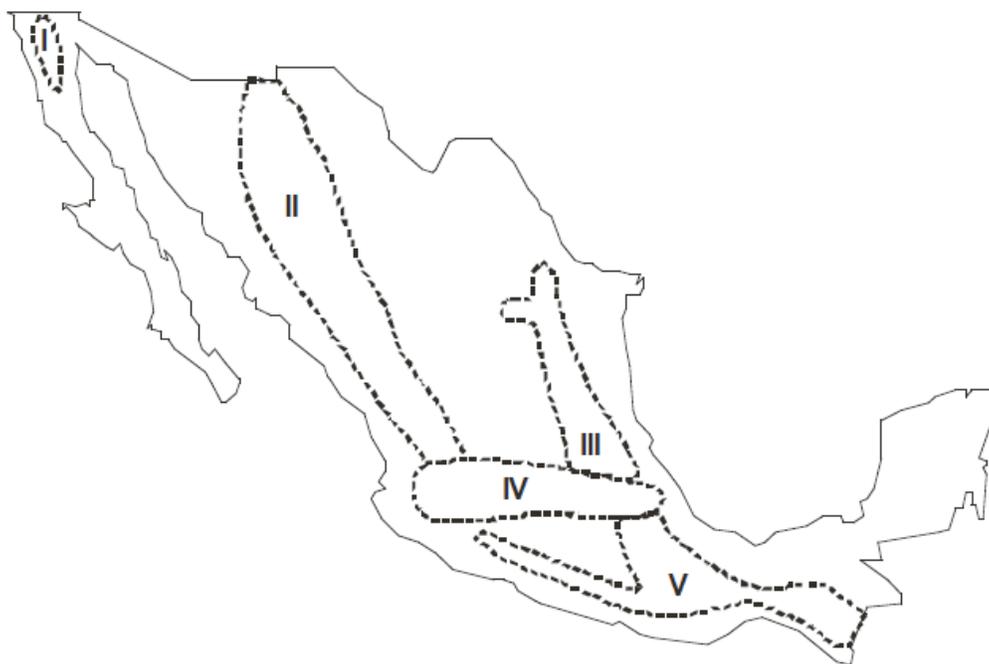


Figura 2 Distribución de los taxa de los pinos en México (Sánchez-González, 2008).

Tabla 2 Distribución de coníferas por región geográfica.

Región	Familias	Géneros	Especies
California	2	5	16
Noroeste	5	13	74
Noreste	4	8	37
Centro	4	8	26
Sur	4	8	30

Con la posible excepción de la Península de Yucatán, existen bosques de pino en todas las entidades federativas del país. Su distribución geográfica coincide a grandes rasgos con la de los elevados macizos montañosos; así, se presentan en los extremos norte y sur de Baja California, a lo largo de la Sierra Madre Occidental, del Eje Volcánico Transversal, de la Sierra Madre del Sur, de las sierras del norte

de Oaxaca y de las dos grandes sierras de Chiapas. En la Sierra Madre Oriental también existen, aunque en forma más dispersa, pues ahí en función de menores altitudes y de la existencia de grandes áreas con caliza como roca madre, los encinares constituyen, por lo general, el tipo de bosque predominante. Se localiza un manchón en la Sierra de Tamaulipas, ubicada en la Planicie Costera Nororiental del Golfo de México, al igual que en muchas otras sierras y sierritas aisladas dentro de la gran zona árida del Altiplano, sobre todo en el estado de Coahuila (Rzedowsky, 2006). El noreste de México presenta la mayor riqueza de especies en el país. Jalisco resulta ser el estado con más diversidad ya que cuenta con 34 especies registradas, su diversidad se debe a la colindancia de la sierra Madre Occidental con el Eje Volcánico Transversal. Otros estados en el occidente del país con altos índice de riqueza en variedades de pino son Durango (32) y Chihuahua (29). La sierra Madre Oriental en el noreste de México contiene casi tantas especies como la sierra Madre Occidental; otros estados con alta diversidad de pinos son Coahuila (28), Nuevo León (24) e Hidalgo (24), mientras que Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Veracruz y Zacatecas tienen más de 16 especies cada uno (Gernandt & Pérez-de la Rosa, 2014).

Con respecto a la distribución de *Pinus*, sólo las zonas tropicales de baja altitud de los estados como Tabasco y Yucatán carecen de pinos nativos. (Sánchez-González, 2008).

6.2 Características de los pinos

Por la morfología y la disposición de sus hojas, los pinos poseen una fisonomía particular y los bosques que conforman presentan un aspecto que difícilmente puede confundirse con el de otros tipos de vegetación. Si bien el conjunto de los pinares establece una unidad fisonómica bien definida, no sucede exactamente lo mismo desde el punto de vista ecológico. Aunque la mayoría de las especies mexicanas de *Pinus* posee afinidades hacia climas de templados a fríos y semihúmedos y hacia los suelos ácidos, existen notables diferencias entre una especie y otra y algunas que no se ajustan a estas normas prosperan en lugares francamente calientes, húmedos o semiáridos, así como sobre suelos alcalinos. Por

otra parte, dentro de las mismas zonas de clima templado y semihúmedo, los pinares no constituyen el único tipo de vegetación prevaleciente, pues compiten ahí con los bosques de *Quercus* y a veces son los de *Abies*, de *Juniperus*, de *Alnus* y con algunas otras comunidades vegetales (Rzedowsky, 2006).

La distribución de *Pinus* según los tipos de suelos se presenta en la tabla 3.

Tabla 3 Distribución de los pinos según los tipos de suelo (Food and Agriculture Organization of United Nations, s.f.)

Tipo de suelo	Especie
Suelos rojos de tipo laterítico o ferro-alítico	<i>P. oocarpa</i> , <i>P. michoacana</i>
Suelos negros de praderas o tipo chernozem	<i>Abies</i> ssp., <i>P. rudis</i> , <i>P. hartwegii</i> , <i>Cupressus</i> ssp.
Suelos arenosos o rocosos	<i>P. lumholtzii</i> , <i>P. duranguensis</i> (en el centro de México), <i>P. teacote</i>
Suelos pardos forestales	<i>P. montezumae</i> , <i>P. pseudostrobus</i> , <i>P. tenuifolia</i> , <i>P. patula</i> , <i>P. duranguensis</i> (en el norte), <i>P. couperi</i>
Sobre claros	<i>P. leiophylla</i> , <i>P. pseudostrobus</i> .

6.3 Explotación de las resinas de pino en México

La extracción de resina constituye otro tipo de aprovechamiento de bosques de pinos. La resinación se realiza generalmente en zonas donde el tamaño de los árboles y la rapidez de su crecimiento no son adecuados para una explotación maderera intensiva (Rzedowsky, 2006).

De los principales estados productores de madera (Durango, Chihuahua, Michoacán, Jalisco y Oaxaca), sólo Michoacán se encuentra entre las entidades con una producción no maderable alta, basada fundamentalmente en la resina de pino. De acuerdo a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, la producción de resinas representa el 11.4% de la producción forestal no maderable en donde los estados de Michoacán y México, concentran el 95% de la producción. En 2016 el estado de Michoacán produjo 78.8% del total nacional con 22,241 toneladas de

resina, seguido por el estado de México con el 16.3% de la producción nacional (Figura 2). (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016)

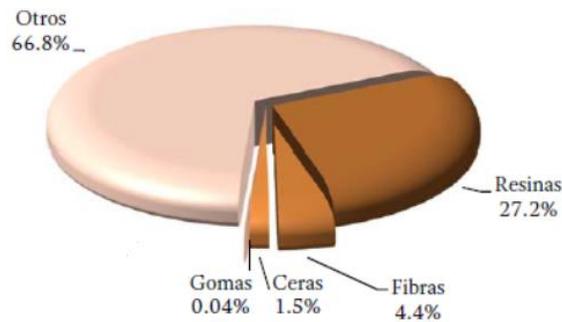


Figura 3 Volumen de producción forestal no maderable en México (no incluye tierra de monte) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016).

Cabe mencionar que, en 2016 sólo seis estados del país reportaron producción de resinas: Chiapas, Jalisco, México, Michoacán, Morelos y Oaxaca (Figura 3) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016).

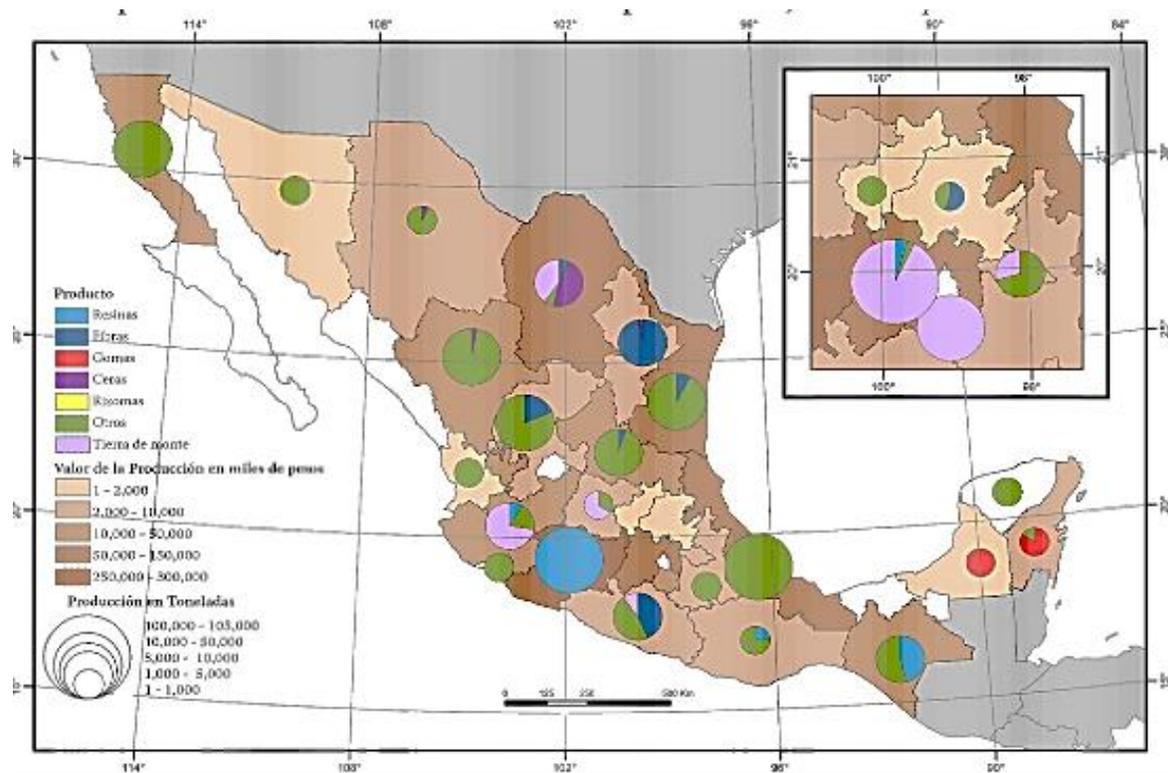


Figura 4 Producción forestal no maderable por producto (2015) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016).

Las especies más frecuentemente resinadas son *P. oocarpa*, *P. michoacana*, *P. leiophylla*, *P. pseudostrobus*, *P. montezumae* y *P. teocote* (Rzedowsky, 2006).

6.4 Uso de los copales en México Prehispánico

En el siglo XVI se le llamaba resina a “toda materia aceitosa o humor craso y pegajoso que sudan y destilan los árboles”. Los antiguos mexicanos conocieron varias que emplearon en su artesanía, en su medicina y en su religión. (Martínez-Cortés, 1970)

Hay otros casos en los que se registraron aplicaciones artesanales, para el uso de resinas. El término copal es un aztequismo, derivado de la palabra *copalli*, término que empleaban los antiguos mexicanos para designar a “cualquier género de goma”. Esto originó que cualquier resina fuera nombrada con el término copal (Martínez-Cortés, 1970).

La resina obtenida de los *Pinus oocarpa* era conocida como *nabá* por los Mayas que vivieron en Chiapas, como *iztahte* por los Maya de Yucatán, y como *ocotzotl* u *óxitl* por los Nahuas de la meseta central (Vázquez de Ágredos Pascual, et al., 2003).

El vocablo *ocotzoquahuitl* lo aplica Fray Bernardino de Sahagún al pino y al *ocotl* y dice que de ellos se saca la pez y la resina. En su obra, dice que del pino se obtenían dos productos: el *ocótzotl* y el *úxitl* u *óxitl*. Tal parece que el término *ocótzotl* lo aplicaba a la resina natural de pino que conocemos como trementina. En cambio, el *óxitl* dice el propio Sahagún que “es un aceite sacado por artificio de la resina de pino” (Sahagún, 1956).

El término “artificio” tal vez implica el empleo de la técnica de destilación por medio de la cual se obtenía cierto producto derivado de otro producto natural (Martínez-Cortés, 1970).

El Padre Garibay, profundo conocedor de la lengua y cultura nahuas, dice que el vocablo *óxitl* sirve para nombrar la trementina y a un unguento sacado de esta, o al aceite de pino (Garibay, 1964). Fray Alonso de Molina dice que *ocótzotl* es “resina de pino o trementina” (Molina, 1944).

En la época prehispánica, se le atribuía a la diosa Tzapotlatena (Figura 4) el descubrimiento de la resina *óxitl* y la producción de la brea y el hule. Otro relato dice que fue el dios del fuego Xiutecutli o Huehuetéotl quien hizo la resina *úxitl*, así como la sal, la miel espesa, el carbón y la cal. Esta participación del dios del fuego implica que el ungüento se obtenía por la acción del calor tal como la sal, la miel de maguey espesa, el carbón y la cal.



Figura 5 Tzapotlatena (Martínez-Cortés, 1970).

La resina *óxitl* y la de otros árboles como el *ócotzotl* se empleaba como adhesivos para diversos rituales en los que se usaban plumas pegadas a la piel, también se empleaba como adhesivo en la manufactura de flechas.

Son numerosos y variados los usos de la resina de pinos en medicina. Muchas veces se antoja bastante racional el empleo de dicha sustancia, como en el caso de enfermedades de la piel, fracturas, etc. Sirvan a manera de ejemplo su prescripción para curar “los pies agrietados y para frotar la piel áspera”. Para las fracturas se recomendaba después de haber “concertado” los huesos, aplicar una “bilma” de resina mezclada con ciertas yerbas (Martínez-Cortés, 1970).

Por otro lado, el nombre de los árboles que producían resina se forma con el vocablo *copalli* al que se le agregan otras palabras para describir caracteres particulares. El

árbol principal o central del género es el nombrado *copalquáhuatl* o *teocolquahuatl* por los nahuas y *pom* por los mayas. (Vázquez de Ágredos Pascual, et al., 2003).

Quahuatl es un vocablo náhuatl que significa árbol, leña madera. Todos los vegetales de los que se podía obtener leña o madera, se llamaban *quahuatl*. (Martínez-Cortés, 1970).

De esta manera se derivan los distintos nombres como el *xochicopalli* o copal florido, el *tecopalquáhuatl* o copal silvestre, etc

Estas resinas eran usadas para diferentes propósitos, y crecen en diversas regiones a través de Mesoamérica. El copal que se vende como copal de primera calidad en México proviene de *Burseras* (Vázquez Molotla, 2017).

6.5 Características químicas de las resinas

Operacionalmente, las resinas se definen como una mezcla liposoluble de terpenoides volátiles y no volátiles, y/o componentes fenólicos secundarios que son usualmente secretados en estructuras especializadas localizadas ya sea internamente o en el exterior de las plantas, estos compuestos tienen potencial significancia en interacciones ecológicas. Nótese que las resinas consisten primariamente de metabolitos secundarios o compuestos que, aparentemente no tienen un papel fundamental en la fisiología primaria o elemental de la planta (Lucero-Gómez, et al., 2014).

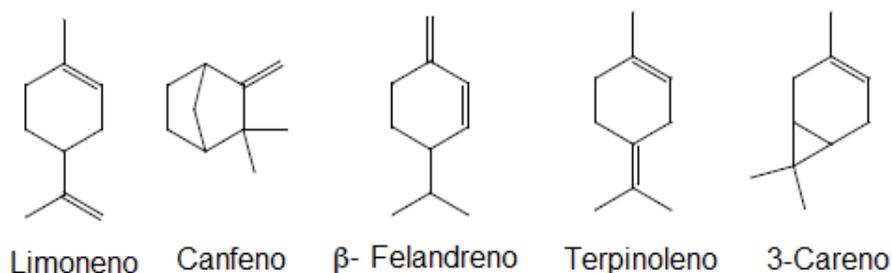
Bajo ataques de patógenos o lesiones, la resina se acumula en el sitio de la herida, después de la volatilización de los monoterpenos, los ácidos diterpénicos se cristalizan y la polimerización autooxidativa forma una barrera que sella la herida y confina fuera agentes infecciosos (Croteau & Funk, 1994). El ácido abiético y los isómeros relacionados son claramente importantes en el sellado de las heridas, mientras que el ácido dehidroabiético es más viscoso y es altamente cristalino (Cotreau & Phillips, 1999).

Las resinas diterpénicas son exudados de una gran variedad de árboles alrededor del mundo. La mayoría de estas resinas se originan de coníferas (*Coniferae*).

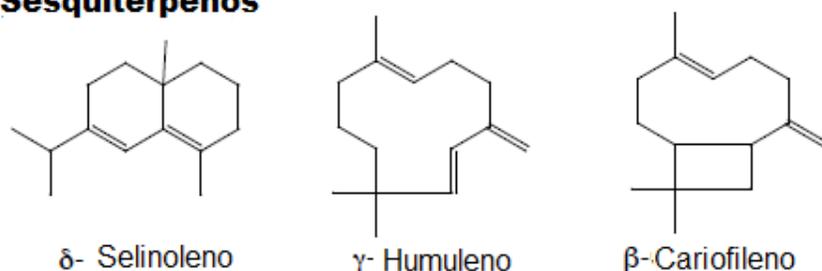
La mayoría de estas familias son conocidas por producir resinas que forman ámbar. Este contiene diterpenoides dicíclicos con cadenas que contienen dobles enlaces conjugados responsables de la polimerización y endurecimiento de estas resinas.

Una excepción importante es la subfamilia Pinaceae que ha sido reconocida por su producción de resina y comprende especies de pino (*Pinus*), alerce (*Larix*), piceas (*Picea*) y abetos (*Abies*). Estos árboles producen bálsamos que no forman ámbar, como resultado de la presencia de grandes cantidades de ácidos diterpénicos con estructuras de pimaranos y abietanos que no polimerizan instantáneamente (Van den Berg, et al., 2000).

Monoterpenos



Sesquiterpenos



Ácidos diterpénicos

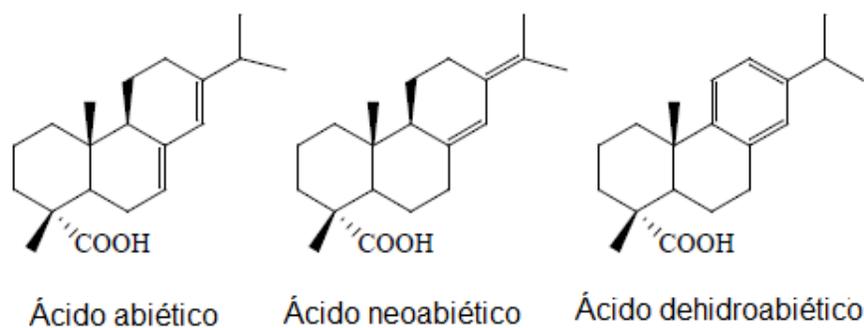


Figura 6. Constituyentes químicos de resinas de coníferas.

Los terpenos se constituyen de unidades de isopreno con la fórmula general $(C_5H_8)_n$ (Schulz & Baranska, 2007). Constituyen el grupo más grande de productos secundarios y derivan de un compuesto de 5C, IPP (isopentil pirofosfato) (Rodrigues-Corrêa, et al., 2012). De acuerdo a la cantidad de unidades de isopreno (n) se pueden dividir en varias clases: hemiterpenos (C_5H_8), monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), diterpenos ($C_{20}H_{32}$), tetraterpenos ($C_{40}H_{64}$) y politerpenos $(C_5H_8)_n$ (Figura 6) (Schulz & Baranska, 2007).

Los ácidos diterpénicos son ácidos carboxílicos bi- o tricíclicos de 20 carbonos de diferentes tipos de esqueletos, donde la diferencia se introduce en isómeros de dobles enlaces, diastereoisómeros y funcionalización adicional (Keeling & Bohlmann, 2006). Los diterpenos se caracterizan por tener 3 esqueletos estructurales diferentes (abietano, pimarano y labdano) que varían cuantitativamente en las diferentes familias de coníferas (Langenheim, 2003).

Todos ellos tienen dobles enlaces conjugados que pueden reaccionar, produciendo especies más oxidadas. Los pimaranos no contienen dobles enlaces conjugados y parecen ser más estables, ya que encuentran derivados. Aunque, algunos reportes han mostrado un decremento en la concentración de pimaranos en las últimas etapas de envejecimiento de la resina (Beltran, et al., 2017).

6.6 Resinas de Pinaceae

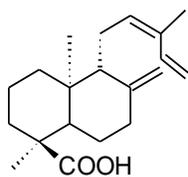
Las resinas de pino son mezclas complejas de diterpenos ácidos y neutrales con una fracción de compuestos volátiles más o menos importante. Los componentes principales son monoterpenos neutrales (α -pineno) y ácidos diterpénicos. Los diterpenos neutrales y los sesquiterpenos también están presentes en cantidades de apreciables a moderadas. (Figura 7).

Dependiendo de la especie de pino y su origen geográfico las resinas pueden estar compuestas de diterpenos bicíclicos (labdanos), diterpenos tricíclicos (abietanos y pimaranos) y diterpenos macrocíclicos (cembranos) como componentes principales.

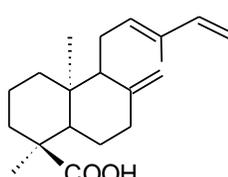
Los ácidos del tipo abietano y pimarano, como el ácido pimárico y el ácido abiético, son los más abundantes en resinas *Pinaceae*, permaneciendo relativamente suaves

y sin polimerizarse. Sin embargo, las resinas del tipo abietano se pueden volver relativamente sólidas con una superficie dura, pues el precursor abietadieno, es propenso a la polimerización. Por otro lado, los ácidos del tipo labdano, como los ácidos comúnicico y agático, pueden contener compuestos como dienos que se polimerizan. Este último tipo de diterpenos son los principales constituyentes de la resina en la familia de los cedros (Cupressaceae) (Langenheim, 2003).

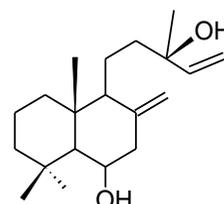
Labdanos



Ácido ozico

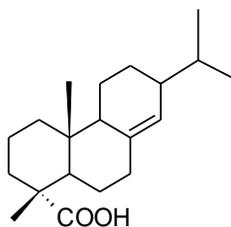


Ácido comunico

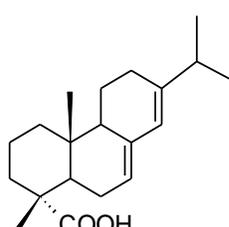


Larixol

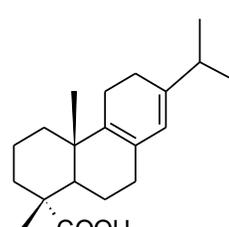
Abietanos



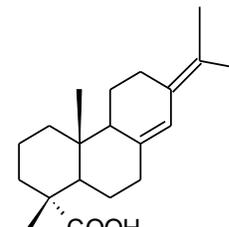
Ácido levopimárico



Ácido abiético

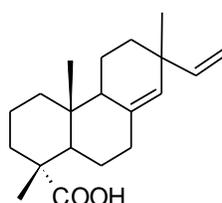


Ácido palústrico

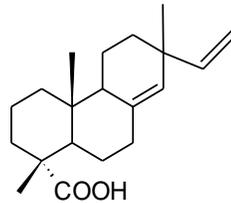


Ácido neoabiético

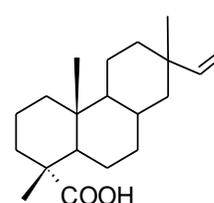
Pimaranos



Ácido pimárico



Ácido sandacopimárico



Ácido isopimárico

Figura 7 Labdanos, pimaranos y abietanos diterpenoides presentes en resinas de Pinaceae

Los ácidos diterpénicos se derivan del geranyl pirofosfato del C-18 metil de esta olefina en abietadienol, abietadienal, y ácido abiético (Croteau & Funk, 1994). El precursor acíclico, el geranylgeranyl difosfato (GGPP) es un derivado de la ruta del metileritritol difosfato (MEP). Las enzimas sintasas actúan en este sustrato para formar diterpenos, que subsecuentemente se hidroxilan y después se oxidan por otras enzimas, que posteriormente forman ácidos diterpénicos (Bohlmann & Keeling, 2006).

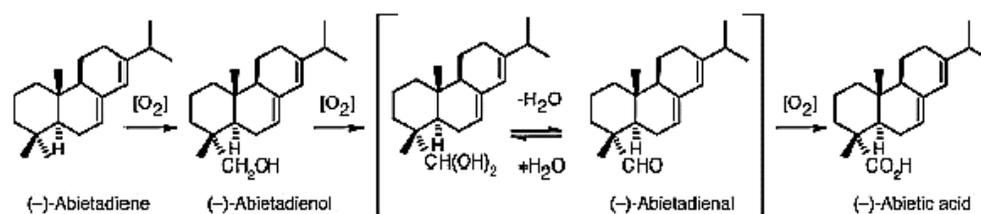


Figura 8 Mecanismo de la biosíntesis del ácido abiético (Bohlmann & Keeling, 2006).

6.7 Los terpenos como marcadores moleculares

El uso de los biomarcadores moleculares, operando en su modo más simple, consiste en relacionar estructuras o distribuciones que son “huellas químicas”, con compuestos y mezclas provenientes de organismos explotados en el pasado. Algunas pocas veces, la estructura de un único componente es suficiente para definir el origen de un material o residuo orgánico.

Uno de los aspectos fundamentales del concepto de biomarcador es que su fuente pueda ser encontrada de acuerdo a los arreglos de los carbonos del mismo. Entre más únicas sean las estructuras en un organismo, será mayor la certeza de la presencia de un constituyente en particular de acuerdo al marcador observado (Evershed, 2008).

El uso de los biomarcadores moleculares para la identificación de los componentes de los materiales resinosos está basado en la idea de que cuando ciertos compuestos naturales son sometidos a un ambiente determinado, son sujetos a cambios resultado de diagénesis y maduración. Estas moléculas, pierden sus grupos funcionales pero los esqueletos básicos de carbono permanecen intactos. Así es posible establecer una relación precursor-producto entre los compuestos

originales y los análogos presentes en sedimentos, piezas arqueológicas u objetos artísticos.

En la química de patrimonio artístico y arqueológico, los biomarcadores son considerados como moléculas diagnósticamente estables presentes en el material original o formadas a través de los siglos debido al envejecimiento de los mismos, en una cantidad apreciable (Colombini & Modugno, 2009).

Los terpenos constituyen una gran variedad de sustancias presentes en las plantas. Se ha encontrado que la gran variabilidad en la producción de terpenos se encuentra bajo un estricto control de la genética y por lo tanto los terpenos se pueden emplear como marcadores moleculares.

Frecuentemente el tipo de metabolitos secundarios son únicos para una especie dada de plantas y usualmente no son esenciales para la supervivencia de las células. Se asume que su función o importancia está principalmente relacionada con aspectos ecológicos y se usan como defensa contra predadores, parásitos y enfermedades, como señales para competencia interespecie, y para facilitar los procesos reproductivos (Schulz & Baranska, 2007).

Algunos de los principales componentes de las resinas de pino han sido utilizados como indicadores quimiotaxonómicos y marcadores bioquímicos de la procedencia de las diferentes especies (Schulz & Baranska, 2007).

Como se mencionó antes en este trabajo, el paso del tiempo produce cambios en los materiales del patrimonio y las resinas no son una excepción. El envejecimiento de las resinas diterpénicas de *Pinaceae* a nivel molecular es predominantemente el resultado de la oxidación del dieno conjugado presente en las resinas con esqueleto abietano. Estos se oxidan para formar el ácido dehidroabiético (DHA), que a su vez puede oxidarse aún más incorporando oxígeno (figura 9). El mecanismo preciso involucrado en este proceso de oxidación no está claro, pero puede ser similar a la oxidación del colesterol, que se conoce con mayor detalle (Van den Berg, et al., 2000).

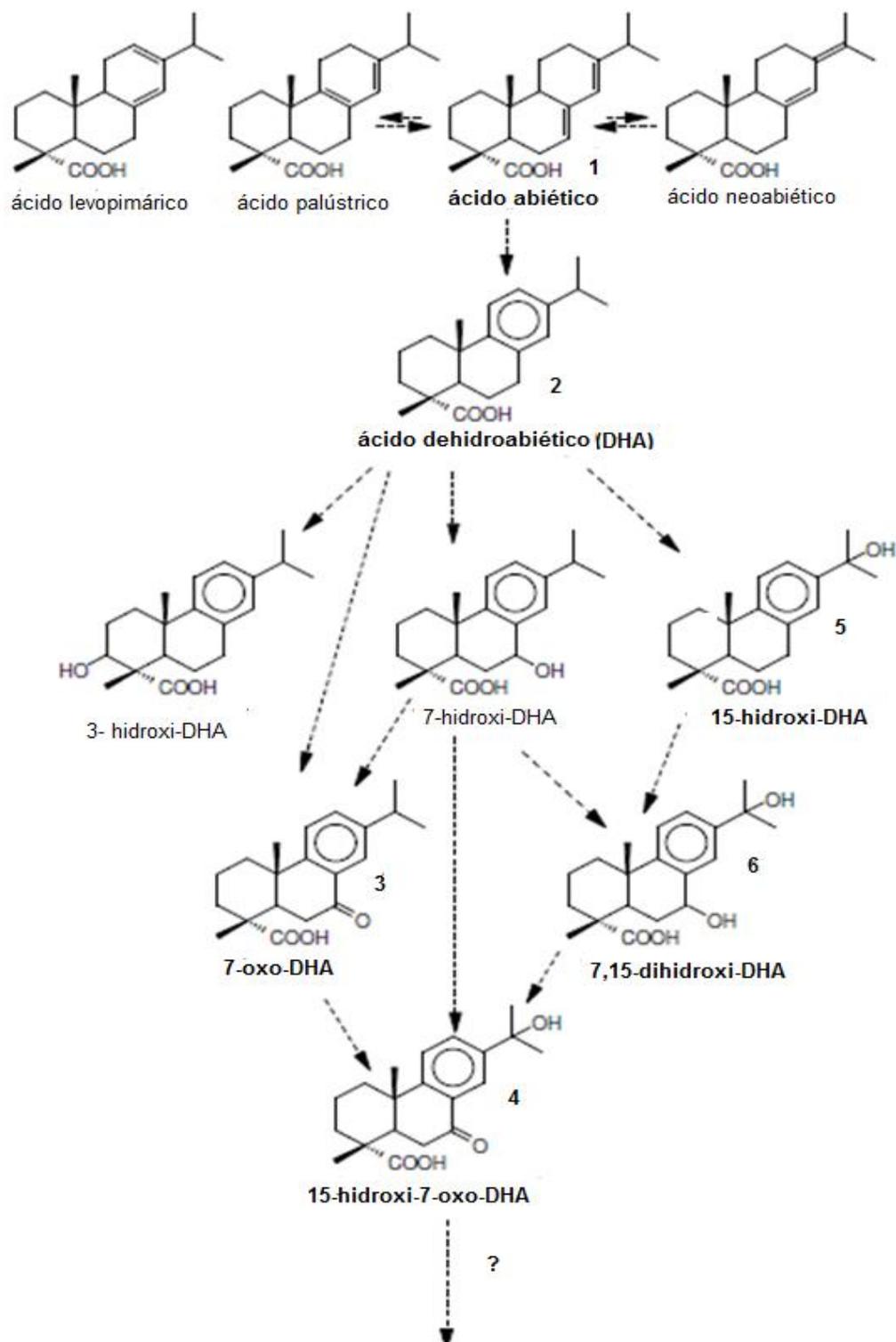


Figura 9 Rutas de isomerización y oxidación de ácidos abietanos. El grado de oxidación de un ácido (A-E) está representado por la posición vertical del compuesto (Van den Berg, et al., 2000).

Los procesos de oxidación que resultan en la incorporación de oxígeno se espera que ocurran por la formación de peróxido junto a un doble enlace. La pérdida de agua o reducción de este peróxido puede formar los oxo- o hidroxí- compuestos, respectivamente.

En el ácido dehidroabiético, las posiciones con mayor probabilidad de ser activas son las 7 y la 15. En la figura 9 se presentan sus rutas de oxidación e isomerización.

Los 4 abietanos más importantes y que se han propuesto como marcadores moleculares son: (1) ácido abiético, (2) ácido dehidroabiético DHA, (3) ácido 7-oxo-dehidroabiético y (4) ácido 15-hidroxi-7-oxodehidroabiético (Van den Berg, et al., 2000).

6.8 La cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica aplicada ampliamente al análisis de mezclas de compuestos orgánicos. El equipo empleado para GC generalmente consiste de un puerto de inyección, sometido a una temperatura controlada, en el cuál se introduce la muestra que pasa a una columna donde sus componentes son separados, esta columna también se encuentra en un espacio con temperatura regulada. Idealmente, los diferentes analitos retenidos dejan la columna uno por uno antes de alcanzar un detector. Un gas acarreador (Argón, Helio, Nitrógeno o Hidrógeno, por mencionar algunos) impulsa la muestra a lo largo de la columna (Sarker & Latif, 2006). En el camino de la muestra a través de la columna ocurren diferentes fenómenos de transferencia de masa, resultando en diferentes tiempos de retención de los analitos individuales. La señal del detector se grafica en función del tiempo que ha pasado desde la inyección de la muestra (Figura 10). Esta representación es llamada cromatograma (Figura 11) (Dettmer & Engewald, 2014).

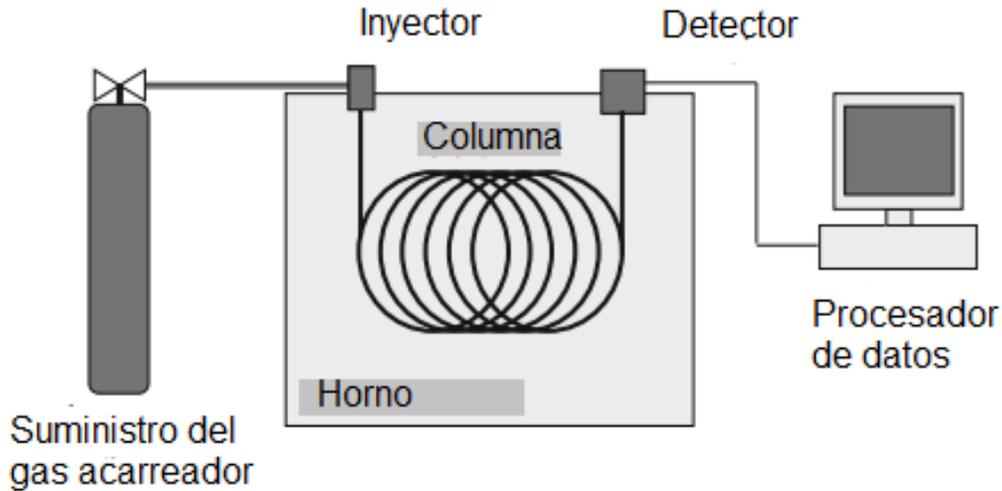


Figura 10 Esquema de un cromatógrafo de gases

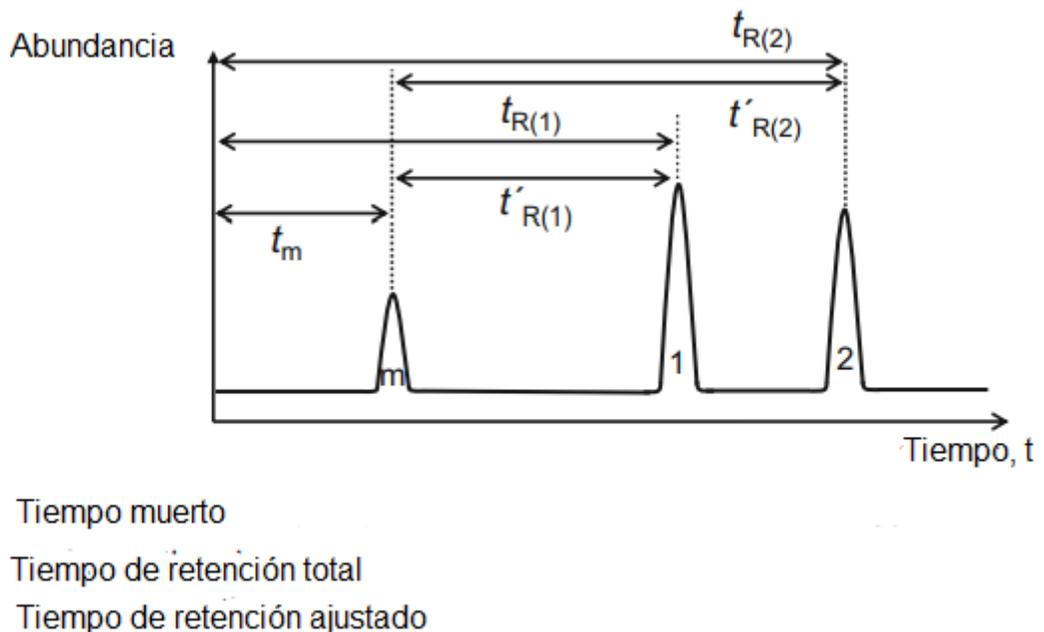


Figura 11 Cromatograma hipotético

El tiempo que pasa entre la inyección y la elusión se llama “tiempo de retención” (t_r) (Sarker & Latif, 2006). La separación de la mezcla se lleva a cabo entre la fase estacionaria y la fase móvil gaseosa.

Ya que el análisis de la muestra requiere derivados gaseosos, cuando hay presencia de compuestos no volátiles se requiere la derivatización de las muestras.

La cromatografía de gases acoplada a detectores de flama (GC-FID) se usa comúnmente en análisis cualitativos comparando los tiempos de retención de los componentes de una mezcla con estándares cromatográficos.

Una aproximación más poderosa consiste en utilizar como detector un espectrómetro de masas (GC-MS).

El espectrómetro de masas provee el espectro de masas de cada compuesto en la mezcla. La interpretación de los espectros y su comparación con librerías permite la identificación precisa de los compuestos. Esta aproximación es útil aún en los casos donde los estándares cromatográficos no están disponibles.

De esta manera la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una de las técnicas más utilizadas para la identificación de mezclas orgánicas en muestras derivadas de contextos arqueológicos y artísticos (Colombini, et al., 2005). La alta sensibilidad de esta técnica la hace ideal para su aplicación en este campo ya que la cantidad de muestra disponible para el análisis en el contexto de los objetos del patrimonio es usualmente muy pequeña e inferior a 1 mg (Marinarch, et al., 2004).

6.9 Espectrometría de masas

Como se mencionó en la sección anterior la espectrometría de masas es una técnica microanalítica que puede ser usada selectivamente para detectar y determinar cantidades de un analito. Además de ello también puede ser usada para determinar la composición elemental, la masa nominal y en algunos casos, la masa molecular de un analito.

También permite conocer algunos aspectos de la estructura molecular de un compuesto mediante la producción y detección de fragmentos de la molécula que corresponde a grupos discretos de átomos. (Watson & Sparkman, 2008)

La espectrometría de masas ofrece información específica de las sustancias para cada componente molecular incluyendo aquellos presentes en concentraciones a nivel de trazas en una mezcla compleja. (Dettmer & Engewald, 2014)

Cabe resaltar también que esta técnica tiene la capacidad de generar la mayor información que puede ser determinada por unidad de cantidad de un analito que cualquier otra técnica (Watson & Sparkman, 2008).

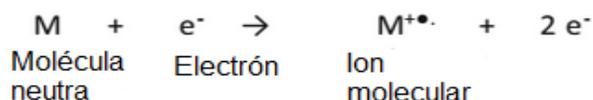
La espectrometría de masas se basa en la producción de iones en fase gaseosa producidos a partir de las moléculas del analito (en la fase gaseosa las especies se aíslan unas de otras, permitiendo el estudio de sus propiedades intrínsecas) y en su separación de acuerdo a su relación masa carga (m/z) (Colombini & Modugno, 2009) por lo que se utiliza la masa de los isótopos y no la masa atómica de los elementos (Watson & Sparkman, 2008).

6.9.1 Espectrómetro de cuadrupolo simple

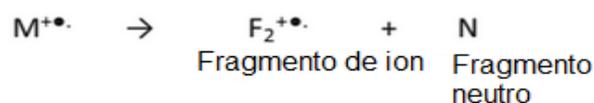
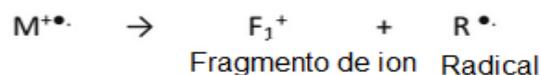
La espectrometría de masas puede ser dividida en dos procesos separados: ionización, y separación de masas y el registro de los iones formados. Diferentes métodos de ionización se pueden combinar con diferentes técnicas de separación de masas dependiendo de los resultados deseados. (Clemet & Karasek, 1988).

La ionización por impacto electrónico (EI) es la técnica de ionización más usada para formar iones de moléculas neutras que entran el espectrómetro de masas. En la fuente de ionización, las moléculas gaseosas colisionan con electrones emitidos de un filamento. Mientras se liberan los electrones de un electrodo cargado positivamente. Muchas de las moléculas orgánicas poseen potenciales de ionización superiores a 8 eV, por lo que los espectrómetros de masas operan a una energía fija de 70 eV, que garantizan la una reproducible alta eficiencia de ionización. Durante la ionización, un electrón es removido de una molécula neutra para formar un ion cargado que equilibra la energía extra por descomposición en fragmentos de iones, radicales y moléculas (figura 12). La eficiencia de este proceso de ionización depende del potencial de ionización del analito y la energía de los electrones que lo “impactan”. Los iones cargados son concentrados, acelerados, y después transmitidos a través de un campo magnético o eléctrico del analizador, mientras que los radicales y las moléculas neutras se remueven (Dettmer & Engewald, 2014).

Ionización (EI positivo)



Reacciones de fragmentación



Ionización captura de electrone (EI negativo)

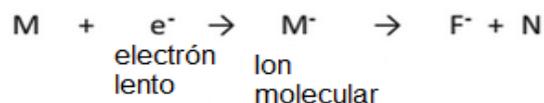


Figura 12 EI negativo y positivo de una molécula neutra y sus fragmentaciones subsecuentes (Dettmer & Engewald, 2014).

En un cuadrupolo simple, el analizador (figura 13) consiste en un arreglo paralelo de cuatro electrodos cilíndricos contados en una configuración cuadrada. El campo dentro del analizador se crea acoplando pares de cilindros opuestos aplicando radio frecuencia y corriente directa entre los pares. Los iones creados dentro de la fuente son inyectados a través del arreglo paralelo, y bajo la influencia de los campos describen trayectorias complejas. Algunas de estas trayectorias son inestables pues tienden al desplazamiento infinito desde el centro y los iones se pierden. De los iones que se transmiten exitosamente desde el analizador se dice que poseen trayectorias estables, y se graban en el sistema de detección. (March & Todd, 2005)

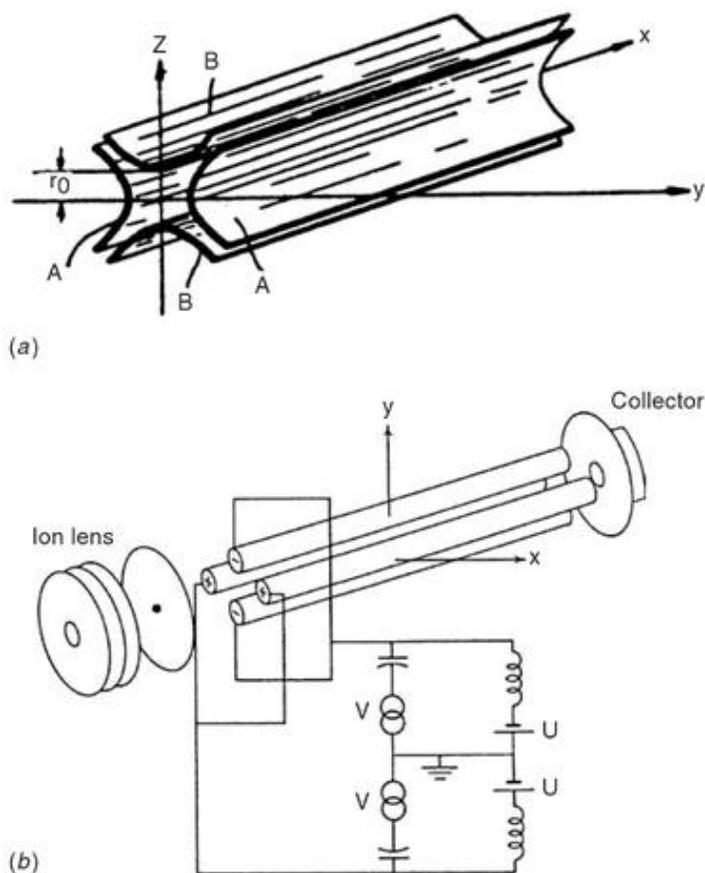


Figura 13 Cuadrupolo del espectrómetro de masas. (a) Arreglo de los cuatro electrodos A, A, B, B de una forma hiperbólica que sirve para crear un campo simétrico. (b) Arreglo esquemático de un cuadrupolo (March & Todd, 2005).

Los patrones de fragmentación muestran cómo se disocia una molécula una vez ionizada; esto no ocurre al azar, porque se deriva de su estructura, su arreglo espacial, potencial de ionización y de la energía interna que adquiere durante su colisión con un electrón. El patrón de fragmentación es único para cada estructura molecular y contienen diferencias claras detectables, incluyendo a los isómeros. Así es como un espectro de masas provee información acerca de la masa molecular, la composición elemental, los grupos funcionales en la molécula y su estructura espacial (figura 14) (Stashenko & Martínez, 2014).

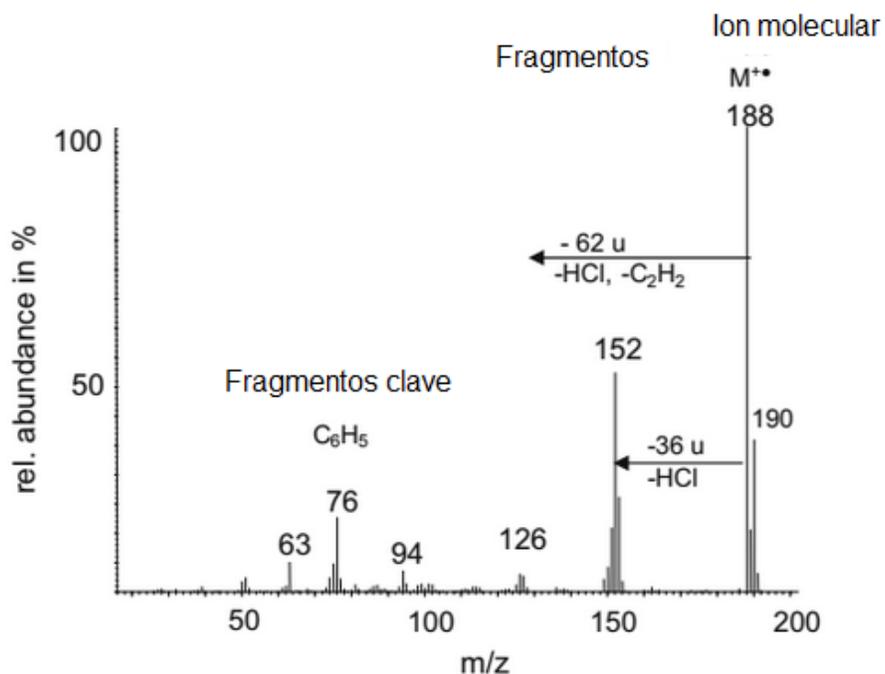


Figura 14 Información accesible de un espectro de masas. e.g. 3-clorbifenilo. El (Dettmer & Engewald, 2014).

6.10 Tratamiento de muestras

El análisis de materiales orgánicos del patrimonio por GC-MS requiere del pretratamiento de la muestra. El primer paso consiste en la extracción de compuestos de interés de la matriz compleja formada por los materiales constitutivos de los objetos de patrimonio. Esto es crucial en objetos históricos debido al carácter único de cada muestra y la poca cantidad de la fracción orgánica contenida en ellos.

Como se expuso en las secciones anteriores algunos materiales resinosos, están constituidos por moléculas diterpénicas funcionalizadas con grupos hidroxilo o carboxilo, que son muy polares. Esto hace que se requiera además de la extracción un segundo paso que consiste en la derivatización antes del análisis cromatográfico.

Las reacciones de derivatización producen compuestos no polares, volátiles y no termolábiles adecuados para la cromatografía de gases. La reducción de la polaridad debida a la derivatización lleva a mejores formas de pico en los

croatogramas, debido a la minimización de absorciones detrimentales y no específicas de la columna.

La metilación y la sililación, en particular la trimetilsililación, son las reacciones de derivatización más comunes (Colombini & Modugno, 2009). Los reactivos sililantes pueden introducir ya sea una unidad de trimetilsililo (TMS), $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, o una unidad de dimetil-(terbutil)-silil (TBS), $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$. Los reactivos TMS han sido ampliamente investigados y son conocidos por tener el espectro de derivatización más amplio. El TMS tiene el potencial de sustituir todos los protones “ácidos” de un metabolito. (Kopka, 2006)

Los agentes TMS son capaces de derivatizar grupos con un protón activo/polar (OH, NH y SH), convirtiéndolos en estéres o éteres TMS (Colombini & Modugno, 2009). Los derivados sililados de los esteroides se forman por el desplazamiento del protón activo en los grupos hidroxilo, generalmente por el grupo trimetilsililo ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}$). (Maier, 2006). La trimetil sililación con hexametildisilazano (HMDS) y trimetilclorosilano (TMCS) tiene la ventaja de que la derivatización se lleva a cabo en un solo paso en grupos hidroxilo y carboxilo.

La presencia de compuestos trimetilsililados (TMS) induce la formación de iones característicos. Para moléculas que contienen un grupo hidroxilo se presentan los fragmentos 73 m/z y 75 m/z. Si en su estructura la molécula contiene más de un grupo hidroxilo, provenientes ya sea de un alcohol o un grupo carboxilo, se presenta el ion 147 m/z (figura 15) (Lucero, 2012).

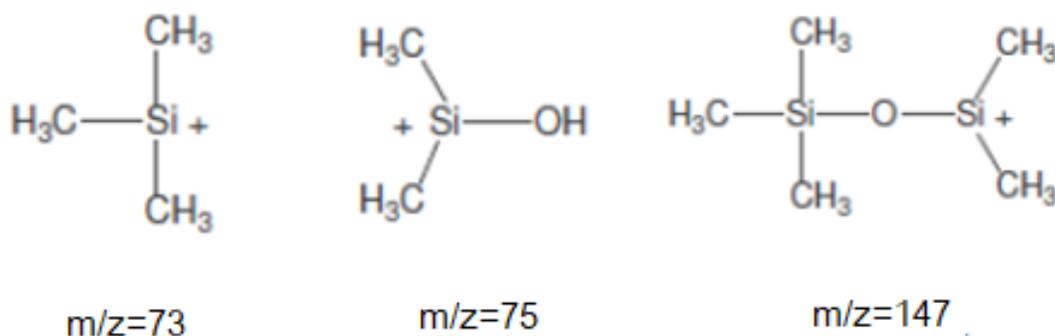


Figura 15 Fragmentos característicos de compuestos sililados.

6.11 **Análisis de componentes principales (PCA)**

La aplicación de métodos de selección de variables o compresión de datos es importante en química analítica, porque permite que las variables con poca información sean descartadas; incluir este tipo de variables resulta en la sobrestimación de la habilidad de predicción de un modelo matemático, durante la clasificación.

En el análisis de componente principal (PCA) se considera una tabla con datos que representan observaciones descritas por variables dependientes que, en general, están inter correlacionadas. El objetivo del PCA es extraer la información importante de la tabla de datos para expresar esta información como un nuevo conjunto de variables ortogonales llamadas componentes principales. También representa un patrón de similitud en las observaciones y las variables, representándolas como puntos en un plano.

El PCA permite:

- 1) Extraer la información más importante de la tabla de datos.
- 2) Comprimir el tamaño del conjunto de datos manteniendo solo la información importante.
- 3) Simplificar la información.
- 4) Analizar la estructura de las observaciones y las variables.

El PCA arroja nuevas variables llamadas componentes principales que se obtienen de combinaciones lineales de las variables principales. El primer componente tiene la mayor cantidad de varianza posible (Abdi & Williams, 2010). Es fácil ver que el primer componente es la dirección en la que los datos muestran la mayor variación (Ringenér, 2008).

El segundo componente se obtiene bajo la premisa de que tiene que ser ortogonal al primer componente y tener la inercia más grande. Es la dirección no correlacionada al primer componente

Los siguientes componentes se obtienen de la misma manera. Los valores de estas nuevas variables son conocidos como *factor scores*, y se pueden interpretar

geométricamente como proyecciones de las observaciones sobre los componentes principales (Abdi & Williams, 2010).

7 Instrumentación y software

El análisis GC-MS se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases 6890N GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) acoplado a espectrómetro de masas con detector de cuadrupolo sencillo, 5973 Network Mass Selective Detector (Agilent Technologies).

La temperatura del inyector fue de 250 °C, la línea de transferencia se mantuvo a 310 °C; en el espectrómetro de masas la temperatura de la fuente de iones de MS se fijó en 230 °C y la temperatura del cuadrupolo del espectrómetro de masas en 150 °C. El espectrómetro de masas operó en IE en modo positivo (70 eV) y el intervalo de masas se trabajó de 50 a 800 m/z

En el cromatógrafo de gases, las separaciones fueron llevadas a cabo con una columna capilar HP-5MS (5% difenil-95% dimetilpolisiloxano, 5% fenilmetil siloxano) de 30 m x 250 µm x 0.25 µm, Agilent Technologies. Las muestras fueron inyectadas (1 µL) en modo Split 1:5.

Después de una fase isotérmica de 190 °C, el horno se programó a 225 °C a 3 °C/min, después a 265 °C a 2 °C/min manteniéndose 5 minutos, y 285 °C a 2 °C/min por 6 minutos.

Se empleó un flujo de 1.2 mL/min de Helio grado cromatográfico como gas acarreador.

El tratamiento estadístico se llevó a cabo empleando los programas para análisis estadístico *Minitab 17* y *PAST 3.15*.

8 Reactivos

La piridina 99.8 %, hexametildisilazano (HMDS) $\geq 99\%$, y trimetilclorosilano (TMCS) $\geq 99\%$, fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Fueron empleados en el proceso de derivatización. El dietil éter grado GC-MS, que se usó como disolvente para la inyección, se adquirió en Merck.

Para facilitar su identificación se analizó el estándar de la molécula del ácido abiético, de Sigma Aldrich.

9 Experimentación

9.1 Muestreo de resinas de pino

La recolección de las muestras de resinas de pino se llevó a cabo por la autora del presente trabajo con la supervisión de la Dra. Paola Lucero.

Se obtuvieron unos miligramos de resina, realizando una incisión de aproximadamente 2 cm y algunos milímetros de profundidad en la corteza. Se almacenó en viales de vidrio después de su recolección para evitar su contaminación y limitar su oxidación. Los viales se almacenaron en un lugar protegido de la luz y el calor.



Figura 16 Muestreo de resinas de pino

9.1.1 Muestras certificadas botánicamente

Se obtuvieron muestras de 15 coníferas diferentes: 12 pinos, 1 oyamel y 2 cedros, las muestras certificadas botánicamente fueron obtenidas utilizando la metodología enunciada con anterioridad y se describen en la tabla 4. La certificación del origen botánico de los árboles, cuya resina fue muestreada, fue realizada por expertos del Jardín Botánico, UNAM.

Tabla 4 Muestras de pinos certificados

Nombre común	Nombre científico	Fotografía
Pino, ocote Pino amarillo	<i>Pinus rudis</i>	
Pino blanco	<i>Pinus pseudostrobus</i>	
Pino llorón, ocote	<i>Pinus patula</i>	
Ocote	<i>Pinus montezumae</i>	
Pino lacio	<i>Pinus devoniana</i>	
Piñón real	<i>Pinus maximartinezii</i>	
Pino avellano	<i>Pinus douglasiana</i>	

Ocote chino	<i>Pinus oocarpa</i>	
Pino triste	<i>Pinus lumholtzii</i>	
	<i>Pinus edulis</i>	
Ocote chino	<i>Pinus leiophylla</i>	
Piñonero	<i>Pinus cembroides</i>	
Oyamel	<i>Abies religiosa</i>	
Cedro limón	<i>Cupressus macrocarpa</i>	
Cedro enebro	<i>Juniperus flaccida</i>	

9.1.2 Muestras de origen botánico desconocido

Se muestrearon 22 árboles presumiblemente pinos para su estudio e identificación de acuerdo a su perfil molecular (Tabla 5).

Tabla 5 Muestras de pino de origen botánico desconocido

Nombre	Fotografía	Nombre	Fotografía
Pino 1		Pino 12	
Pino 2		Pino 13	
Pino 3		Pino 14	
Pino 4		Pino 15	
Pino 5		Pino 16	
Pino 6		Pino 17	
Pino 7		Pino 18	

Pino 8		Pino 19	
Pino 9		Pino 20	
Pino 10		Pino 21	
Pino 11		Pino 22	

9.1.3 Muestras comerciales

Como parte del estudio, se analizaron también muestras de resinas comerciales provenientes de distintos estados de la república mexicana (tabla 6). En total, se adquirieron 72 muestras de resina. Su estudio por cromatografía de gases reveló en 21 de ellas marcadores moleculares ditérmicos, dichas resinas se estudiaron e identificaron comparando sus perfiles moleculares con el de las muestras certificadas, una breve descripción de los copales comerciales se presenta en la Tabla 6.



Figura 17 Mapa de los estados donde fue colectada la resina comercial.

Las muestras de resina de pino fueron colectadas en diferentes estados de la República Mexicana: Colima, Campeche, Yucatán, Oaxaca, Chiapas, Estado de México y la Ciudad de México (figura 17).

Tabla 6 Muestras de copales comerciales que contuvieron moléculas diterpénicas

Nombre	Fuente	Año de colecta	Descripción	Fotografía
COLL2	Mercado en Colima, Colima	2008	Mezcla de resina rojiza y amarilla en el momento de la compra, se aprecia amarilla con una capa blanca en 2017.	
CAML1	Mercado Pedro Sainz de Baranda, Campeche	2016	Resina naranja con una capa de polvo blanco.	
MERA1	Mercado Lucas Gálvez, Mérida, Yucatán	2016	Mezcla de resina rojiza, amarilla y negra con una capa de polvo blanco.	
MERA2	Mercado Lucas de Gálvez, Mérida, Yucatán	2016	Resina translúcida color amarillo brillante.	
MILA1	Mercado Benito Juárez, Milpa Alta, Ciudad de México	2016	Resina color naranja con polvo amarillo.	
MILA2	Mercado Benito Juárez, Milpa Alta, Ciudad de México	2016	Resina color amarillo brillante cubierta con una capa de polvo blanco.	
MILA5	Mercado Benito Juárez, Milpa Alta, Ciudad de México	2016	Resina color amarillo claro cubierta con polvo blanco.	
MIXA1	Mercado anual, Mixquic, Ciudad de México	2015	Mezcla de resina blanquecina y amarillo brillante.	
OAXC3	Mercado Permanente, Oaxaca, Oaxaca.	2008	Polvo amarillo.	
TOLA1	Toluca, Estado de México	2016	Resina amarillenta y café.	

TUXA1	Mercado Díaz Ordaz, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	2016	Resina verduzca traslucida.	
TUXA2	Mercado Díaz Ordaz, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	2016	Resina amarilla.	
TUXA3	Mercado Díaz Ordaz, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	2016	Mezcla de resina verde, amarilla y naranja con polvo verde y amarillo.	
TUXA4	Mercado Díaz Ordaz, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	2016	Resina amarilla cubierta de polvo blanco.	
TUXA5	Mercado Díaz Ordaz, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	2016	Resina amarilla cubierta de polvo blanco.	
MERA3	Mercado Lucas Gálvez, Mérida, Yucatán	2016	Resina amarilla cubierta de polvo blanco.	
MERA4	Mercado Lucas Gálvez, Mérida, Yucatán	2016	Resina amarilla cubierta de polvo blanco.	
MERA 5	Mercado Lucas Gálvez, Mérida, Yucatán	2016	Resina amarilla cubierta de polvo blanco.	
SONP1	Mercado de Sonora, Ciudad de México	2017	Resina semejante a una piedra, su interior es suave y colores amarillo y rosa.	
SONA1	Mercado de Sonora, Ciudad de México	2017	Resina amarilla cubierta de polvo blanco.	
SONA2	Mercado de Sonora, Ciudad de México	2017	Resina amarilla cubierta de polvo blanco.	

9.1.4 Muestras arqueológicas

Se estudiaron dos piezas provenientes de dos de las principales culturas Mesoamericanas:

La primera es un incensario antropomorfo de origen Maya cuya descripción y características se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Muestras arqueológicas analizadas. Incensario de Origen Maya - Champotón, Campeche.



Incensario antropomorfo

Origen	Maya- Champotón, Campeche
Descripción	Incensario antropomorfo de 25 cm de alto, personaje ataviado con piel de jaguar, sandalias y joyería azul y roja.
Fecha del muestreo	11 noviembre 2016
Método de muestreo	Raspado con navaja de acero inoxidable del interior y exterior de la pieza arqueológica.
Número de muestras	2
Masa de la muestra	Muestra del interior: 3 mg Raspado exterior: 3 mg

La segunda muestra proviene de la cultura Mexica o Azteca y consiste en un material de aspecto resinoso tomado de un hueso perteneciente a un infante. El infante fue probablemente sacrificado en honor a Tláloc pues era parte de una ofrenda a este Dios localizada en Huexotla, Texcoco (tabla 8).

La restauradora Luisa Mainou percibió un olor fragante parecido al del copal al agregar agua a los huesos, muestreo la resina aparente y la colocó en un porta objetos, mismo que fue entregado para su análisis.

Tabla 8 Muestras arqueológicas analizadas. Ofrenda a Tláloc, Huexotla, Texcoco. Estado de México.



Ofrenda a Tláloc (Resina)

Origen	Ofrenda a Tláloc - Huexotla, Texcoco. Estado de México
Descripción	Material de aspecto resinoso extraído de un hueso infantil
Fecha de la muestra	Junio del 2017
Método de muestreo	Raspado
Número de muestras	1
Masa de la muestra	Resina: 2.6 mg

9.2 Derivatización de las resinas

Para este procedimiento se emplearon muestras de resina de 1 mg. La derivatización consistió en la trimetilsililación de ácidos carboxílicos y grupos hidroxilos. El primer paso de la derivatización consiste en la solubilización de la resina en 0.5 mL de piridina, después se trimetilsililó con 0.45 mL de HMDS y 0.3 mL de TMCS. La reacción se llevó a cabo a 30°C por 60 minutos. Una vez concluido el proceso se secó el producto. El residuo se disolvió en dietil éter y se filtró con un filtro de membrana de 0.45 µm de nylon. Finalmente, las muestras fueron inyectadas al cromatógrafo de gases.

Para el análisis de las muestras arqueológicas fue necesaria una etapa de extracción asistida con ultrasonido y un solvente adecuado antes de la etapa de derivatización.

9.3 Análisis por Cromatografía de gases-espectrometría de masas

La caracterización química de las resinas, ambas frescas y arqueológicas, se centró en el estudio de sus fracciones diterpénicas. Esta fracción se escogió debido a la estabilidad en el tiempo de los diterpenos en contraste con el resto de los componentes que integran las resinas. Como se mencionó en las secciones precedentes estas moléculas pueden ser usadas como marcadores moleculares, y pueden ser detectadas en materiales arqueológicos y artísticos.

10 Resultados y análisis

En total fueron identificadas 17 moléculas en los diferentes perfiles moleculares correspondientes a las muestras de resinas certificadas y de origen botánico desconocido, así como en las muestras comerciales.

Para su identificación en este trabajo a los ácidos diterpénicos se les identificó con un número romano, a los aldehídos se les asignó una letra latina y para aquellos compuestos cuya estructura molecular no fue posible determinar, una letra griega.

Tabla 9 Tiempo de retención de las moléculas estudiadas.

Indicador	Molécula	Tiempo de retención (min)
a	Sandacopimaral	8.949
b	Isopimaral	9.936
c	Palustrial	10.176
d	Levopimaral	10.232
e	Dehidroabietal	10.796
f	Abietal	11.557
g	Pimaral	9.924
I	Ácido Pimárico OTMS	11.529
II	Ácido Isopimárico OTMS	12.651
III	Ácido Palústrico OTMS	13.111
IV	Ácido Dehidroabiético OTMS	13.753
V	Ácido Abiético OTMS	14.394
VI	Ácido Sandacopimárico OTMS	12.371
α	-	12.522
β	-	18.455
γ	-	14.706
δ	Metilisopimarato	10.477

Los espectros de masas de cada molécula se almacenaron en un banco de datos especializado, para el estudio de diterpenos.

Para su identificación se llevó a cabo la comparación entre los espectros de masas de ácidos diterpénicos presentes en las muestras problema contra los espectros de estándares de las mismas moléculas de una base de datos que ya se encontraba presente en el laboratorio.

La identificación de los aldehídos y del éster encontrado se llevó a cabo empleando la biblioteca NIST Standard Reference Database 1A NIST/EPA/NIH versión 14.

Tabla 10 Fragmentación de los espectros de masas de las moléculas encontradas.

Indicador	Molécula	Fragmentación (% m/z)
a	Sandacopimaral	79, 91 , 107, 123, 187, 215, 247, 201, <u>286</u>
b	Isopimaral	91, 119, 145, 187, 201, 257 , 270, <u>286</u>
c	Palustrial	91, 117, 157 , 171, 187, 254, 271, <u>286</u>
d	Levopimaral	91 , 133, 146, 187, 255, <u>286</u>
e	Dehidroabietal	91, 105, 117, 185, 209, 255, 241, 269 , <u>284</u>
f	Abietal	91, 105, 131, 173, 187, 239, 253 , <u>286</u>
g	Pimaral	91, 105, 119, 187, 257 , 270, <u>286</u>
I	Ácido Pimárico OTMS	91, 105, 121 , 185, 241, 257, 359, <u>374</u>
II	Ácido Isopimárico OTMS	129, 143, 213, 241 , 256, 359, <u>374</u>
III	Ácido Palústrico OTMS	185, 213, 239, 241 , 359, <u>374</u>
IV	Ácido Dehidroabiético OTMS	197, 211, 183, 239 , 254, 257, <u>372</u>
V	Ácido Abiético OTMS	185, 213, 241, 256 , 359, <u>374</u>
VI	Ácido Sandacopimárico OTMS	91, 121 , 185, 213, 241, 257, 359, <u>374</u>
α	-	91, 121, 159 , 187, 241, 213, 256, 359, <u>374</u>
β	-	91, 121, 135 , 148, 213, 239, 256, 359, <u>374</u>
γ	-	91, 121, 143 , 159, 213, 239, 256, 293, <u>374</u>
δ	Metilisopimarato	91, 143, 213, 143, 173, 241 , 256, 359, <u>374</u>

Por su parte, α es presumiblemente un isómero conformacional del ácido pimárico ya que en su espectro de masas se encuentran señales que corresponden al mecanismo de fragmentación de este ácido, así como señales en 159, 187, 213 y 239 m/z que difieren del ácido pimárico, este hecho apunta a pensar que corresponde al isómero con el carbono 18 en posición α (figura 18) (Azemard, et al., 2016).

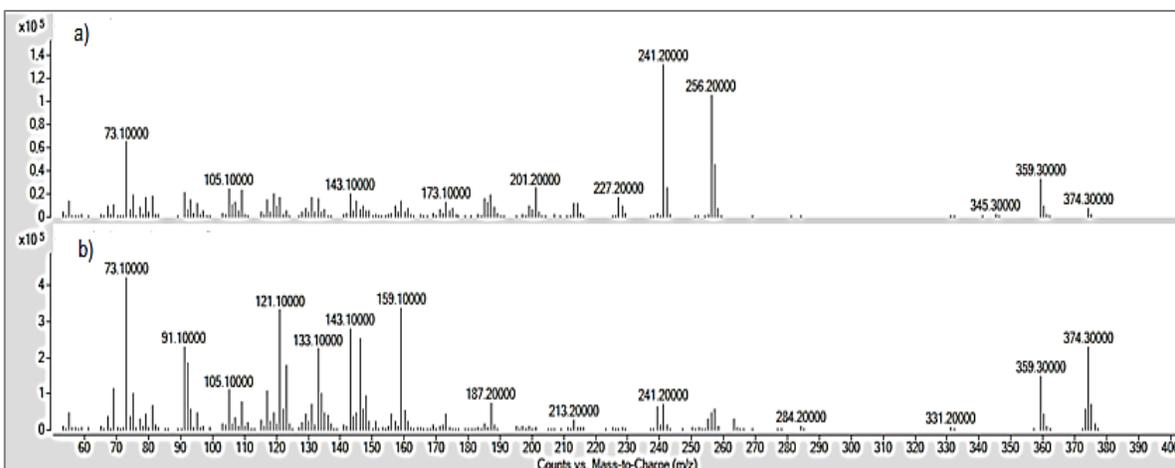


Figura 18 Espectros de masas de (a) ácido pimárico y (b) isómero conformacional del ácido pimárico, α .

10.1 Resultados del estudio de muestras certificadas botánicamente

Se caracterizó la composición molecular, distinguiéndose químicamente cada una de las resinas certificadas e identificando la mayor cantidad de moléculas posible. La composición molecular de las muestras certificadas se resume en la tabla 11.

Tabla 11 Composición molecular de resinas de Pinaceae certificadas botánicamente analizadas.

Especie/Molécula	I	II	III	IV	V	VI	a	b	c	d	e	f	g	α	β	γ	δ
<i>Abies religiosa</i>	x	x	x	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Juniperus fláccida</i>	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pinus cembroides</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓
<i>Pinus devoniana</i>	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pinus douglasiana</i>	x	✓	x	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pinus edulis</i>	x	✓	x	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pinus leiophylla</i>	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
<i>Pinus lumholtzii</i>	x	x	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pinus maximartinezii</i>	✓	✓	x	x	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓
<i>Pinus montezumae</i>	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
<i>Pinus oocarpa</i>	x	✓	✓	✓	x	x	✓	x	x	✓	✓	x	x	x	x	x	x
<i>Pinus patula</i>	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	x	✓	x	x	x	✓	x	x	x
<i>Pinus pseudoestrobis</i>	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
<i>Pinus rudis</i>	x	✓	x	x	x	x	x	✓	x	✓	✓	✓	x	x	x	x	x

Con la información obtenida acerca del perfil molecular se construyó una matriz con el área normalizada de cada pico identificado en el cromatograma. Estos datos permitieron realizar un análisis de componente principal, empleando una matriz de correlación que permitió la mejor separación de los puntos que representan las muestras. Los resultados gráficos se presentan en la figura 16.

Cada uno de los puntos mostrados corresponde a una muestra de resina de diferente especie. Dichos puntos se distribuyeron en el plano de acuerdo a la mayor similitud o diferencia en el perfil molecular que representan.

En este caso la reducción de dimensiones es posible ya que para llegar a un 90.3% de varianza explicada son necesarios la mitad de los componentes (6) para llegar a un 99.2% se necesitan 8 componentes. Tabla 12.

Tabla 12 Resumen del análisis de componentes principales de resinas certificadas.

CP	Eigenvalor	% varianza	% varianza acumulada
1	3.82521	31.877	31.877
2	1.7572	14.643	46.520
3	1.57891	13.158	59.678
4	1.38031	11.503	71.181
5	1.23608	10.301	81.482
6	1.05524	8.7937	90.276
7	0.591526	4.9294	95.205
8	0.47993	3.9994	99.205
9	0.0955997	0.79666	99.999
10	7.50E-12	6.25E-11	99.999
11	1.50E-32	1.25E-31	99.999
12	1.58E-33	1.32E-32	100.000

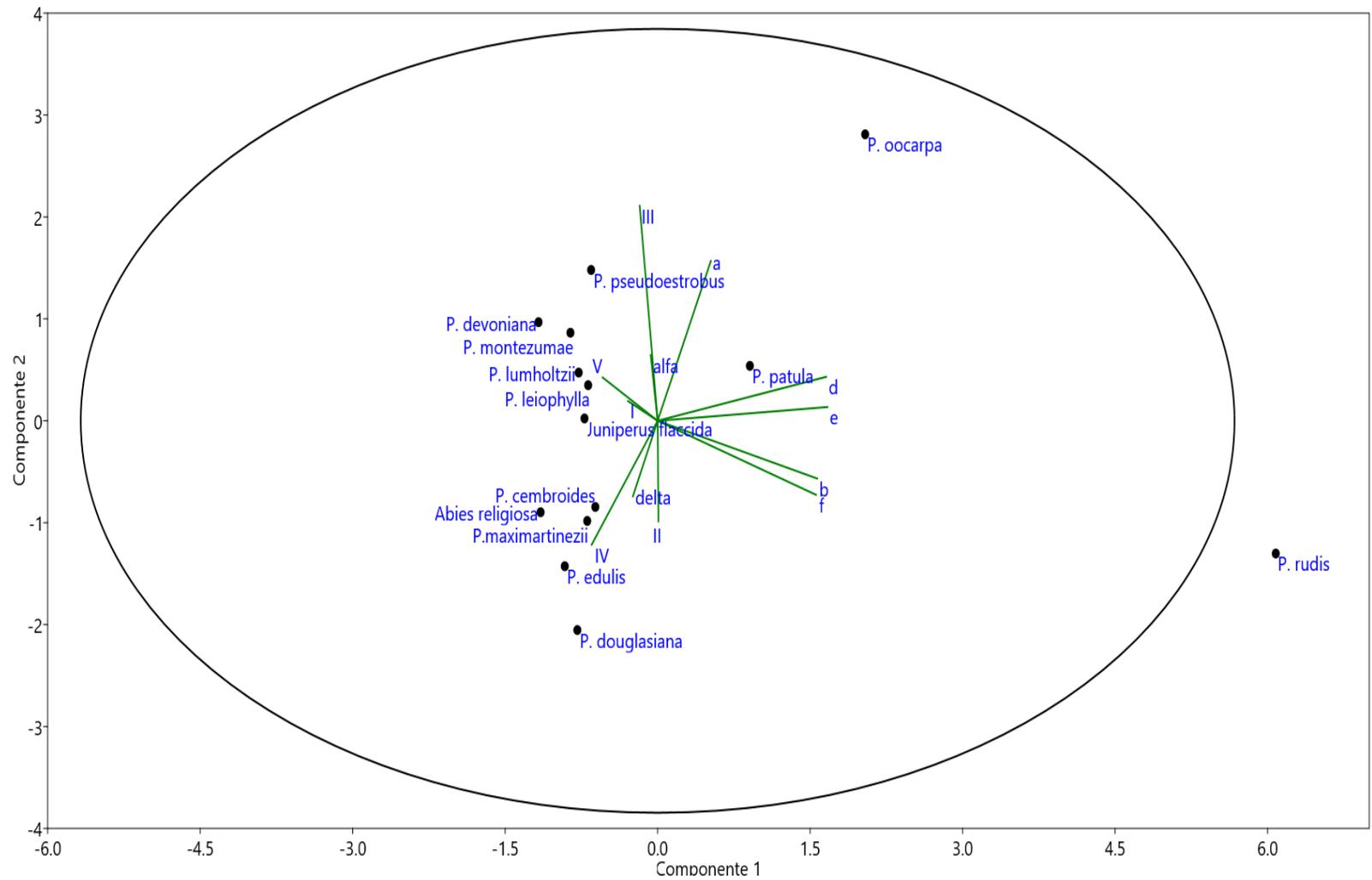


Figura 19 Distribución en el hiperespacio del análisis de componentes principales y loading plot para resinas certificadas.

En cuanto a la interpretación de los componentes, se observa que el primer componente tiene una alta correlación positiva con las variables b, d, e y f que representan los compuestos: isopimaral levopimaral, abietal y pimaral, respectivamente. Esto es especialmente evidente cuando observamos los puntos que representan a *Pinus rudis*, *Pinus patula* y *Pinus oocarpa*, las tres resinas muestran un perfil molecular abundante en aldehídos, lo que las separa de las demás resinas que no los contienen, en especial a la muestra de *Pinus rudis* que se aprecia más lejana, sin embargo las muestras *Pinus oocarpa* y *Pinus patula* contienen una mayor cantidad de ácidos diterpénicos y menor de aldehídos por lo que se encuentran más cercanas a las demás muestras que no presentan ácidos diterpénicos que se encuentran del lado izquierdo de la gráfica. (Figura19) (Tabla 13).

El segundo componente tiene una correlación positiva alta con el componente III que corresponde al ácido palústrico, y negativa con el componente IV, que es el ácido dehidroabiético, así la presencia o ausencia de estos ácidos diterpénicos posibilita una mejor separación de los puntos en el hiperespacio y por lo tanto una identificación más fácil del origen botánico de las muestras.

Todas las especies estudiadas muestran un perfil molecular característico y diferente a las demás muestras, esta característica permitirá identificar las resinas de las que se desconozca su origen botánico.

Tabla 13. Correlación componentes-variables del análisis de componentes principales de resinas certificadas.

Molécula	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	PC 11	PC 12
I	-0.167	0.075	-0.434	0.517	0.148	-0.682	0.113	0.099	-0.015	1.139E-06	-7.999E-28	-1.180E-28
II	0.005	-0.384	0.633	0.041	-0.442	-0.060	0.314	0.390	-0.016	3.095E-07	-2.173E-28	-3.205E-29
III	-0.101	0.821	0.279	-0.006	0.060	0.207	-0.333	0.283	-0.015	1.110E-06	-7.791E-28	-1.149E-28
IV	-0.373	-0.473	0.507	-0.434	0.288	-0.187	-0.121	-0.243	-0.001	1.472E-06	-1.034E-27	-1.524E-28
V	-0.311	0.165	-0.033	-0.009	0.686	0.406	0.486	0.055	-0.019	3.073E-07	-2.157E-28	-3.182E-29
a	0.300	0.610	-0.024	-0.542	-0.284	-0.254	0.281	-0.137	0.024	2.067E-07	2.900E-17	1.710E-17
b	0.901	-0.220	0.080	0.269	0.137	0.129	-0.076	-0.030	-0.138	2.371E-07	-2.382E-17	2.563E-17
d	0.952	0.168	0.079	-0.040	-0.065	-0.023	0.095	-0.133	-0.160	3.154E-07	2.248E-17	-2.418E-17
e	0.960	0.052	-0.049	-0.195	0.082	-0.056	0.068	0.042	0.141	3.536E-07	-8.283E-17	-6.663E-18
f	0.895	-0.283	-0.041	0.087	0.249	0.080	-0.081	0.122	0.142	2.761E-07	7.916E-17	1.340E-18
α	-0.039	0.251	0.438	0.706	-0.253	0.197	0.113	-0.348	0.094	4.386E-07	-3.080E-28	-4.542E-29
δ	-0.140	-0.288	-0.667	-0.111	-0.474	0.462	0.036	-0.017	-0.004	1.422E-06	-9.980E-28	-1.472E-28

10.2 Resultados de muestras de resinas de origen desconocido.

Una vez analizadas las resinas certificadas, se estudiaron 22 resinas, también colectadas por nuestro equipo *in situ* en cada árbol, cuyo origen botánico se desconocía. La composición molecular de estas resinas se resume en la tabla 14.

Para sugerir un origen botánico de estas muestras, su descripción se agregó individualmente a la matriz de muestras de origen botánico conocido, llevando a cabo un análisis de componentes principales (Tabla 14).

Tabla 14 Composición molecular de resinas de origen botánico desconocido.

Muestra/Molécula	I	II	III	IV	V	VI	a	b	c	d	e	f	g	α	β	γ	δ
Pino 1	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
Pino 2	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pino 3	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 4	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 5	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
Pino 6	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
Pino 7	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 8	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x
Pino 9	x	x	x	x	✓	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x	x
Pino 10	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
Pino 11	x	x	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pino 12	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
Pino 13	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 14	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
Pino 15	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 16	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 17	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
Pino 18	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 19	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 20	x	x	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
Pino 21	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
Pino 22	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x

Así mismo se realizaron gráficas de los primeros dos componentes con cada una de las muestras (figura 20).

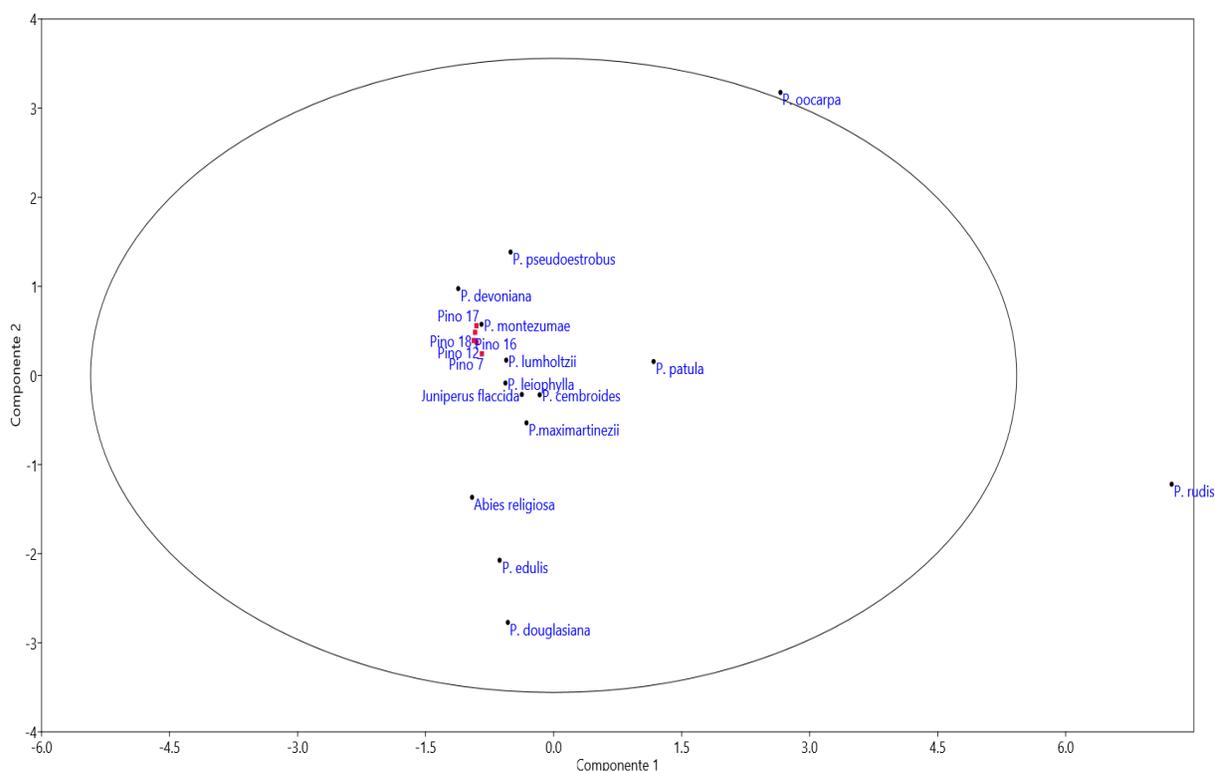


Figura 20 Distribución en el hiperespacio de muestras de resinas identificadas como *Pinus montezumae* por medio del análisis de componentes principales.

El origen botánico de las muestras de pino 7, 12, 16, 17 y 18 se puede establecer como *Pinus montezumae*, lo que coincide con el hecho de que esta especie de pino ha sido ampliamente utilizada para la extracción de resina desde la época prehispánica.

A continuación, se muestran los cromatogramas (figura 21) del perfil molecular de aquellas muestras de origen botánico desconocido que coinciden con el perfil de *Pinus montezumae*.

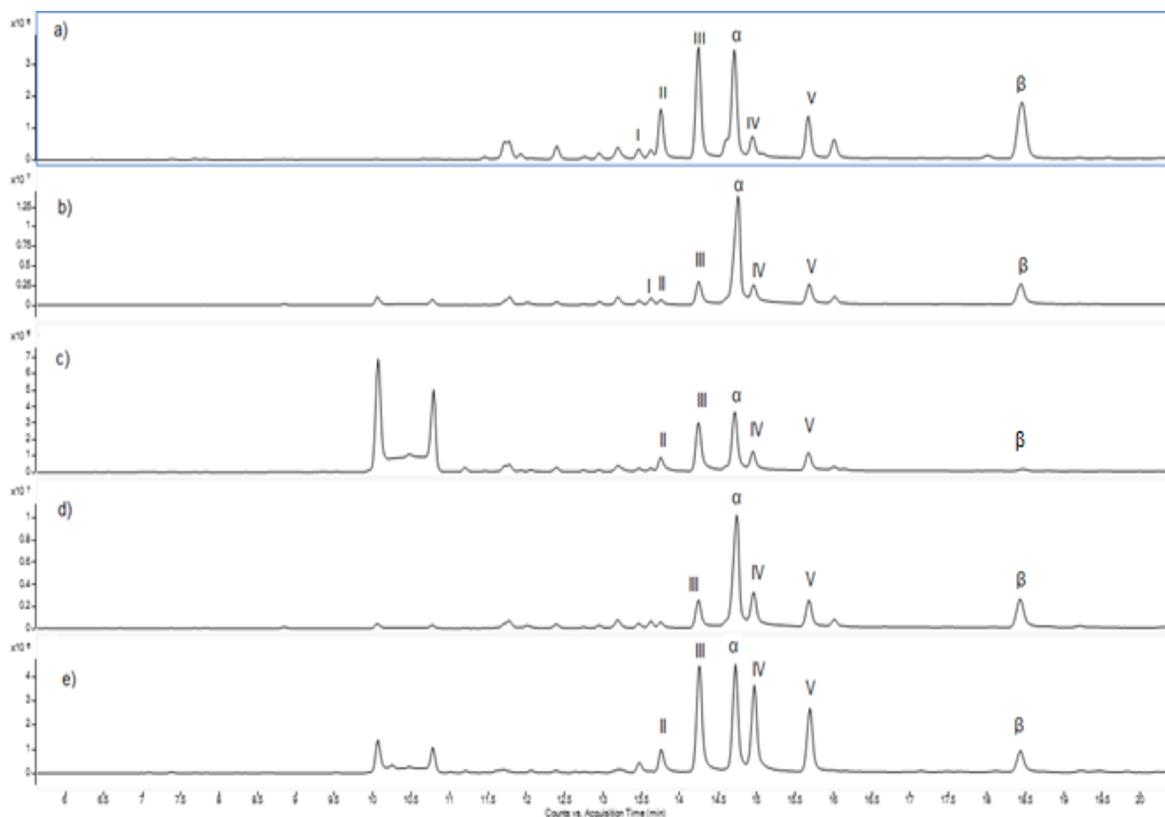


Figura 21 Muestras cuya composición sugiere como origen *Pinus Montezumae* (a) pino 12, (b) pino 16, (c) pino 17, (d) pino 18, (e) pino 2.

En los árboles con este perfil molecular el (III) ácido palústrico, (V) ácido abiético y el isómero conformacional del ácido pimárico (α) son los componentes más importantes por su mayor presencia en las muestras, mientras que el resto de los diterpenos encontrados son de abundancia variable.

La composición a nivel molecular, rica en abietanos le proporciona a estas resinas la capacidad de volverse relativamente sólida con una superficie dura (Langenheim, 2003).

También se trazó el origen de algunas muestras a algunas especies de pino que no presentan esta característica, tal es el caso de las muestras 19 y 20 (figuras 22 y 23), que se identificaron como *Pinus pseudoestrobis* y *Pinus lumholtzii* respectivamente.

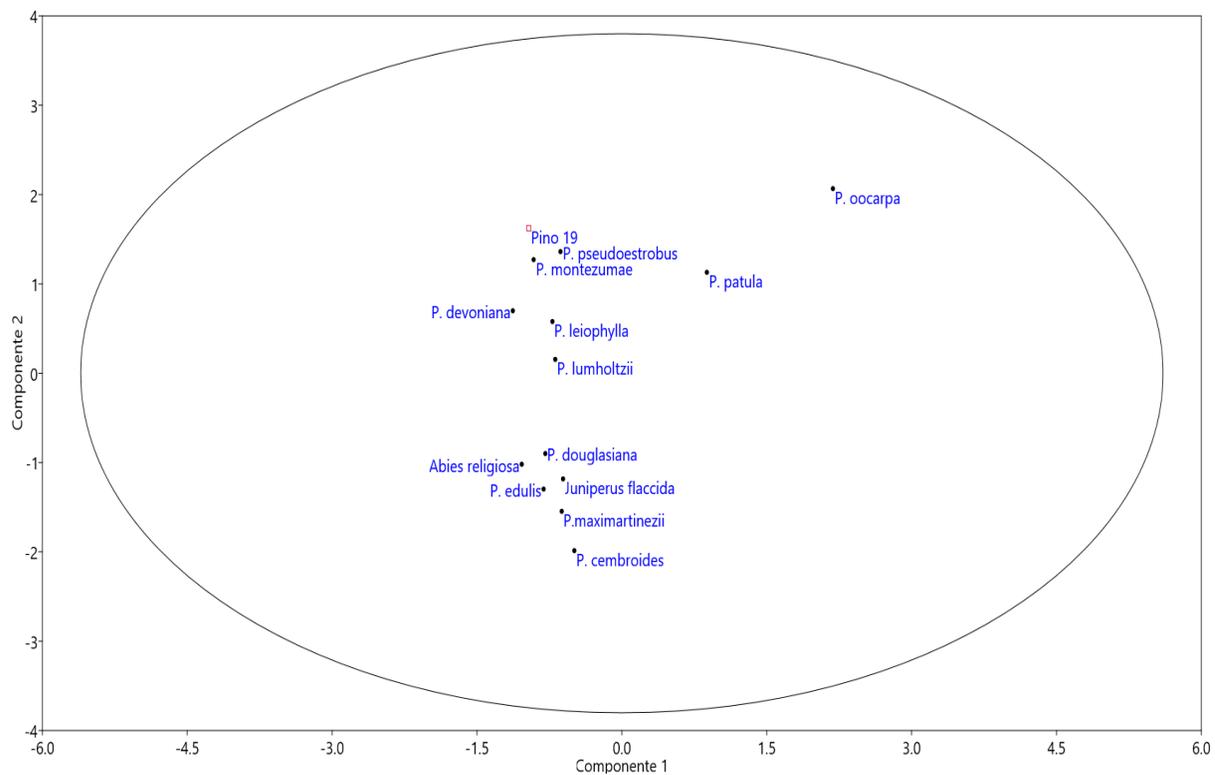


Figura 22 Distribución en el hiperespacio de la muestra 19 y muestras certificadas del análisis de componentes principales.

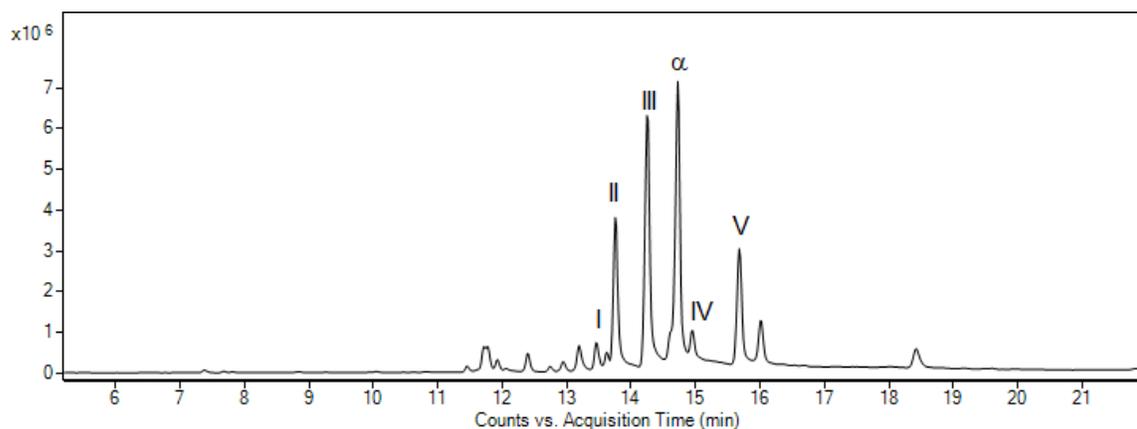


Figura 23 Cromatograma de la muestra pino 19.

En las muestras de *Pinus pseudoestrobis*, los diterpenos de mayor importancia para la identificación de esta especie son: el abietano ácido palústrico (III) y el pimarano ácido isopimárico (II). (Figura 24 y 25).

La presencia de estos compuestos en el perfil encontrado es determinante para su identificación, más allá de la presencia de los demás marcadores.

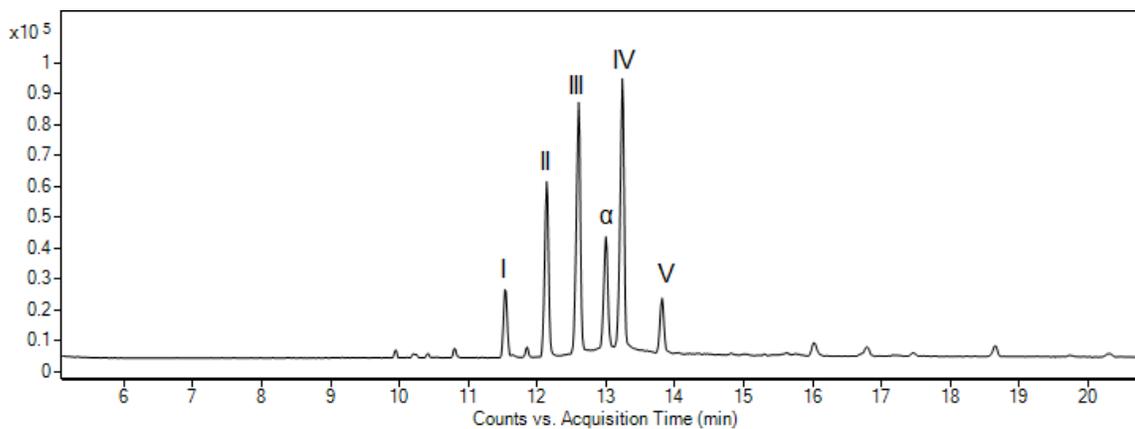


Figura 24 Cromatograma de *Pinus pseudoestrobis*

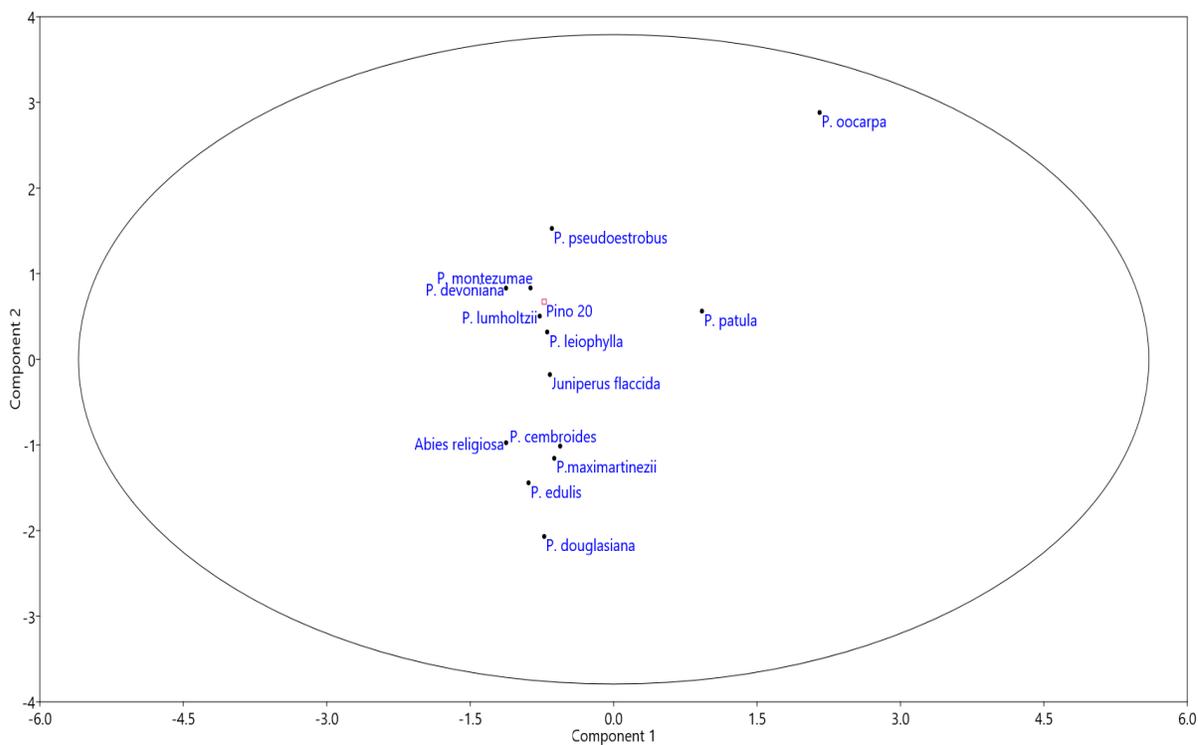


Figura 25 Distribución en el hiperespacio de la muestra 20 y de las muestras certificadas en el análisis de componentes principales.

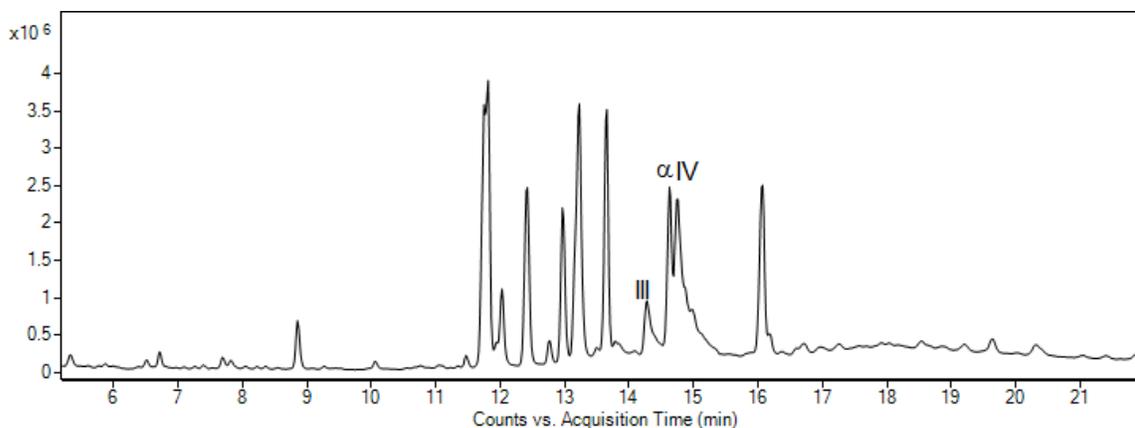


Figura 26 Cromatograma de la muestra de pino 20, origen botánico *P. lumholtzii*

La muestra 20 cuya composición fue correlacionada con *Pinus lumholtzii* se caracterizó por la presencia de dos diterpenos con esqueleto abietano únicamente; el ácido palústrico (III) y el dehidroabiético (IV), a diferencia de otras especies de pino, no se encontraron otros marcadores en su composición molecular (figura 26).

Para la muestra 22 se sugirió un origen en una especie de *Pinaceae* con género diferente, *Abies religiosa*. (Figura 27).

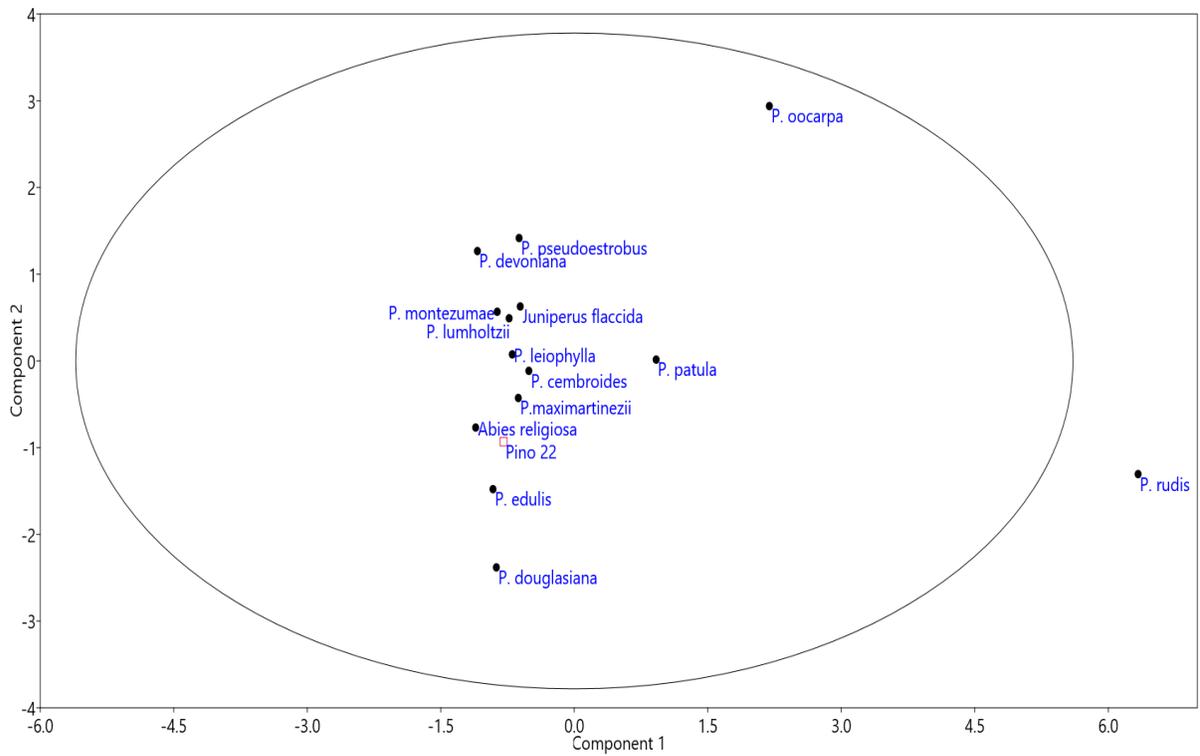


Figura 27 Distribución en el hiperespacio de la muestra identificada como *Abies religiosa* por medio del análisis de componentes principales.

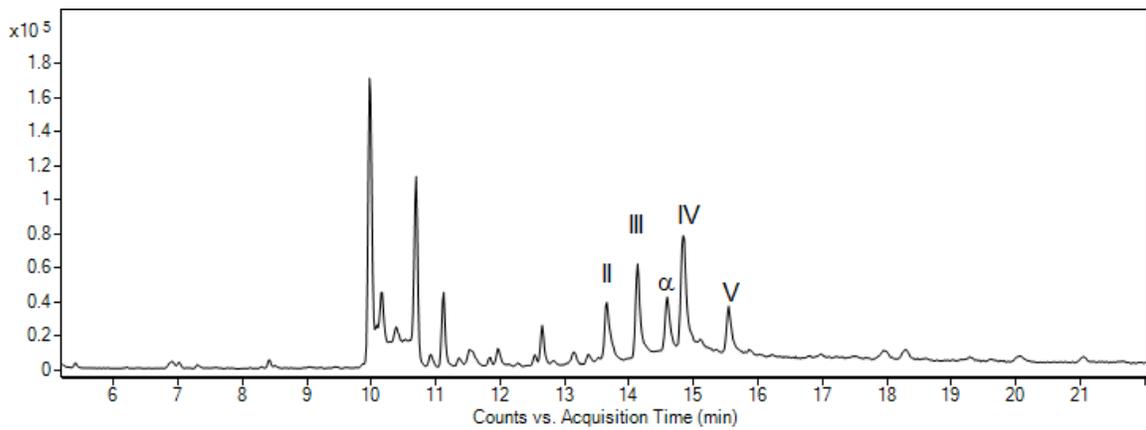


Figura 28 Cromatograma de la muestra 22.

Las muestras de resina de origen desconocido cuyo perfil molecular es distinto al perfil de las resinas de origen certificado de la base de datos, se muestran en la figura 26. Para ellas solo fue posible descartar su origen botánico.

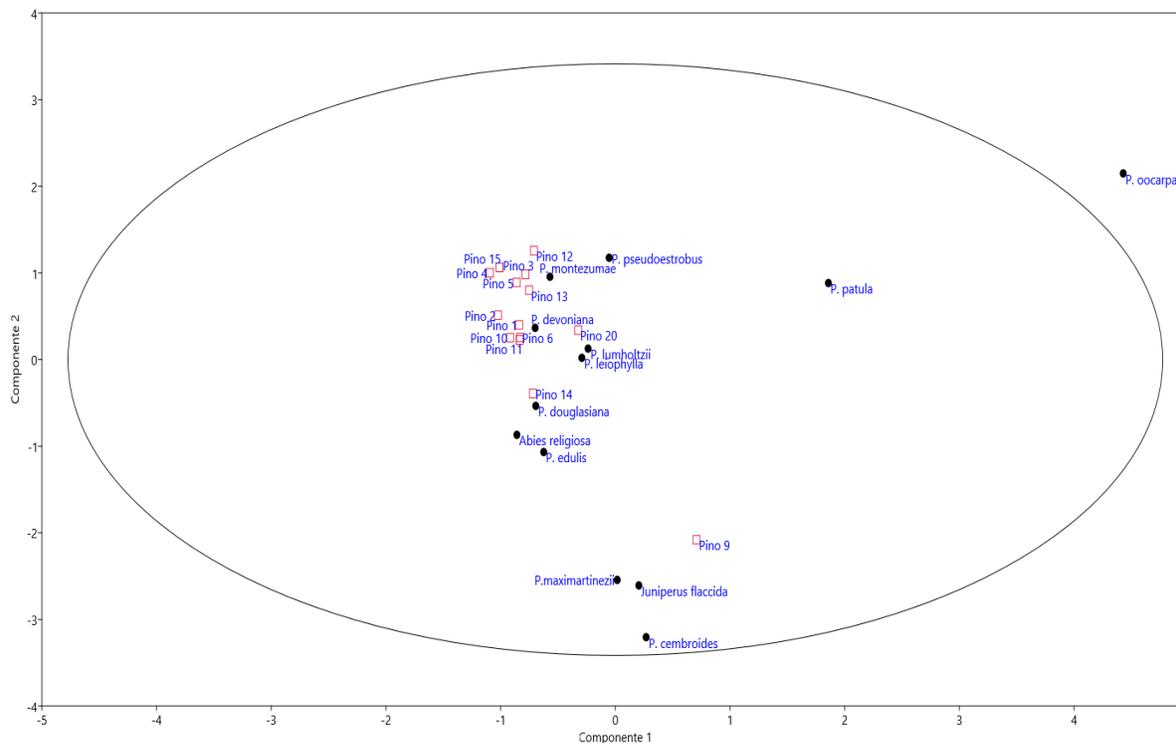


Figura 29 Distribución en el hiperespacio de muestras cuyo origen botánico solo fue posible descartar. Análisis de componentes principales.

10.3 Resultados del estudio de muestras comerciales

De las 72 muestras de copal adquiridas en diversos mercados y establecimientos del país, 21 exhibieron marcadores diterpénicos en su perfil molecular. En la mayoría de estos casos la resina fue adquirida como liquidámbar (*Liquidambar*), en otros casos fue adquirida como copal amarillo, “de segunda” e incluso como “copal sintético”.

El análisis cromatográfico confirmó sin lugar a dudas el origen de estas resinas como resinas de pino de diferentes especies y permitió descartar orígenes tales como *Bursera* y de *Liquidambar* o *styrax* (*Styraceae*) de donde se extraen el liquidámbar y el estoraque respectivamente.

La tabla 15 se resume la composición de cada una de las resinas de pino estudiadas.

Tabla 15 Especies identificadas en las muestras comerciales

Especie	Nombre de la muestra
<i>Abies religiosa</i>	ColL2
<i>Juniperus flaccida</i>	TuxA1, TuxA3
<i>Pinus douglasiana</i>	MerA1, MilB2
<i>Pinus maximartinezii</i>	MilA1, OaxC3
<i>Pinus edulis</i>	TuxA2
<i>Pinus devoniana</i>	SonA1
<i>Pinus montezumae</i>	SonP1
<i>Pinus pseudoestrobis</i>	MilA2

De la misma manera que con las muestras de resina de pino colectadas *in situ*, se elaboraron matrices para realizar el análisis de componentes principales empleando el área normalizada de cada pico identificado en los cromatogramas de las muestras de pino certificadas y cada una de las muestras comerciales estudiadas.

Con este procedimiento se pudo sugerir un origen botánico para 11 de las muestras comerciales, estas resultaron pertenecer a 8 especies distintas. (Tabla 16).

Tabla 16 Moléculas encontradas en muestras comerciales de resina de pino. Asignación de Compuestos: (I) Ac. Pimárico, (II) Ac. Isopimárico, (III) Ác. Palústrico, (IV) Ác. Dehidroabiético, (V) Ác. Abiético, (VI) Ác. Sandacopmárico, (a) Sandacopimaral, (b) Isopimaral, (c) Palustrial, (d) Levopimaral, (e) Dehidroabietal, (f) Abietal, (g) Pimaral; (α), (β) y (γ) son compuestos diterpénicos no identificados.

Muestra/Molécula	I	II	III	IV	V	VI	a	b	c	d	e	f	g	α	β	γ	δ
CamL1	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x
Coll2	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
MerA1	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MerA2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MerA3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MerA4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x
MerA5	x	✓	✓	✓	✓	x	x	✓	✓	x	✓	x	x	x	x	x	x
MilA1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MilA2	x	x	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MilB2	✓	✓	✓	✓	x	✓	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
MixA1	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x
OaxC3	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
SonA1	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
SonA2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	x	x	x	✓	x	x
SonP1	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
TolA1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
TuxA1	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TuxA2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
TuxA3	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TuxA4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	x	✓	✓	x	x	x
TuxA5	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	x	✓	x	x	x	x

La correlación entre la especie y el perfil molecular de las muestras fue establecida utilizando el PCA, para ello se graficaron los resultados de los análisis de componente principal de cada una de ellas.

En las muestras identificadas como *Abies religiosa*, la presencia de los ácidos abiético (V) y dehidroabiético (IV), la intensidad de la señal y su proporción en la composición molecular fue de una gran importancia para sugerir un origen botánico. Otras señales pertenecientes a los ácidos pimárico (I), isopimárico (II) y palústrico (III), también están presentes, sin embargo, en mucha menor cantidad en relación a estos abietanos (figura 31), tal es el caso de la muestra ColL2 proveniente de Colima (figura 30).

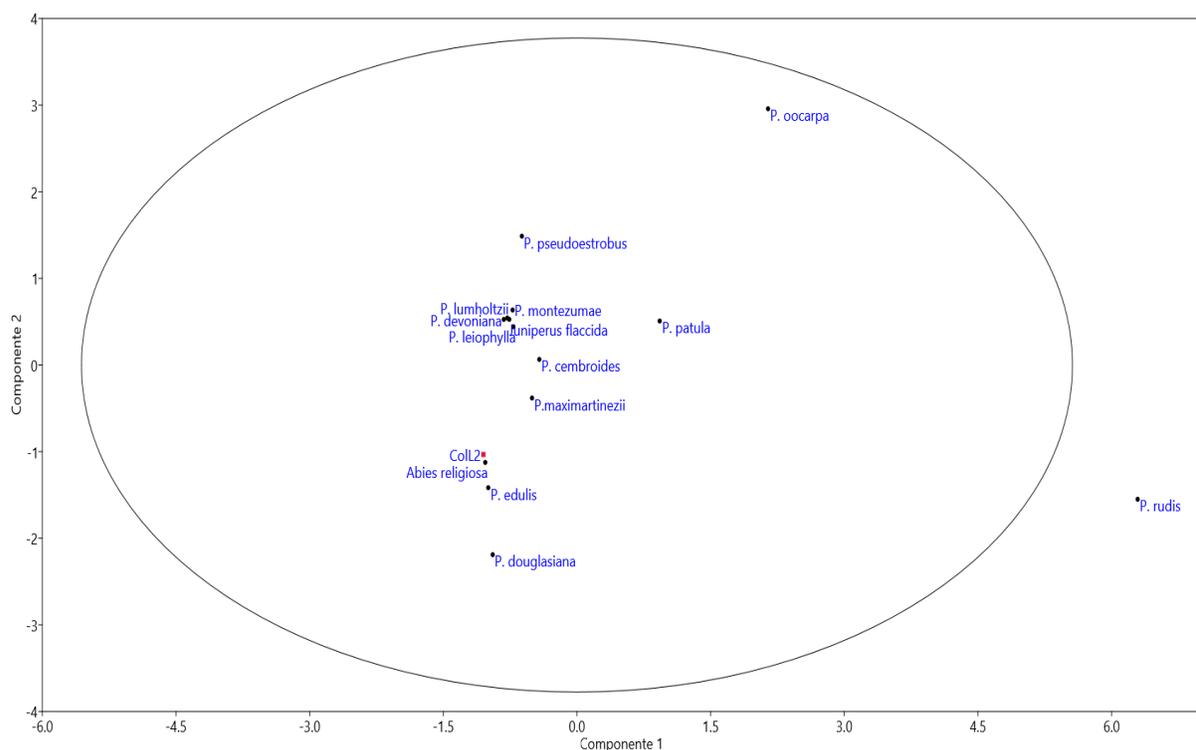


Figura 30 Distribución en el hiperespacio de la muestra ColL2

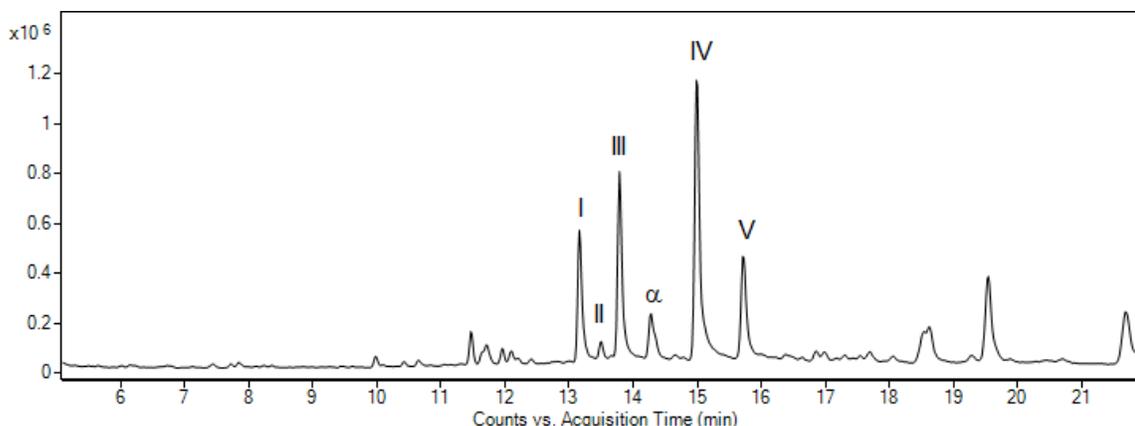


Figura 31 Cromatograma de Coll2

Encontrar muestras comerciales provenientes de *Abies* no es de sorprenderse, ya que en las mismas zonas del país donde se encuentran los bosques de coníferas, los pinares no constituyen el único tipo de vegetación, como se mencionó antes los pinares compiten con bosques de *Quercus*, y en ocasiones con los bosques de *Abies*, *Juniperus*, *Alnus* y algunas otras comunidades vegetales (figura 32) (Rzedowsky, 2006). Históricamente la resina del *azóyatl*, “abeto mexicano”, se empleaba como medicamento, tanto la resina como un aceite que sale “de unas vejiguillas” que hay en el tronco (Martínez-Cortés, 1970). Este árbol que es conocido como oyamel o pinabete tiene en su tronco, cuando es joven, vejigas con resina llamada trementina de abeto.

También se analizaron otras muestras cuyo origen botánico se pudo correlacionar con una conífera diferente a los pinos, tal es el caso de las muestras provenientes de Tuxtla Gutiérrez, TuxA1 y TuxA3 (figura 33) que se identificaron como *Juniperus fláccida*, popularmente conocido como Táscate (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2012).

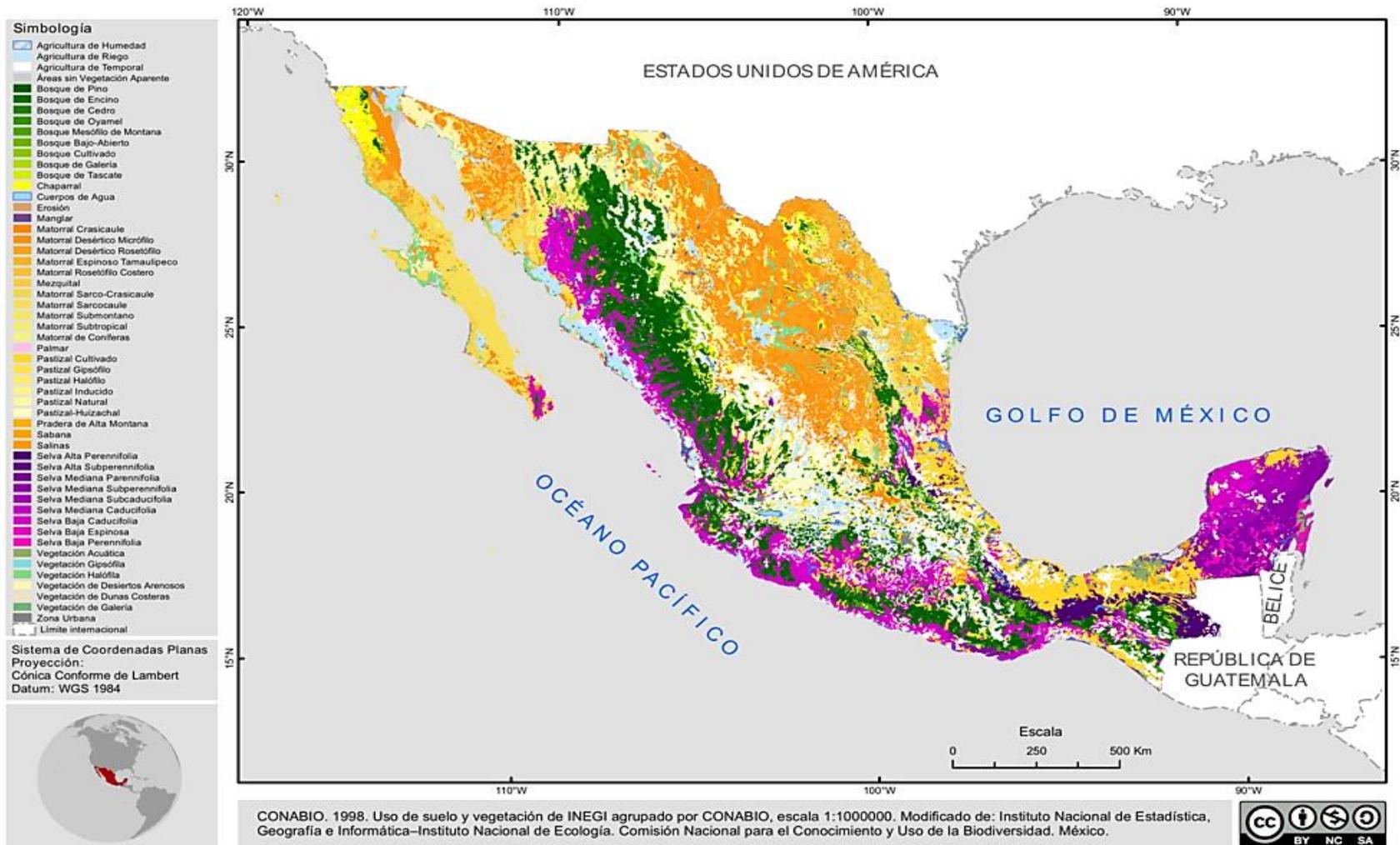


Figura 32 Vegetación en México de INEGI agrupada por CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2012)

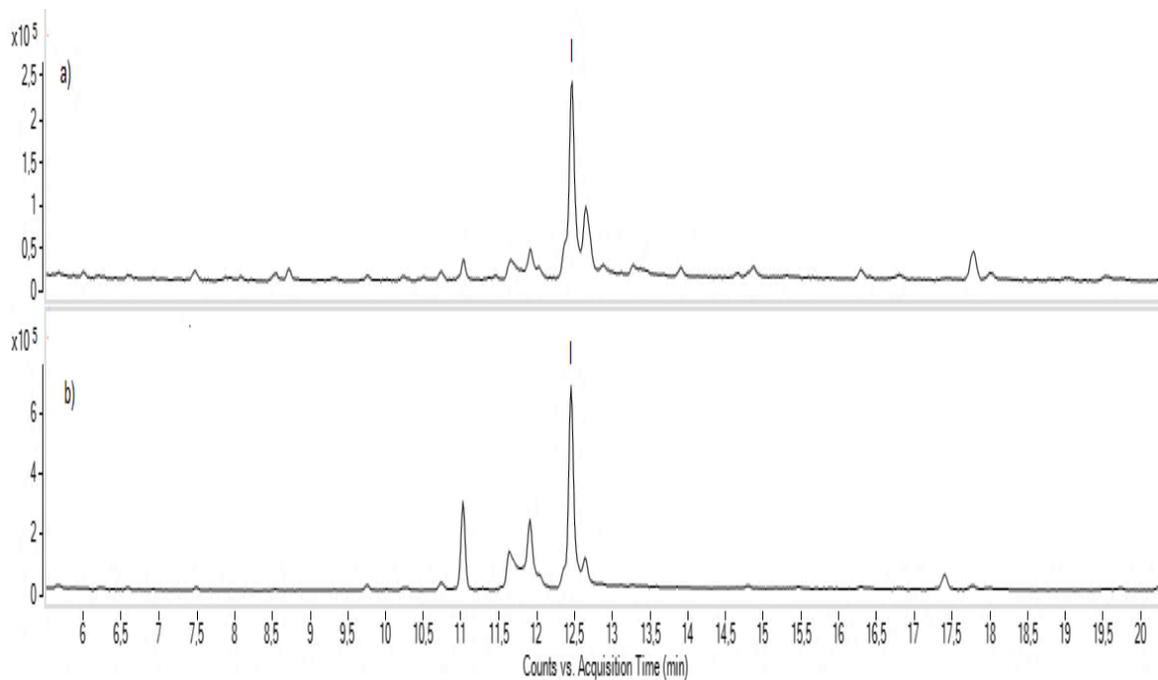


Figura 34 Cromatogramas de las muestras (a) TuxA1 y (b) TuxA3.

Por otro lado, se identificaron dos muestras de *Pinus douglasiana* provenientes de dos regiones diferentes de la república: Mérida y Ciudad de México (MerA1 y MilB2), figura 35, esto es sorprendente ya que hasta ahora no se contaba con registros que indicaran que la resina de esta especie es aprovechada.

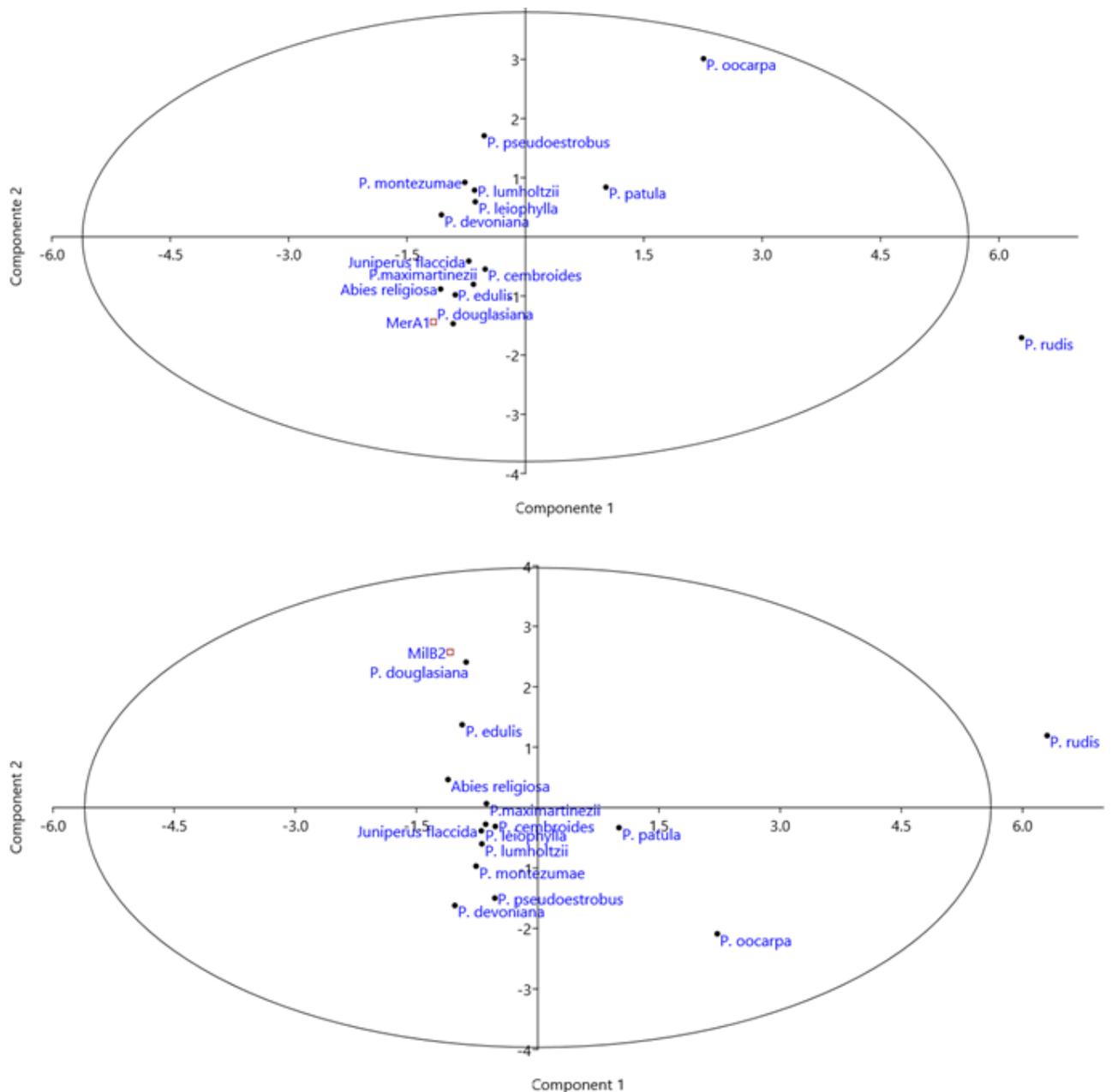


Figura 35 Distribución en el hiperespacio de las muestras comerciales identificadas como *Pinus douglasiana*

En este caso, la composición de esta especie se caracteriza por dos señales importantes correspondientes al ácido dehidroabiético (IV) y al ácido isopimárico (I) por encima de otros diterpenos como el ácido pimárico (II), palústrico (III) y el ácido sandacopimárico (VI), figura 36.

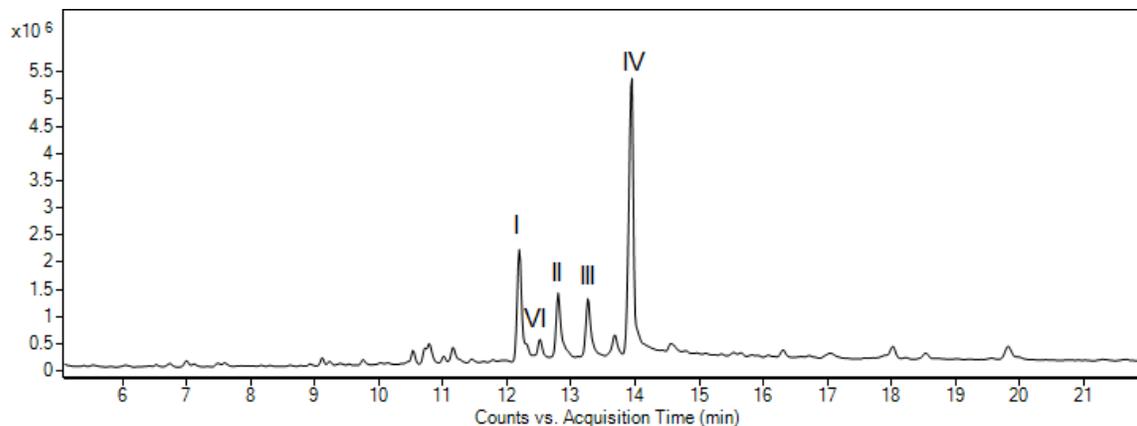


Figura 36 Cromatograma de MilB2, identificado como *Pinus douglasiana*.

Otro caso en el que se identificó una muestra comercial como una especie que no es tradicionalmente resinada, según los registros, es el caso de la muestras provenientes de Oaxaca, OaxC3, y la Ciudad de México, MilA1, que se correlacionaron con la especie *Pinus maximartinezii*, figura 37.

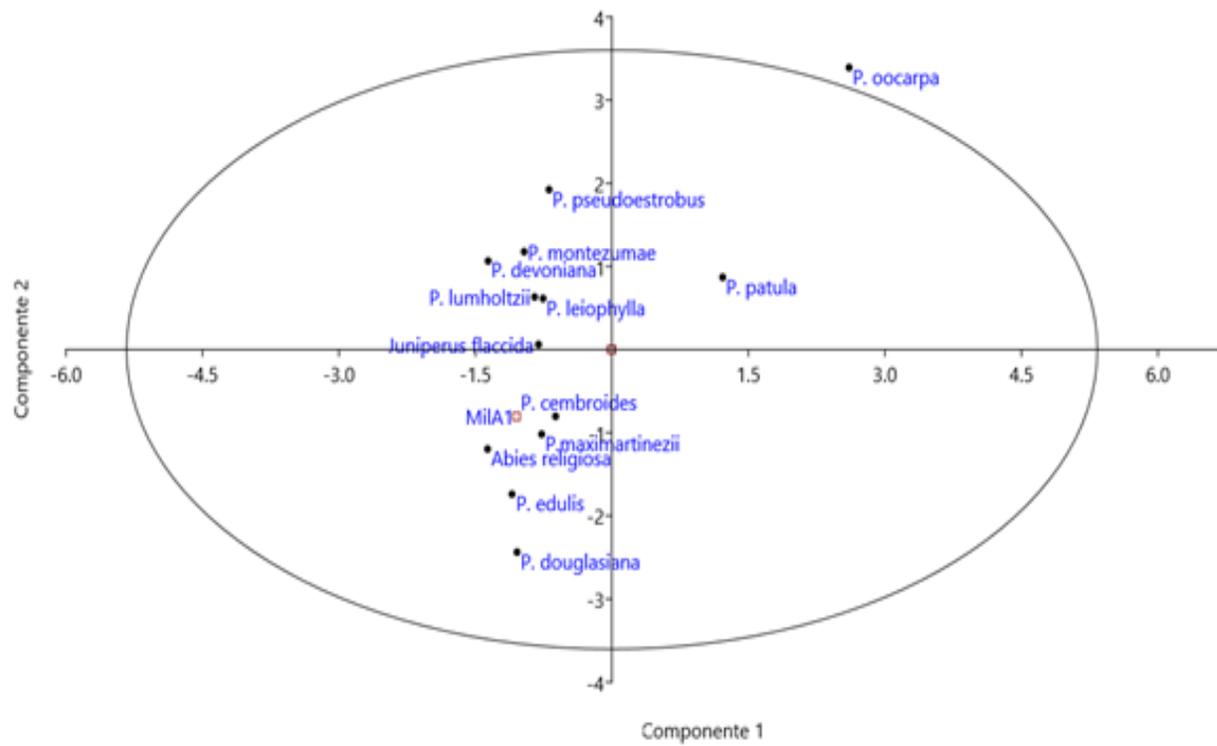
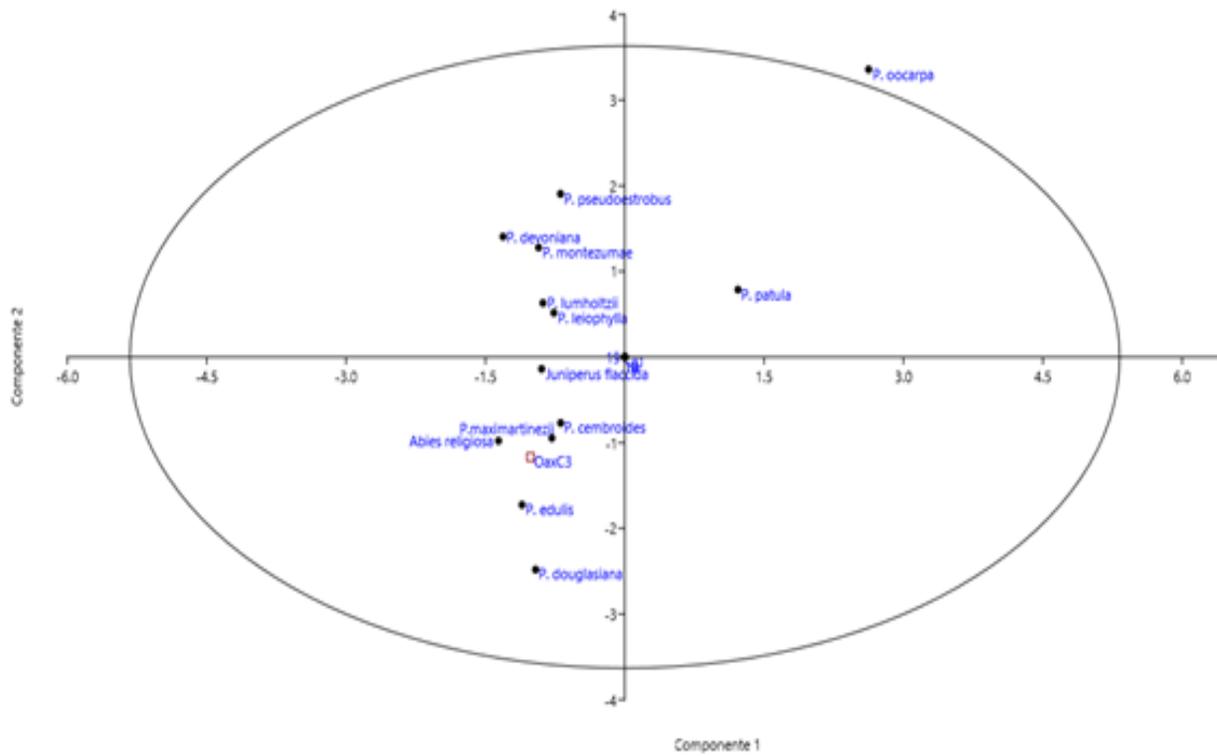


Figura 37 Distribución en el hiperespacio de las muestras MilA1 y OaxC3 identificadas como *Pinus maximartinezii*.

En este caso la especie se caracteriza porque la señal correspondiente al ácido dehidroabiético (IV) se encuentra en mayor proporción en el perfil molecular, seguida por el ácido pimárico (I), y de otros marcadores como los ácidos isopimárico (II) y palústrico (III) cuya señal es menor, no obstante, las señales correspondientes a estos últimos se presentan en proporciones similares entre ellos, figura 38.

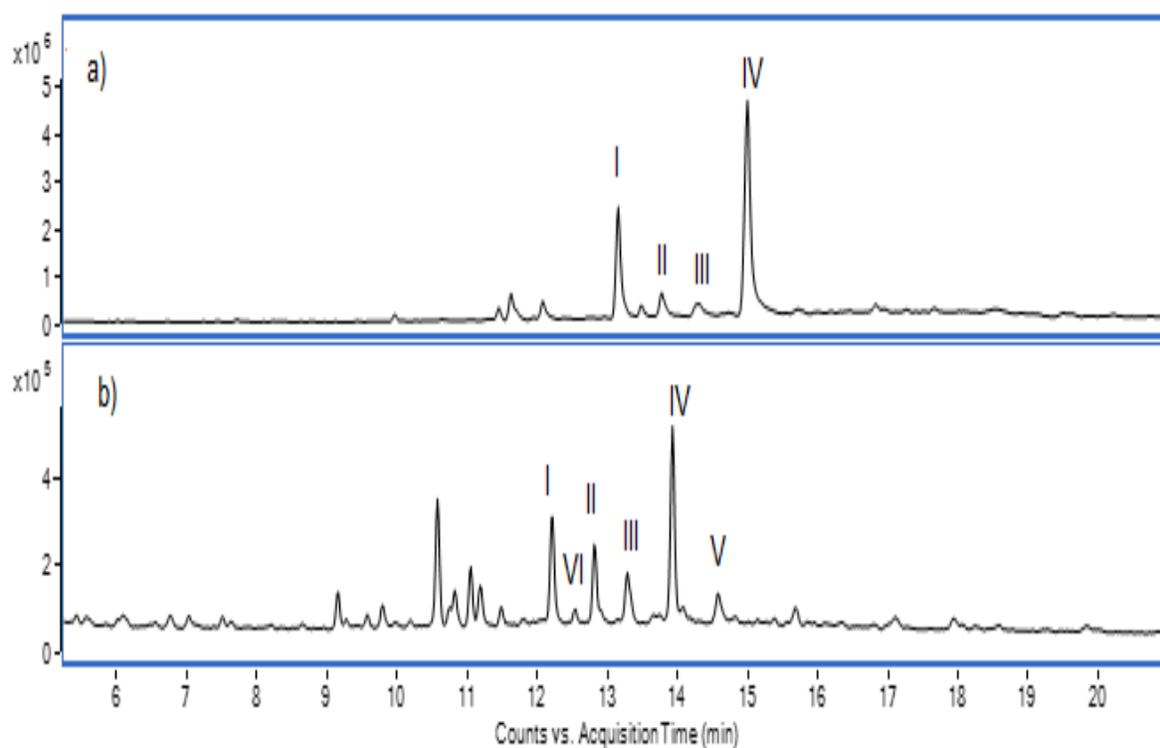


Figura 38 Cromatogramas de las muestras identificadas como *Pinus maximartinezii*. (a) OaxC3, (b) MilA1.

La quinta especie identificada entre las muestras comerciales fue *Pinus edulis*, figura 39, anteriormente no se tenía registro de la explotación comercial de la resina de esta especie de pino. En este caso la muestra se colectó en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

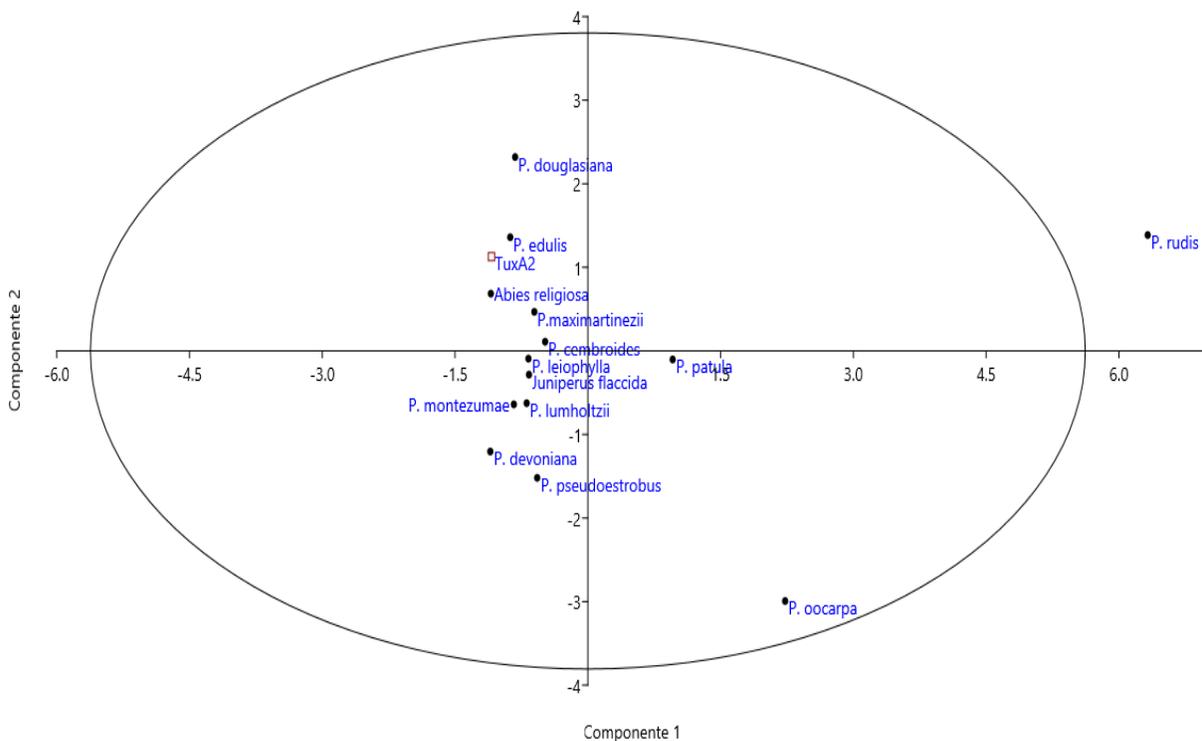


Figura 39 Distribución en el hiperespacio de la muestra TuxA2 identificada como *Pinus edulis*.

En los cromatogramas de las muestras de esta especie se puede apreciar que la señal del ácido dehidroabiético (IV) predomina en la composición del perfil molecular de la resina, las señales del resto de los ácidos diterpénicos que se encuentran en la muestra tales como el ácido pimárico (I) y su isómero conformacional (α), el ácido isopimárico (II), el ácido palústrico (III), el ácido abiético (V) y el ácido pimárico (VI) se encuentran en similar magnitud, figura 40.

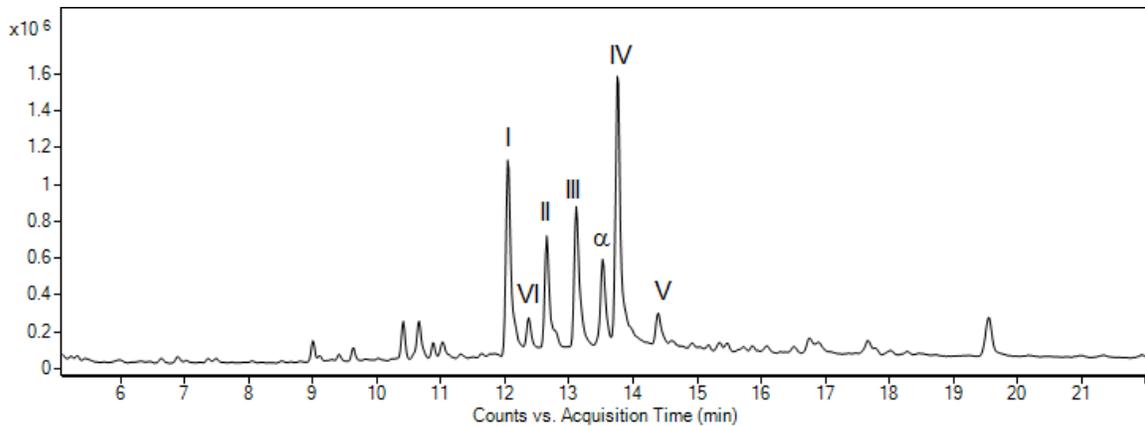


Figura 40 Cromatograma de TuxA2

De las muestras obtenidas en la Ciudad de México, SonA1 se identificó como *Pinus devoniana*, figura 41, que tampoco era una especie conocida por ser explotada por su resina.

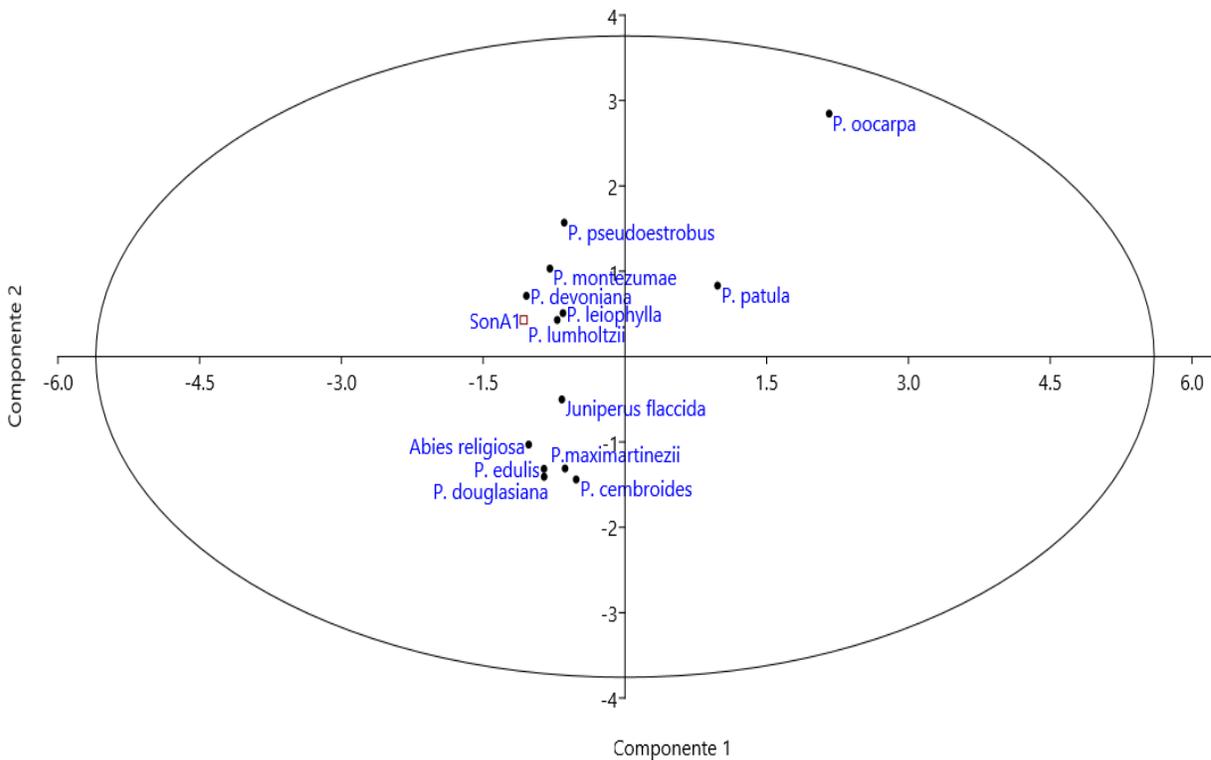


Figura 41 Distribución en el hiperespacio de SonA1.

A diferencia de los perfiles estudiados anteriormente, en las muestras de *P. edulis*, los abietanos predominan la composición de la resina de esta especie; donde el

ácido palústrico (III) y el ácido abiético (V) son los diterpenos de mayor importancia para su identificación debido a las altas proporciones de sus señales en comparación con las de los demás ácidos presentes en la resina, figura 42.

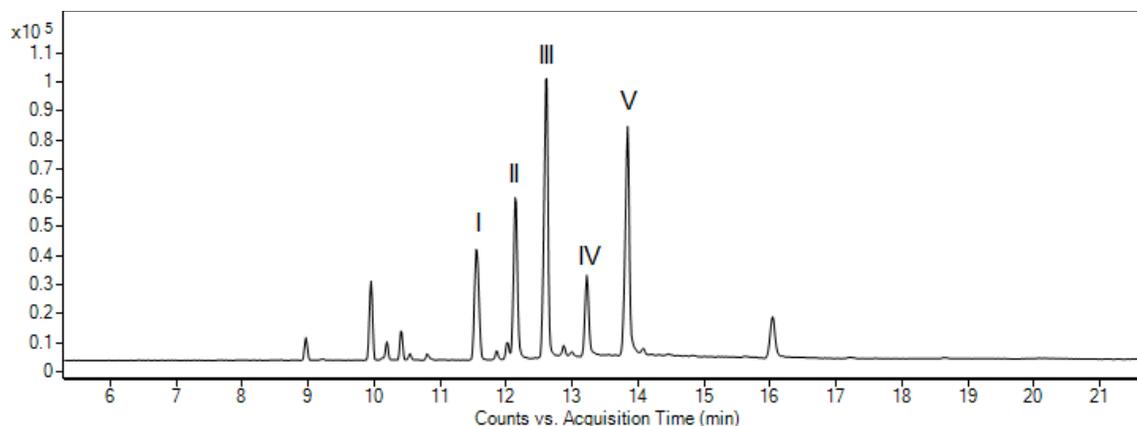


Figura 42 Cromatograma de SonA1

También fueron encontradas muestras de especies que se conocen por ser árboles frecuentemente resinados, este es el caso de la muestra MilA2 identificada como *Pinus pseudoestrobis* mediante PCA y la gráfica del mismo, figura 43.

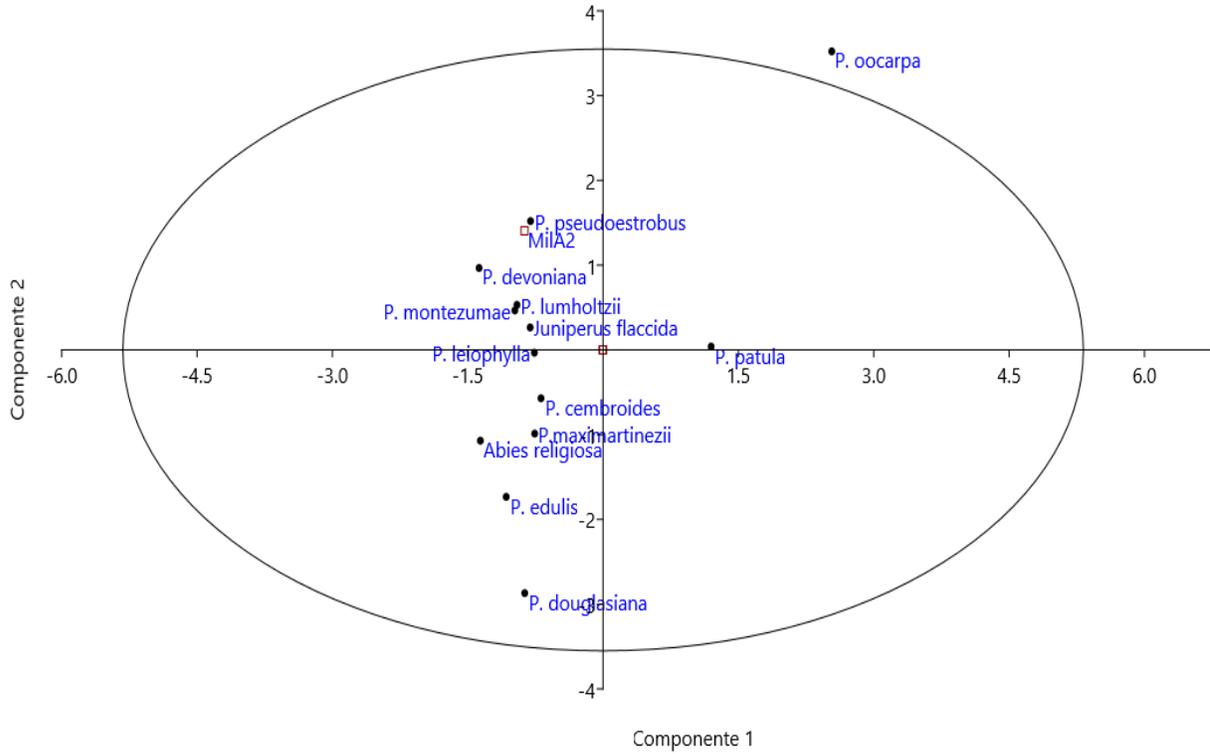


Figura 43 Distribución en el hiperespacio de MiA2.

Los ácidos palústrico (III) y dehidroabiético (IV) son los únicos presentes en esta muestra (figura 44), las proporciones en el perfil molecular en las que se encuentran estas moléculas es lo que la sitúan en la región de la gráfica de PCA que lo identifica como *Pinus pseudoestrobis*.

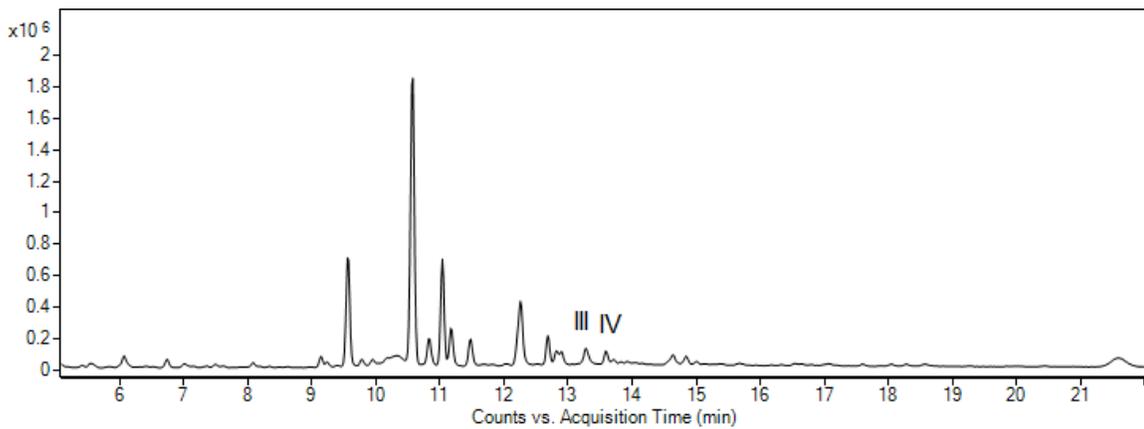


Figura 44 Cromatograma de MiA2

La última muestra para la que se pudo sugerir un origen botánico fue la muestra SonP1, identificada como *Pinus montezumae*, figura 45, otra de las especies conocidas por ser explotada por su resina.

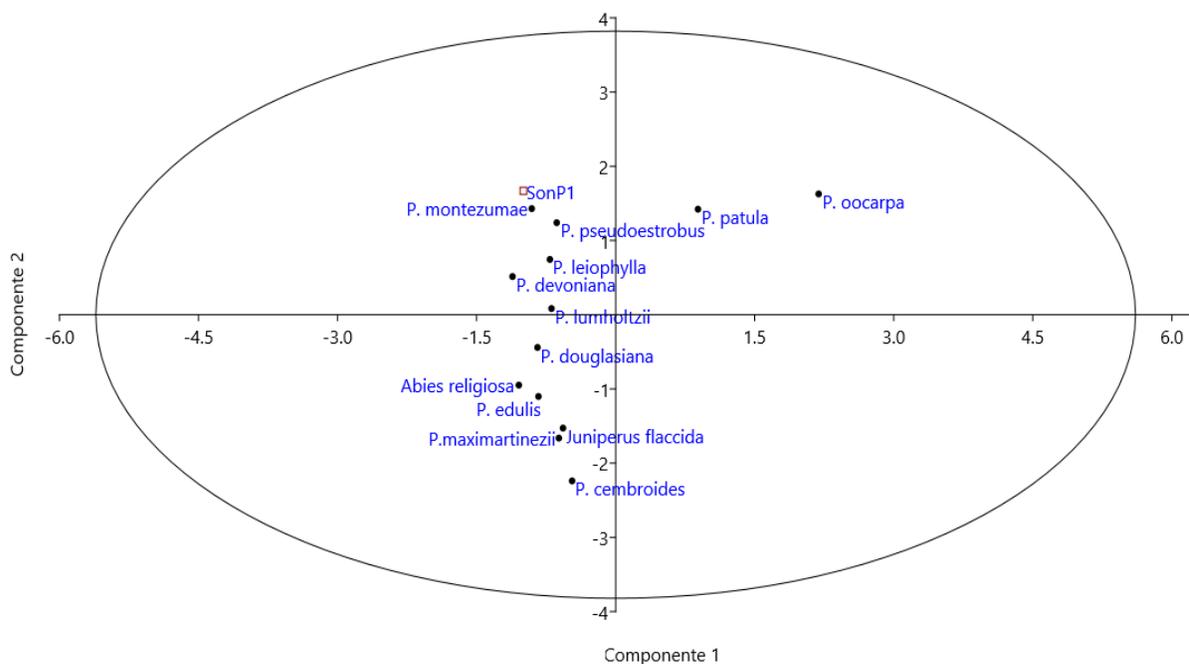


Figura 45 Distribución en el hiperespacio de SonP1

Al igual que en las muestras colectadas *in situ*, la muestra comercial exhibe una alta concentración de los ácidos palústrico (III), dehidroabiético (IV) y el isómero conformacional del ácido pimárico cuando se le compara con otros marcadores también identificados, figura 46.

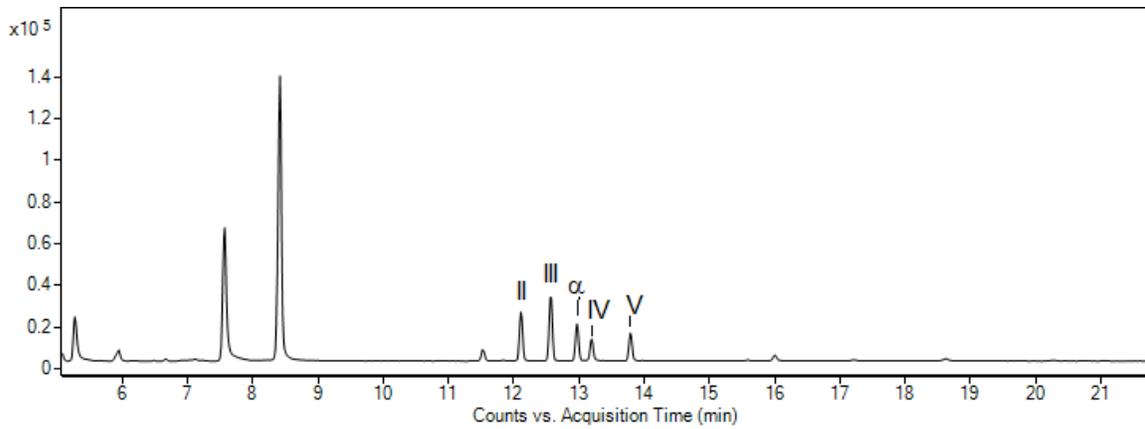


Figura 46 Cromatograma de SonP1

Finalmente, en la figura 47 se graficaron las 10 muestras comerciales para las cuales no se pudo sugerir un origen botánico. De estas muestras, 7 provienen del sureste del país (Campeche, Mérida y Tuxtla Gutiérrez), mientras que las otras provienen del centro del país.

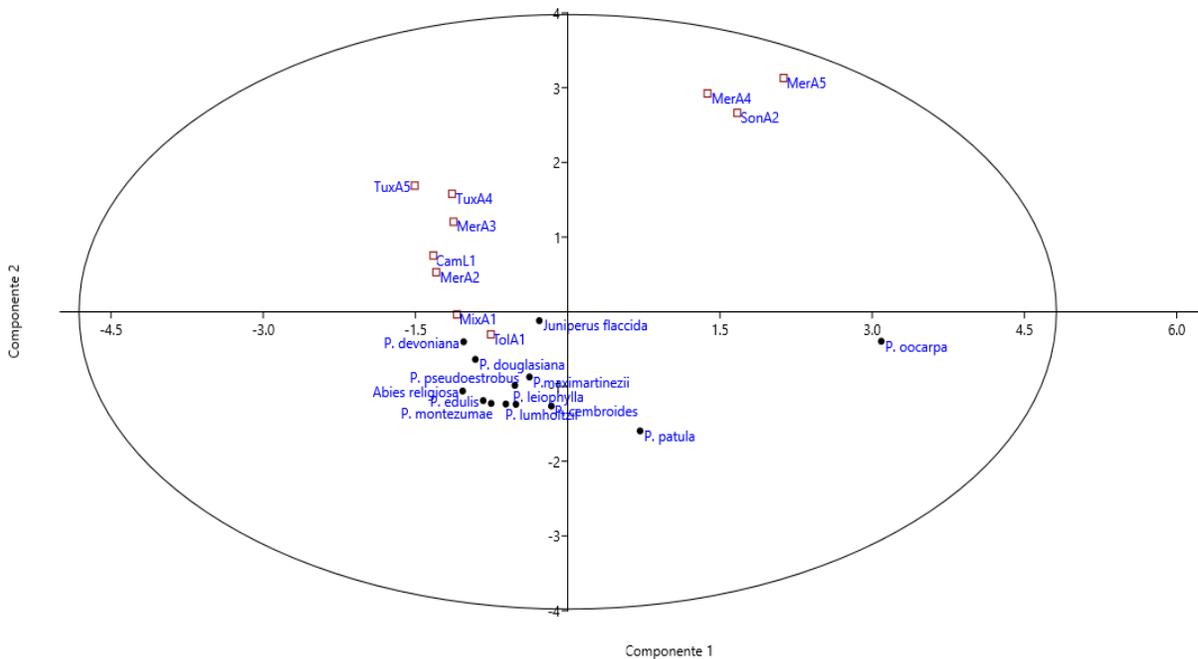


Figura 47 Distribución en el hiperespacio de las muestras de especies desconocidas.

10.4 Resultados del estudio de muestras arqueológicas

Las muestras obtenidas de piezas arqueológicas fueron estudiadas por medio de un protocolo apropiado de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

10.4.1 Incensario antropomorfo Maya

De acuerdo a diversos estudios paleoetnobotánicos existe una larga historia de los usos espirituales y utilitarios de pinos en la zona Maya, que incluyen la construcción, el aprovechamiento de leña y la elaboración de rituales. De acuerdo a varios autores, se quemaba la resina de pino como incienso, algunas veces mezclado con copal [(Lentz, et al., 2005), (Morehart, et al., 2005), (Morehart & Helmke, 2008), (Dussol, et al., 2016)].

Por esta razón se planteó la hipótesis de que el contenido del incensario podría ser una resina de Pinaceae. Para su estudio se tomaron muestras del interior, específicamente del fondo del incensario y del exterior de un escurrimiento en la pared esperando encontrar marcadores moleculares típicos de las resinas de pino.

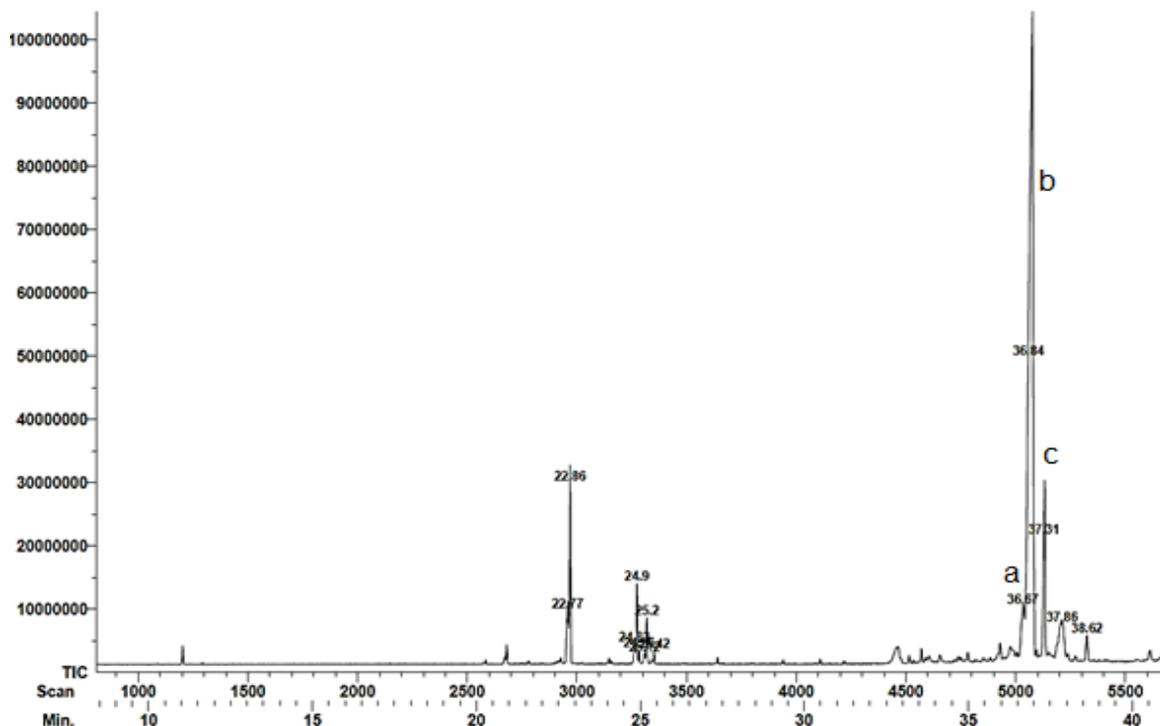


Figura 48 Cromatograma de la muestra tomada del fondo de la pieza.

El análisis cromatográfico de la muestra tomada del interior de la pieza arrojó el cromatograma mostrado en la figura 48. A partir de él fue posible la identificación de tres moléculas, todas ellas ésteres triterpénicos, estas moléculas han sido encontradas en plantas de la familia *Moraceae* (Fingolo, et al., 2013).

Tabla 17 Moléculas encontradas en la muestra tomada en el interior del incensario.

Indicador	Tiempo de retención (min)	Molécula	Fragmentación (m/z)
a	36.67	Acetato de β -amirin	189, 203, 218 , 468
b	36.84	Acetato de α -amirin	189, 203, 218 , 408, 468
c	37.31	Acetato de lupeol	189 , 204, 408, 468

Los triterpenos encontrados tienen esqueletos de oleananos y ursanos, estos se caracterizan por un pico base en 218 m/z. La diferenciación entre α y β -amirin se encuentra en las intensidades de los picos en 189 y 203 m/z (tabla 17) (Fingolo, et al., 2013).

El análisis del raspado del exterior de la pieza muestra un cromatograma con un número mayor de señales correspondientes a igual número de compuestos químicos, figura 46.

Esto se esperaba pues se supone que las moléculas del fondo del incensario se encuentran mucho más degradadas por haber estado en contacto directo con la fuente de calor al que el objeto fue probablemente sometido.

Es sabido que el calor provoca la degradación de las moléculas orgánicas favoreciendo procesos de oxidación.

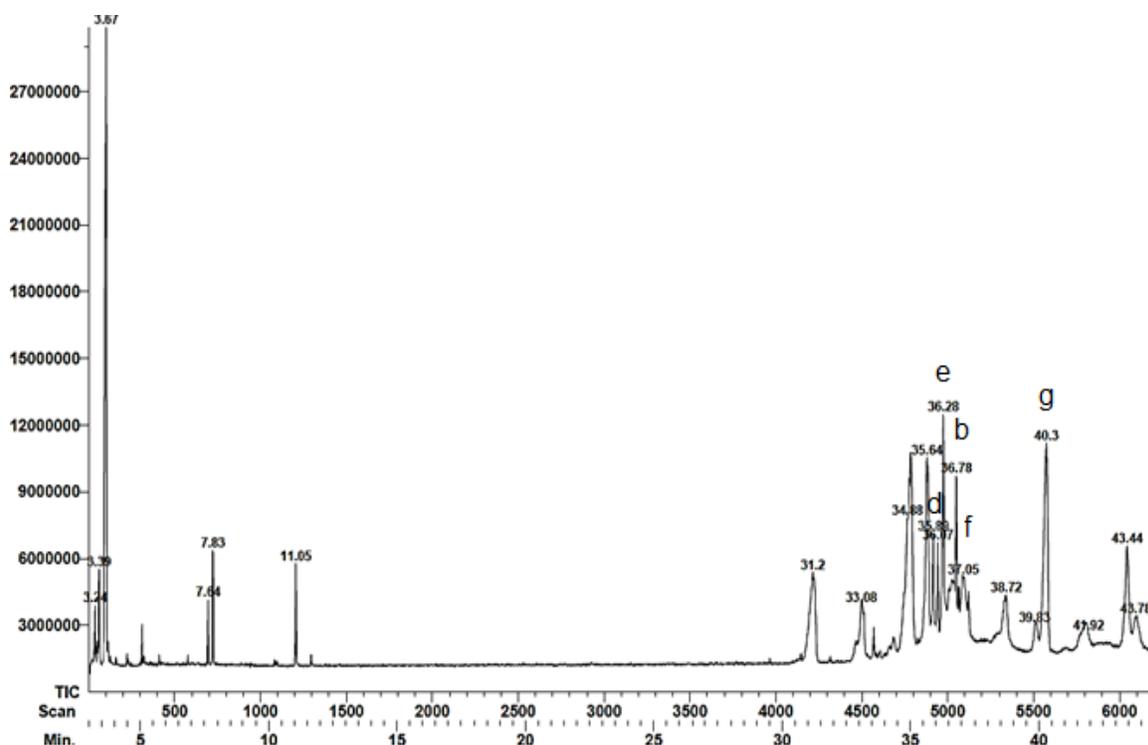


Figura 49 Cromatograma de la muestra tomada del exterior de la Pieza 8

En esta muestra se encuentran una gran cantidad de moléculas triterpénicas, particularmente esteres triterpénicos de cadena larga (tabla 18).

Tabla 18 Moléculas encontradas en la muestra del exterior del Incensario

Indicador	Tiempo de retención (min)	Molécula	Fragmentación (m/z)
d	36.07	β -amirona	189, 203, 205, 218 , 409, 424
e	36.28	Decanoato de β -amirin	189, 203, 218 , 409, 580
b	36.78	Acetato de α -amirin	189, 203, 218 , 408, 468
f	37.06	Lupeol	175, 189 , 203, 218, 408, 483
g	40.03	Octanoato de α -amirin	189, 203, 218 , 552

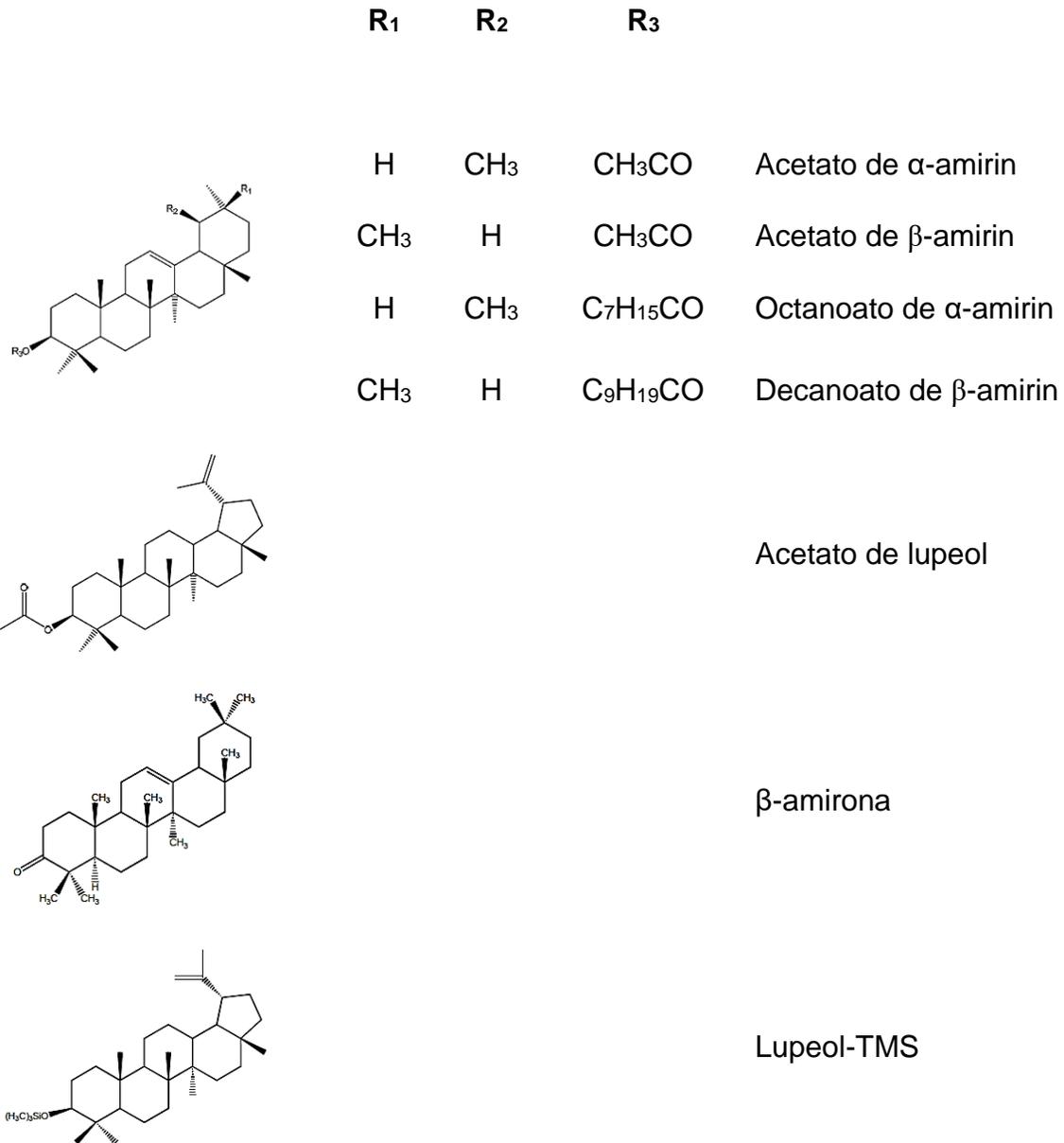


Figura 50 Estructura de las moléculas encontradas en las muestras tomadas en el incensario.

Los estéres triterpénicos encontrados tanto en el exterior como en el interior de la pieza arrojan un perfil molecular que coincide con el encontrado en plantas de la familia *Moraceae* (Fingolo, et al., 2013).

Como se detalla en la sección 9.1.4 de este documento esta pieza arqueológica proviene de Champotón.

Champotón se ubica en el estado de Campeche. Actualmente es la cabecera del municipio del mismo nombre y se encuentra situado en la parte oeste de la península de Yucatán en el litoral del Golfo de México, sobre la margen del sur del río Champotón (Gómez Cobá, 2006).

Los tipos de vegetación que existen en el municipio son la selva alta perenifolia y la selva mediana subperenifolia en los que se distinguen el tular y el manglar, pastizales inducidos y sabanas. En la costa se desarrolla el tular y el manglar, debido a las tierras pantanosas del lugar.

Dos plantas de la familia *Moraceae* se encuentran presentes en estos ecosistemas: el Ramón (*Brosimum alicastrum*), y el amate (*Ficus spp.*) (Rzedowsky, 2006) (Martínez & Galindo-Leal, 2002) (Gómez Cobá, 2006).

Los estados con el mayor número de especies de *Moraceae* están localizados en el sureste del país (figura 52) (Serrato, et al., 2004). En el norte de Campeche se cita el bosque de *Vitex* con bosques de *Ficus spp.*, *Brosimum alicastrum* ente otras especies (Rzedowsky, 2006).

En México han sido reconocidas 22 especies de *Ficus*; a nivel de subgénero, *Pharmacosycea* y *Urostigma* incluyen cinco y 17 especies, respectivamente (Ibarra-Manríquez, et al., 2012). Distribuidas en todo el país en patrones muy diversos, algunas muy restringidas y otras distribuidas en más de 20 estados.

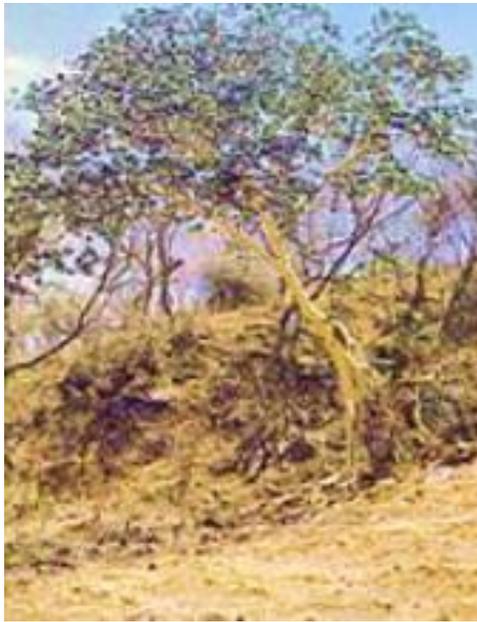


Figura 51 *Ficus petiolaris* "amate amarillo"

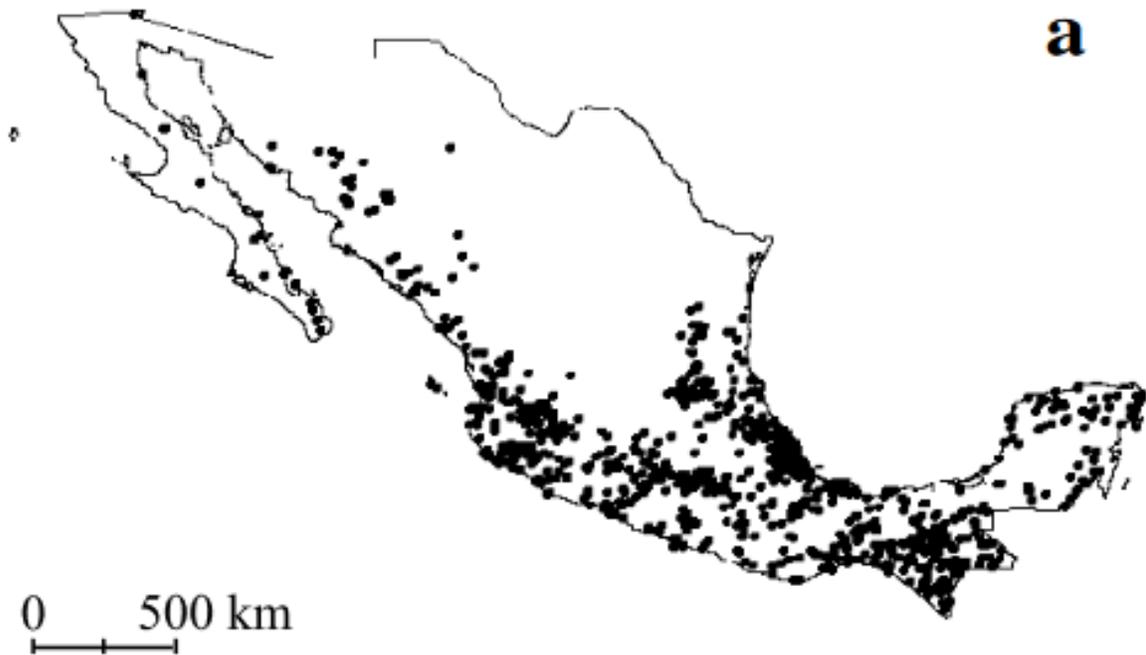


Figura 52 Distribución del género *Ficus* en México (Serrato, et al., 2004).

Por otra parte, la planta conocida como Ramón, figura 53, (*Brosimum alicastrum*) originaria de Mesoamérica y el Caribe, ha sido usada con fines terapéuticos tradicionalmente e incluso de tipo ritual. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). La semilla tostada y molida se usa como un sustituto de café sin cafeína.

Bien hervida y molida, se usa como masa para hacer tortilla. De acuerdo con Dennis E. Puleston, el maíz y el ramón fueron posiblemente las principales fuentes de alimento para los mayas del periodo clásico. Los mayas reconocieron el valor de las plantas como el ramón, apreciaron que su semilla es mucho más nutritiva, sus cosechas son más productivas y resistentes a las sequías o inundaciones que el maíz y otras cosechas anuales (Meiners, et al., 2009).

Al látex y a la corteza se le atribuyen propiedades medicinales y su madera es utilizada para múltiples fines como la elaboración de muebles y artesanías.



Figura 53 *Brosimum alicastrum* (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

El bosque tropical perennifolio de *Brosimum* se extiende desde el sureste de San Luis Potosí, a lo largo de la vertiente del Golfo de México, hasta Tabasco y Chiapas y, como en el caso anterior, penetra más al sur hacia América Central. También ocupa partes de la península de Yucatán, sobre todo en las superficies pertenecientes a Campeche (donde ocupan amplias áreas al sur de Champotón) y Quintana Roo (figura 54). Es solo en la península de Yucatán donde se encuentran aún en pie más

amplias superficies cubiertas por masas forestales dominadas por esta especie. Más aún se correlaciona la existencia de “ramonales” en Campeche con la presencia de sitios arqueológicos mayas (Rzedowsky, 2006).



Figura 54 Distribución geográfica de *Brosimum alicastrum* en México (Rzedowsky, 2006)

Por lo anteriormente expuesto, resulta indispensable conducir análisis que permitan caracterizar el perfil molecular de las resinas y/o látex de las especies endémicas de la región de Campeche, con particular hincapié en *Brosimum alicastrum* y en algunas especies de *Ficus*.

Por ello la estrategia que se sugiere para encontrar el origen botánico del material presente en el incensario consistirá explorar la flora nativa del lugar, analizar las resinas de especies que se encuentren cercanas al sitio arqueológico, para posteriormente comparar los perfiles moleculares de ambos materiales.

10.4.2 Muestra obtenida de ofrenda a Tláloc

La muestra corresponde a un material de aspecto resinoso recobrado de los huesos de un infante encontrado entre los elementos de una ofrenda a Tláloc en Huexotla, municipio de Texcoco en el Estado de México.

El cromatograma obtenido de esta muestra es el presentado en la figura 55.

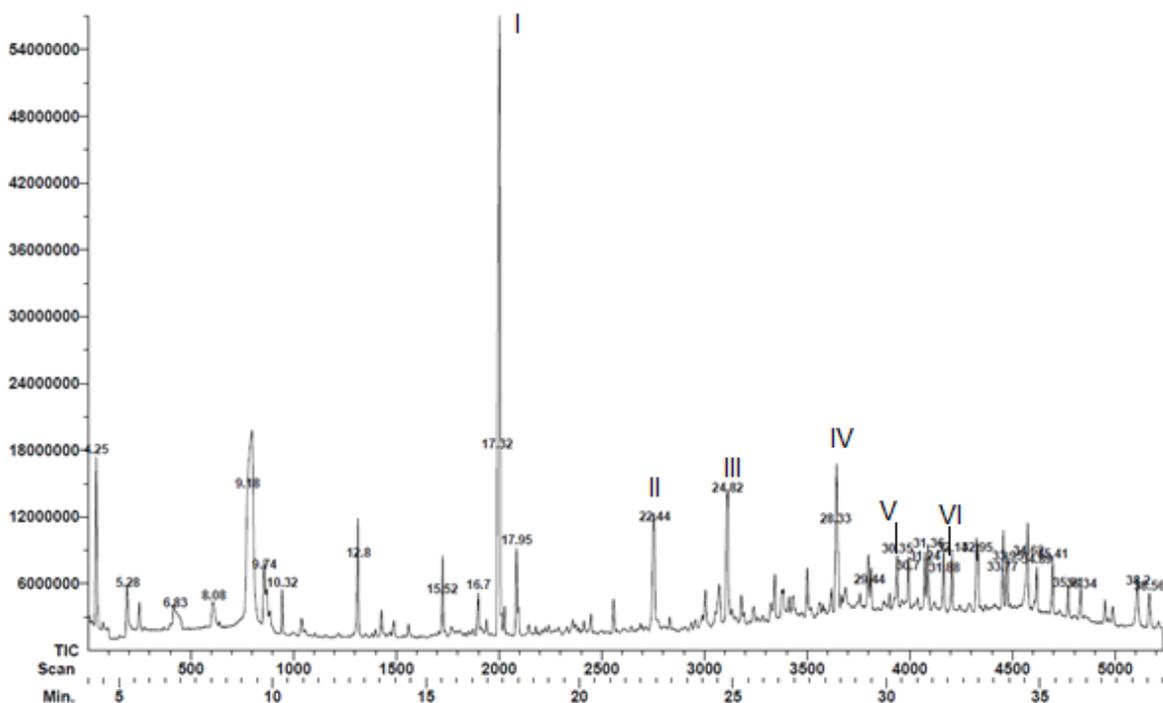


Figura 55 Cromatograma de la muestra ofrenda a Tláloc

Contrariamente a lo esperado, no se encontraron marcadores moleculares típicos de resinas ya sean diterpénicas, triterpénicas o fenólicas. En cambio en esta muestra, se encontraron ácidos carboxílicos y alcanos de cadena larga (Tabla 19) este tipo de perfil excluye la presencia de alguna resina, y podría indicar la presencia de algún aceite o cera. Estas moléculas se encuentran comúnmente en muestras de ceras o aceites de origen animal o vegetal (Colombini & Modugno, 2009) (Colombini, et al., 2005) (Evershed, et al., 2002), sin embargo, el perfil molecular no contiene suficientes marcadores para sugerir un origen.

Tabla 19 Moléculas encontradas en el perfil de la muestra de la ofrenda a Tláloc

Indicador	Tiempo de retención	Nombre	Fragmentación (m/z)
I	17.32	2,2,4-trimetil-1,3-pentadienol diisobutirato	43, 71, 83, 111, 243
II	22.44	Ácido hexadecanoico	43, 57, 73, 85, 97, 213, 281
III	24.82	Ácido octadecanoico	43, 57, 73, 129, 185, 241, 284
IV	28.33	4-etil-fenol-2,2-metilembis[6(1,1-dimetiletil)]	57, 163, 175, 191, 312, 368
V	30.35	3,5,24-trimetiltetracontano	57, 71, 85, 97, 111, 127, 206, 239
VI	32.14	7-hexil eicosano	43, 71, 85, 99, 113, 127, 197, 281

La identificación de las moléculas presentes se llevó a cabo empleando la NIST.

En contextos arqueológicos, los lípidos experimentan modificaciones importantes respecto a su composición original como consecuencia de reacciones de degradación. La hidrólisis de los triglicéridos es un proceso común que lleva a la formación de ácidos grasos libres. Los mono- y diglicéridos, se producen por hidrólisis parciales, que pueden sobrevivir en muestras arqueológicas. Los ácidos grasos insaturados y especialmente los poliinsaturados experimentan procesos de oxidación localizados en los dobles enlaces vía reacciones de radicales donde se incluye oxígeno en la cadena. Sin embargo, de acuerdo a la literatura, raramente han sido detectados debido a su alta solubilidad en agua que facilita la lixiviación una vez que son enterrados. (Colombini, et al., 2005)

Considerando también, la similitud en la composición de aceites vegetales y la posibilidad de mezclas, los aceites degradados exhiben perfiles moleculares que impiden la identificación de la fuente botánica del material, debido a que el número de ácidos (2) y alcanos (2) identificados no son suficientes para la determinar la fuente botánica del material arqueológico.

Por lo anterior será necesario un mayor número de análisis y experimentación, que incluya protocolos de pretratamiento con hidrólisis de la muestra con el fin de obtener un mayor número de especies químicas para obtener un perfil molecular más completo que permita apuntar hacia algún origen botánico.

10.5 **Cuantificación, curva de calibración.**

Se realizaron las curvas de calibración y se calcularon los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), así como el intervalo de linealidad del estándar disponible de ácido abiético, los resultados se presentan en la tabla 20.

El límite de detección (LOD S/N=3/1) y el límite de cuantificación (LOQ=10/1) fueron menores a 0.15 y 0.50 mg respectivamente.

Tabla 20 Información estadística de las curvas de calibración.

Estandar diterpénico	Intervalo de linealidad (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	Correlación	Ecuación
Ácido abiético	0.1-1.3	0.150	0.50	0.9901	Y=6154816.70-917372.96

11 Conclusiones

Este trabajo centrado en el estudio del perfil molecular de resinas diterpénicas, permitió establecer protocolos eficaces de análisis de cromatografía de gases para el estudio de marcadores moleculares diterpénicos, con el fin de realizar estudios globales en muestras de patrimonio cultural, y para el estudio de resinas puras.

A través de los protocolos desarrollados se analizaron muestras de resinas de pinos certificadas botánicamente, lo cual permitió detallar la composición molecular de las 15 especies estudiadas, es la primera vez que se realiza un análisis en el que se estudia detalladamente el perfil molecular de resinas de tantas especies de *Pinaceae* en México.

Este tipo de estudio posibilitará la identificación de especies de pinos de las que provienen las resinas que se comercializan en el país.

Asimismo, permitió inferir el origen botánico de muestras de origen desconocido por medio de GC-MS y comprando el perfil molecular de las muestras desconocidas con aquel de muestras de origen botánico conocido que fueron colectadas como parte de este trabajo.

Las muestras de origen desconocido fueron obtenidas de dos maneras: por resinación *in situ* y también fueron de origen comercial. En ellas se detectaron los marcadores y perfiles moleculares característicos de varias de las diferentes especies de *Pinaceas* estudiadas tales como *Pinus montezumae*, *pseudoestrobis*, *lumholtzii* y *Abies religiosa*.

Los análisis estadísticos (PCA) permitieron proponer un origen botánico para 11 de las 21 resinas comerciales de pino que adquirieron en el centro y sur este de México, esta aproximación permitió también establecer el origen 8 de las 22 resinas muestreadas directamente de los árboles.

Se espera que en un futuro para demostrar que esta asignación de la especie es correcta se pueda realizar un análisis lineal discriminante (LDA). Este tipo de análisis requiere obtener un mayor número de muestras de resina de cada especie de árbol estudiada.

Uno de los resultados más trascendentes de esta investigación, radica en el hallazgo de muestras de resinas comerciales provenientes de especies que no habían sido reportadas hasta ahora como resinadas, tales como *Pinus maximartinezzi*, *P. devoniana*, *Pinus edulis* y *P. douglasina* sin duda la gran diversidad ecológica de nuestro país ha posibilitado la explotación de un gran número de especies de plantas.

Otro resultado inesperado consistió en el hallazgo de un copal de tipo piedra (SonP1) que contuvo claramente marcadores de resinas diterpénicas poniendo de manifiesto la diversidad de orígenes botánicos que puede tener un material con una misma denominación, pues ya Vázquez y Lucero detectaron marcadores triterpénicos en otros copales tipo piedra.

En cuanto al copal “sintético” se estableció que esta denominación es errónea pues está compuesto por moléculas diterpénicas de origen natural. Probablemente el término sintético deriva del método para su obtención.

Este trabajo también permitió confirmar químicamente la explotación comercial de las resinas de 2 especies que han sido reportadas como resinadas de manera tradicional: *Pinus pseudoestrobis* y *Pinus montezumae*.

Tomando en cuenta la diversidad de pinos que existe en el país, existe aún la necesidad de caracterizar el perfil molecular de una mayor cantidad de especies de pinos y de ejemplares de los mismos para poder construir un modelo quimiométrico de discriminación mucho más poderoso.

Una investigación así se encuentra fuera de los alcances y posibilidades de una tesis de licenciatura, debido al tiempo que consumiría la colecta y el análisis de esa cantidad de muestras, sin embargo, no se descarta la posibilidad de continuar este trabajo en el futuro.

En cuanto al estudio de piezas arqueológicas abordadas en este trabajo, cabe resaltar la ausencia de diterpenos en los extractos obtenidos a partir de ellas. Contrasta con este hecho la evidencia etnográfica e histórica del uso de resinas de pino en la época prehispánica tanto de la cultura Maya como en la Azteca.

Como se mencionó antes otras investigaciones han documentado la presencia de compuestos diterpénicos en muestras arqueológicas provenientes de Teotihuacan. Así el presente trabajo permite contrastar el uso que se dió a las mismas en otros momentos históricos y entre otros grupos culturales.

Para descartar definitivamente el uso de resinas diterpénicas entre Mayas y Aztecas son necesarios aún muchos estudios, que abarquen un número mucho mayor de piezas arqueológicas en diferentes contextos.

Por otro lado, el estudio de la pieza de Champotón, en la que se encontraron ésteres triterpénicos que se presentan tradicionalmente en plantas de la familia *Moraceae*, abre una ventana de posibilidades y apunta hacia la necesidad de estudiar detalladamente el perfil molecular de látex provenientes de árboles de *Brosimum alicastrum* y de *Ficus*, que son parte de la flora típica encontrada en la península yucateca.

Como se expuso en la introducción del presente trabajo existen muchas preguntas aún sin resolver con respecto a la explotación de recursos naturales en la época prehispánica y en la época contemporánea y es posible que este trabajo oriente investigaciones futuras en la búsqueda del perfil molecular de las especies *Brosimum alicastrum* y *Ficus spp.* en objetos arqueológicos.

El estudio de la muestra de material proveniente de la ofrenda a Tláloc permitió descartar que se trata de una resina de cualquier tipo, ya que su composición molecular contiene ácidos carboxílicos y alcanos que apuntan al uso de algún aceite y/o cera que permanece sin identificar.

Otro de los resultados más trascendentes de esta investigación lo constituye el hecho de que el protocolo global GC-MS desarrollado, probó ser eficiente para el análisis no solo de materiales resinosos sino también de materiales de naturalezas diferentes.

Esta capacidad es invaluable en el caso de muestras de patrimonio cultural, ya que como se observó en el presente trabajo las hipótesis de arqueólogos,

conservadores e historiadores sobre la naturaleza de los materiales de patrimonio pueden estar muy alejadas de la realidad.

De esta manera, para obtener mayor información acerca de la naturaleza de la muestra de la ofrenda Azteca a Tláloc, se requiere realizar más experimentos, con protocolos que vayan enfocados específicamente al estudio de aceites y ceras. Esto permitirá obtener un perfil molecular más completo del material, y posibilitará sugerir un origen taxonómico, que esperamos, permitirá llenar las lagunas en el conocimiento que se tienen acerca del aprovechamiento y los usos atribuidos a los recursos naturales por parte de las antiguas culturas mesoamericanas y los grupos de pobladores nativos que aún se encuentran presentes en México.

12 Bibliografía

Abdi, H. & Williams, L. J., 2010. Principal Component Analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, Volumen 2.

Arrabal, C. y otros, 2005. Differentiation among five *Pinus pinaster* provenances based on its oleoresin terpenic composition. *Biochemical systematic and ecology*, Volumen 33, pp. 1007-1016.

Azemard, C., Menager, M. & Vieillescazes, C., 2016. Analysis of diterpenic compounds by GC-MS/MS contribution to the identification of main conifer resins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(24), pp. 6599-6612.

Beltran, V. y otros, 2017. Markers, Reactions, and Interactions during the Aging of Pinus Resin Assessed by Raman Spectroscopy. *Journal of Natural Products*, pp. 854-863.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. [En línea] Available at: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ojite&id=7882>

[Último acceso: 2017 Agosto 22].

Bohlmann, J. & Keeling, C. I., 2006. Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry*, Volumen 67, pp. 2415-2423.

Chivari, G. y otros, 1995. Pyrolysis Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Natural Resins Used for Artistic Objects. *Chromatographia*, Septiembre, 41(5/6), pp. 273-281.

Clemet, R. E. & Karasek, F. W., 1988. MASS SPECTROMETRY. En: *Basic Gas Chromatography - Mass Spectrometry*. Amsterdam: Elsevier, pp. 41-77.

Colombini, M. P., Francesca, M. & Ribechini, E., 2005. Direct exposure electron ionization mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry

techniques to study organic coatings on archaeological amphorae. *Journal Mass Spectrum*, pp. 675-687.

Colombini, M. P. & Modugno, F., 2009. *Organic Mass Spectroscopy in Art and Archeology*. Pisa, Italia: John Wiley & Sons.

Colombini, M. P., Modugno, F. & Ribechini, E., 2005. Organic mass spectrometry in archeology: evidence for Brassicaceae seed oil in Egyptian ceramic lamps. *Journal of Mass Spectrometry*, Volumen 40, pp. 890-898.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2012. *Biodiversidad mexicana*. [En línea] Available at: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/layouts/usva1mgw.png> [Último acceso: 18 agosto 2017].

Cotureau, R. B. & Phillips, M. A., 1999. Resin-based defenses in conifers. *Trends in plant science*, 4(5), pp. 184-190.

Croteau, R. & Funk, C., 1994. Characterization of two Cytochrome P45-Dependent Monooxygenases and an Aldehyde Dehydrogenase Involved in Abietic Acid Biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308(1), pp. 258-256.

Dettmer, K. & Engewald, W., 2014. *Practical Gas Chromatography. A comprehensive Reference*. New York: Springer.

Dussol, L., Elliot, M., Pereira, G. & Michelet, D., 2016. The use of firewood in ancient Mays funerary rituals:A case study from Rio Bec (Campeche, México). *Latin American Antiquity*, 27(1), pp. 51-73.

Evershed, R. P., 2008. Organic residue analysis in archeology: The archeological biomarker revolution. *Archeometry*, 50(6), pp. 895-924.

Evershed, R. P. y otros, 2002. Chemistry of Archeological Animal Fats. *Accounts of chemical research*, 35(8), pp. 660-668.

Fingolo, C. E., de S. Santos, T., Vianna Filho, M. D. M. & C. Kaplan, M. A., 2013. Triterpene Esters: Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). *Molecules*, Volumen 18, pp. 4247-4256.

Food and Agriculture Organization of United Nations, s.f. *Las coníferas en México*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/docrep/x5390s/x5390s04.htm> [Último acceso: 22 Agosto 2017].

Garibay, M., 1964. *Vocabulario de términos nahuas en el Manuscrito de la Cruz Badiano, Libellus de Medicinalibus Indorum Herbi*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.

Gernandt, D. S. & Pérez-de la Rosa, J. A., 2014. Biodiversity of Pinophyta (conifers) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, pp. 126-133.

Gómez Cobá, M. J., 2006. *Los entierros de Chakan Putun (Champotón) Campeche: Un estudio bioarqueológico y tafonómico*. Universidad Autónoma de Yucatán ed. Mérida, Yucatán, México: Facultad de Ciencias Antropológicas.

Ibarra-Manríquez, G., Cornejo-Tenorio, G., González-Castañeda, N. & Piedra Malagón, E. M. L. A., 2012. El género FICUS L. (Moraceae) en México. *Botanical Sciences*, 90(4), pp. 389-452.

Keeling, C. I. & Bohlmann, J., 2006. Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry*, pp. 2415-2423.

Kopka, J., 2006. Gass Chromatography Mass Spectrometry. En: K. Saito, R. A. Dixon & L. Willmitzer, edits. *Plant Metabolomics*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, pp. 2-19.

Langenheim, J., 2003. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany..* Portland: Cambridge: Timber Press..

Lentz, D. L., Yaeger, J., Robin, C. & Ashmore, W., 2005. Pine, prestige and politics of the Late Classic Maya at Xunantunich, Belice. *Antiquity*, Volumen 79, pp. 573-585.

Linares, E. & Bye, R., 2008. El Copal en México. *CONABIO. Biodiversitas*, Volumen 78, pp. 8-11.

Lucero-Gómez, P. y otros, 2014. Analysis of Mexican reference standards for *Bursera* spp. resins by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and application to archeological objects. *Journal of Archeological Science*, pp. 679-690.

Lucero, P., 2012. *Chemical analysis of resinous materials employed in artistic pre-hispanic Mexico : application to aztec and maya archaeological samples*. Université d'Avignon: s.n.

Maier, M. S., 2006. CG and CG-MS for Non-volatile Compounds. En: *Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/ Natural Products*. Buenos Aires: s.n., pp. 237-251.

March, R. E. & Todd, J. F. J., 2005. *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*. Second Edition ed. New Jersey: Wiley-Interscience.

Marinarch, C., Papillon, M.-C. & Pepe, C., 2004. Identification of binding media in works of art by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cultural Heritage*, pp. 231-240.

Martínez-Cortés, F., 1970. *Pegamentos, gomas y resinas en el México prehispánico*. s.l.:Resistol, S.A..

Martínez, E. & Galindo-Leal, C., 2002. La vegetación de Calakmul, Campeche, México: Clasificación, descripción y distribución. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, Volumen 71, pp. 7-32.

Maya Zepeda, L., 2006. *Patrones de variación química de poblaciones del complejo pinus ayacahuite-pinus strobiformis*. Las agujas(Zapopan): s.n.

Meiners, M., Sánchez Garduño, C. & De Blois, S., 2009. El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. *CONABIO. Biodiversitas*, Volumen 87, pp. 7-10.

Molina, A. d., 1944. *Vocabulario en lengua Castellana y Mexicana*. Madrid: Ediciones Cultura Hispánica.

Morehart, C. T. & Helmke, C. G. B., 2008. Situating Power and Locating Knowledge: A Paleoethnobotanical Perspective on Late Classic Maya Gender and Social Relations. *Archeological papers of the American Anthropological Association*, 18(1), pp. 60-75.

Morehart, C. T., Lentz, D. L. & Prufer, K. M., 2005. Wood of the Gods: The ritual use of pine (*Pinus* spp.) by the ancient Lowland Maya. *Latin American Antiquity*, 16(3), pp. 255-274.

Osete-Cortina, L. & Doménech-Carbó, M. T., 2005. Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry with on line trimethylsilylation. *Journal of chromatography A*, pp. 265-278.

Rezzi, S., Bighelli, A., Castola, V. & Casanova, J., 2005. Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* ssp. *laricio* from Corsica.. *Industrial Crops and Products*, pp. 71-79.

Ringenér, M., 2008. What is principal component analysis?. *Nature Biotechnology*, 26(3), pp. 303-304.

Rodrigues-Corrêa, K. C. d. S., de Lima, J. C. & Fett-Neto, A. G., 2012. Pine oleoresin: tapping green chemicals, biofuels, food protection, and carbon sequestration from multipurpose trees. *Food and Energy Security*, 1(2), pp. 81-93.

Russo, M. V. & Avino, P., 2012. Characterization and Identification of Natural Terpenic Resins employed in "Maddona con Bambino et Angeli" by Antonello de Messina using Gas Chromatography- Mass Spectrometry. *Chemistry Central Journal*.

Rzedowsky, J., 2006. *Vegetación de México*. 1ra edición digital ed. s.l.:Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Sahagún, B. d., 1956. *Historia general de las cosas de la Nueva España. Tomo III*. México: Editorial Porrúa.

Sánchez-González, A., 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos en México. *Madera y Bosques*, 14(1), pp. 107-120.

Sarker, S. D. & Latif, Z., 2006. Hyphenated Techniques. En: H. Press, ed. *Natural Products Isolation*. New Jersey: Methods in Biotechnology.

Schulz, H. & Baranska, M., 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, Volumen 43, pp. 13-25.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016. *Anuario Estadístico de la Producción Forestal 2015*, Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Serrato, A., Ibarra-Manríquez, G. & Oyama, K., 2004. Biogeography and conservation of the genus *Ficus* (Moraceae) in Mexico. *Journal of Biogeography*, Volumen 31, pp. 475-485.

Stashenko, E. & Martínez, J. R., 2014. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. En: *Advances in Gass Chromatography*. Colombia: INTECH, pp. 1-38.

Van den Berg, K. J., Boon, J. J., Pastorova, I. & Spetter, L. F. M., 2000. Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acids in Old Master paintings. *Journal of Mass Spectrometry*, Volumen 35, pp. 512-533.

Vázquez de Ágredos Pascual, M. L., Doménech Carbó, M. T. & Doménech Carbó, A., 2003. Resins and drying oils of precolumbian painting: A study fromo historical writings. Equivalences to those of European painting.. *Publicación del Instituto Universitario de Restauración del Patrimonio de la UPV*, Issue 3, pp. 185-191.

Vázquez Molotla, B. A., 2017. *Desarrollo de una metodología general de manejo y almacenamiento de piezas arqueológicas para su análisis cromatográfico. Aplicación al estudio de resinas triterpénica*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Watson, J. T. & Sparkman, O. D., 2008. *Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*. Fourth Edition ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

13 Anexos

13.1 Anexo 1

13.1.1 Espectros de Masas de las moléculas encontradas en las muestras de resina de pino

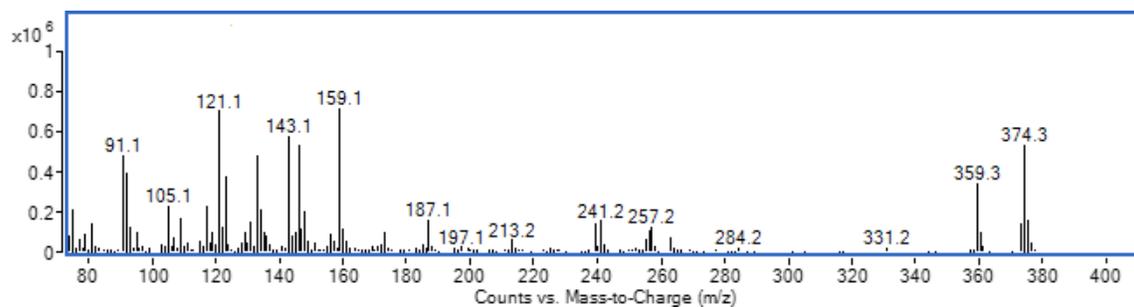


Figura 56 Espectro de masas del compuesto identificado como α

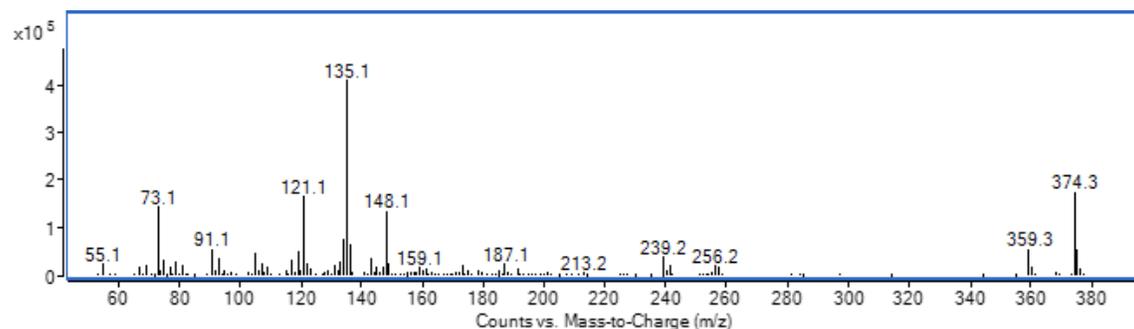


Figura 57 Espectro de masas del compuesto identificado como β

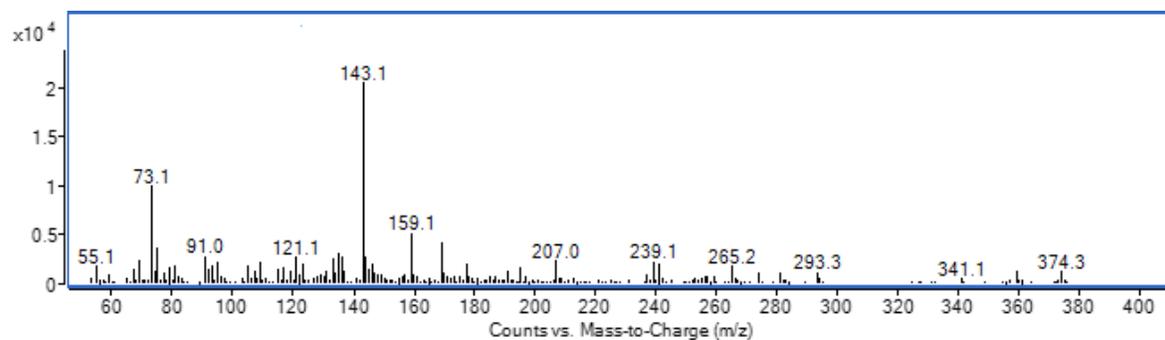


Figura 58 Espectro de masas del compuesto identificado como γ

13.2 Anexo 2

13.2.1 Cromatogramas obtenidos de resinas de pinos certificados botánicamente

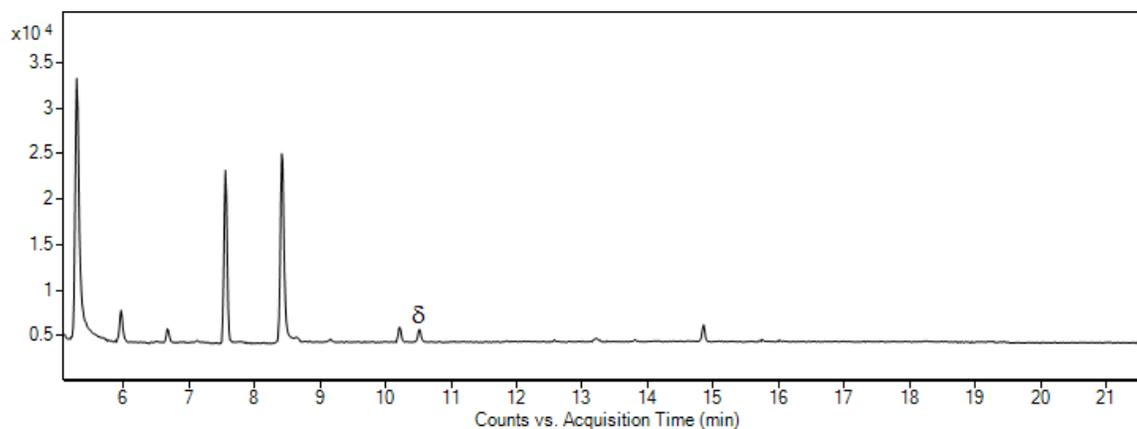


Figura 59 Cromatograma *Pinus cembroides*

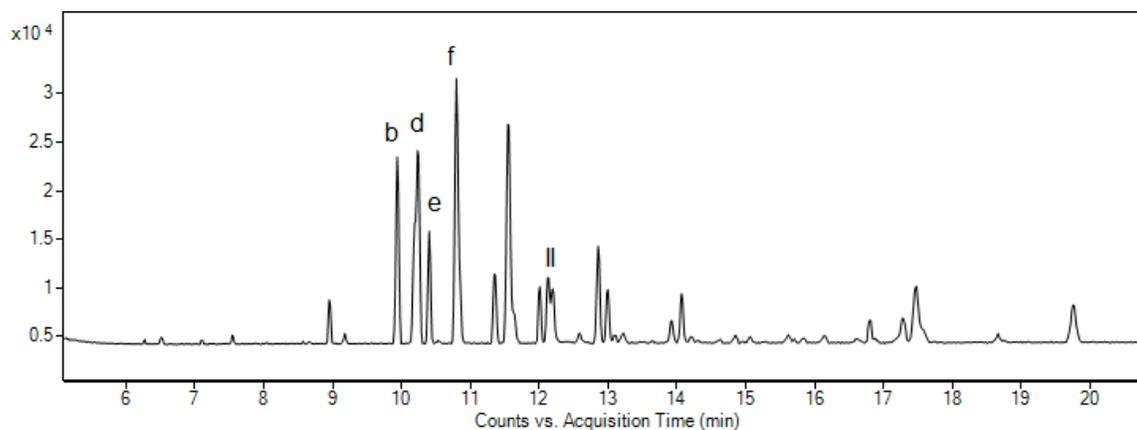


Figura 60 Cromatograma *Pinus rudis*

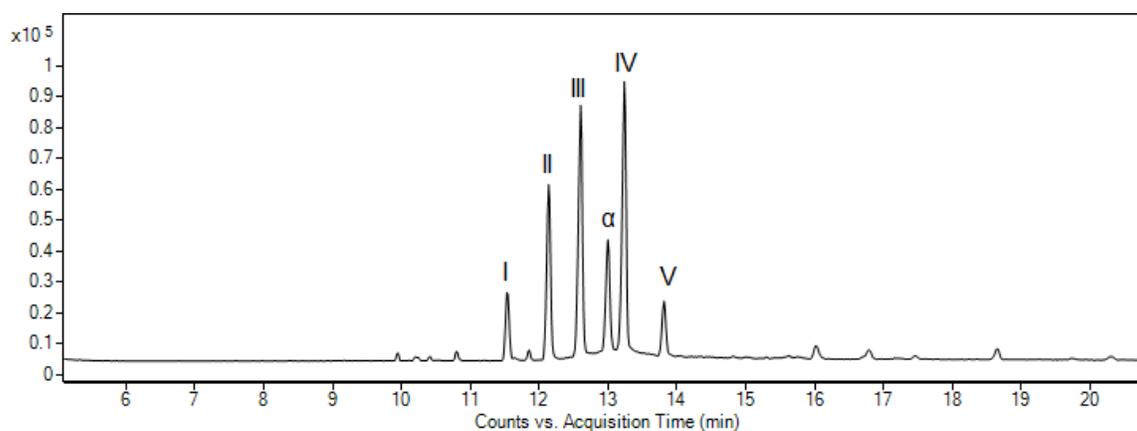


Figura 61 Cromatograma *Pinus pseudoestrobis*

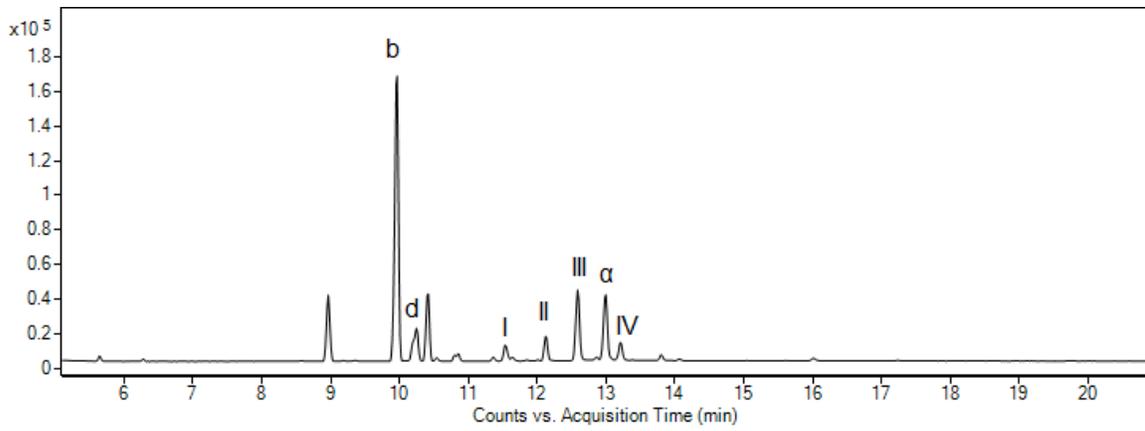


Figura 62 Cromatograma *Pinus patula*

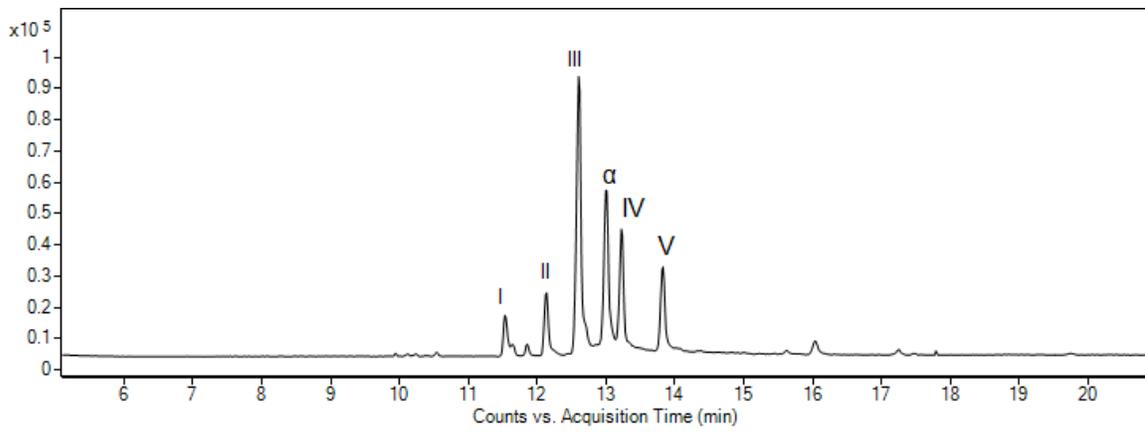


Figura 63 Cromatograma *Pinus montezumae*

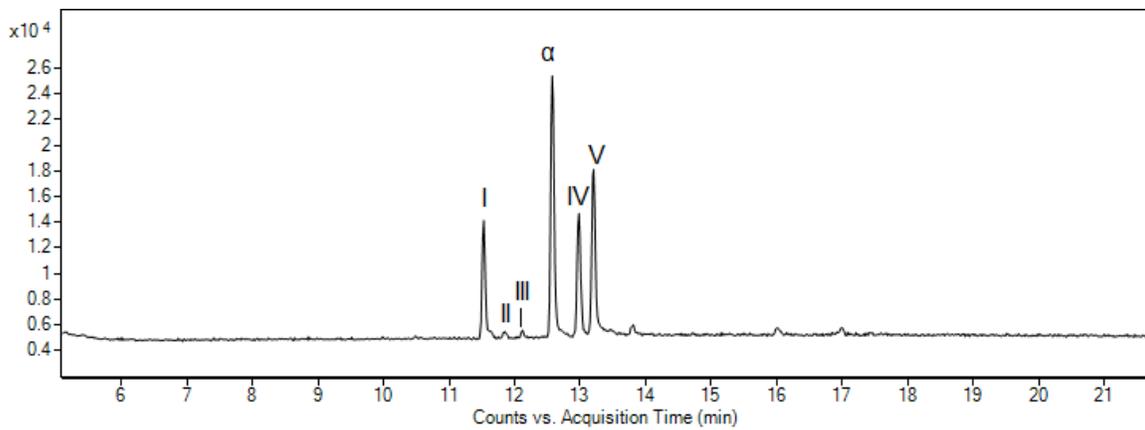


Figura 64 Cromatograma *Pinus devoniana*

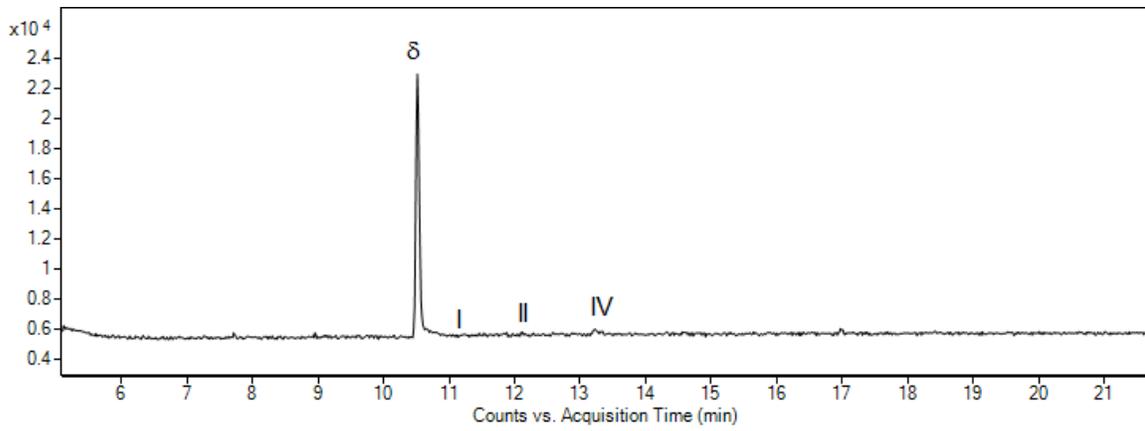


Figura 65 Cromatograma *Pinus maximartinezii*

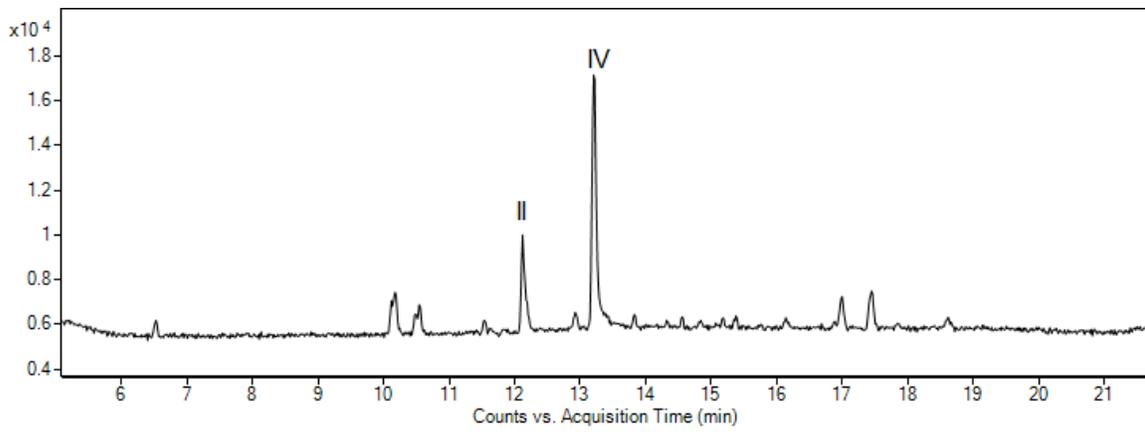


Figura 66 Cromatograma *Pinus douglasiana*

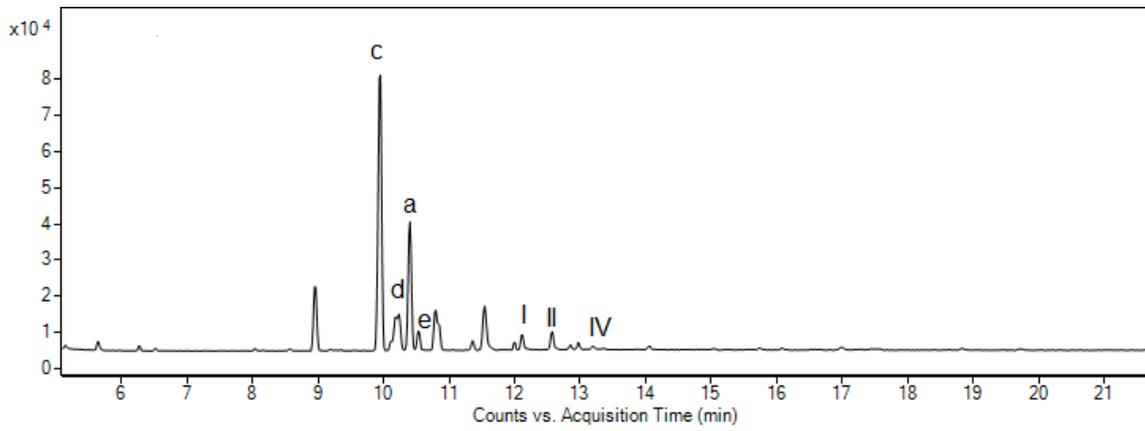


Figura 67 Cromatograma *Pinus oocarpa*

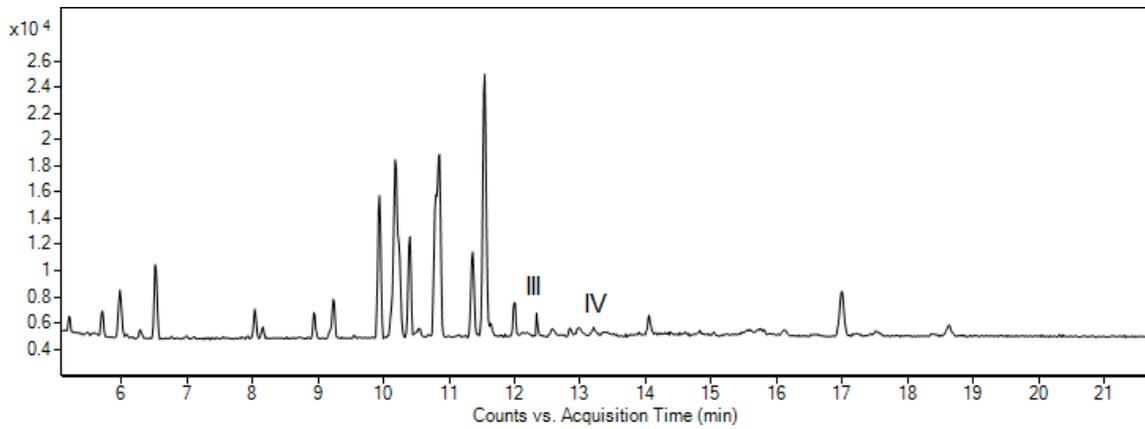


Figura 68 Cromatograma *Pinus lumholtzii*

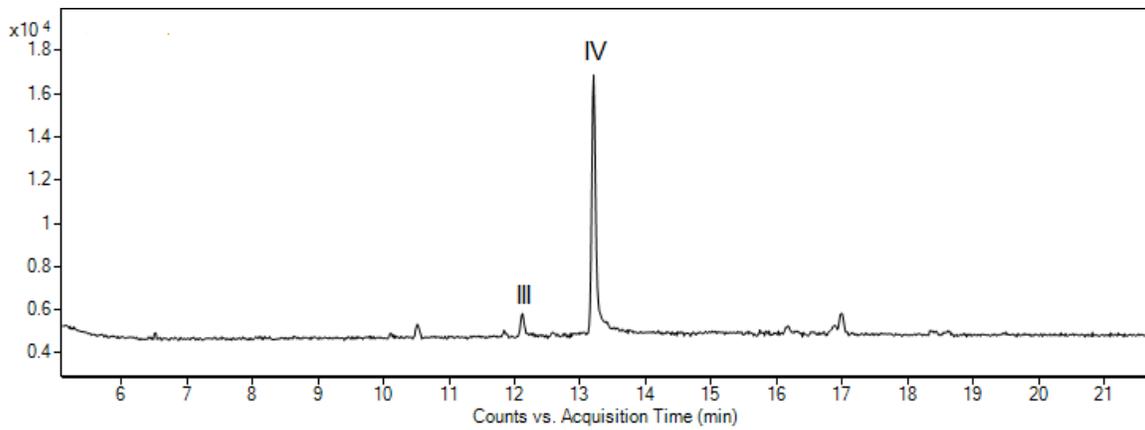


Figura 69 Cromatograma *Pinus edulis*

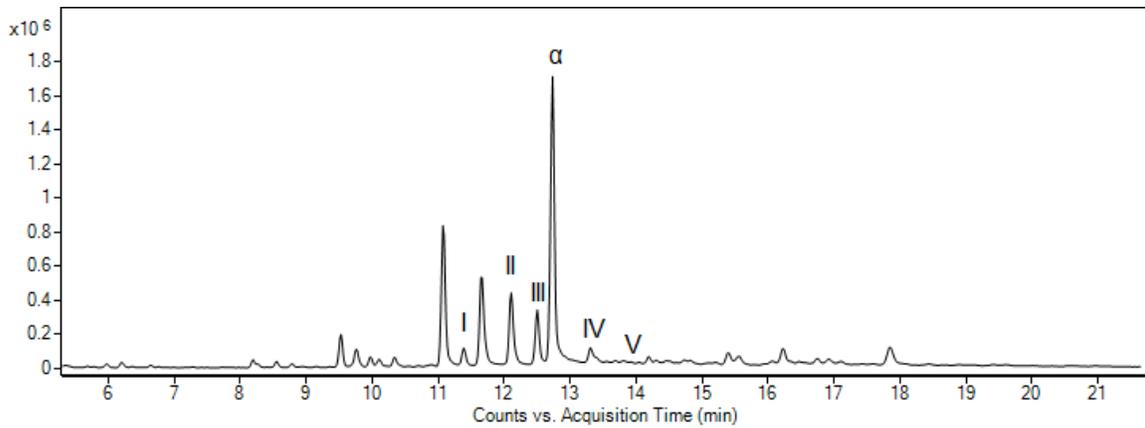


Figura 70 Cromatograma *Pinus leiophylla*

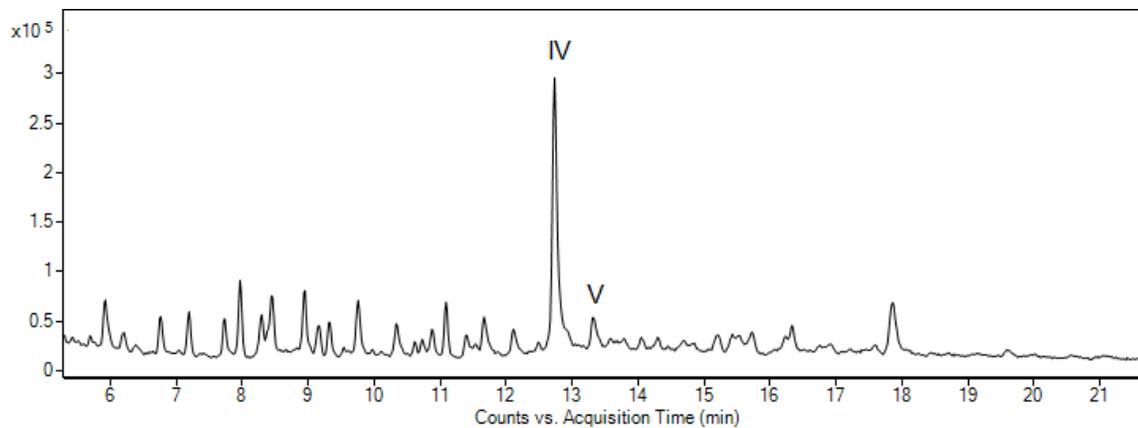


Figura 71 Cromatograma *Abies religiosa*

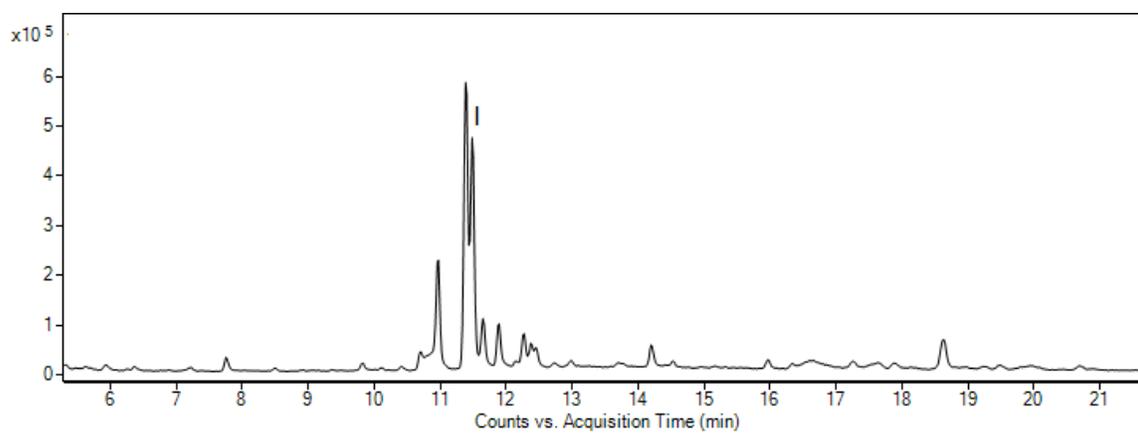


Figura 72 Cromatograma *Juniperus flaccida*

13.2.2 Cromatogramas obtenidos de resinas de pinos de muestras de origen botánico desconocido

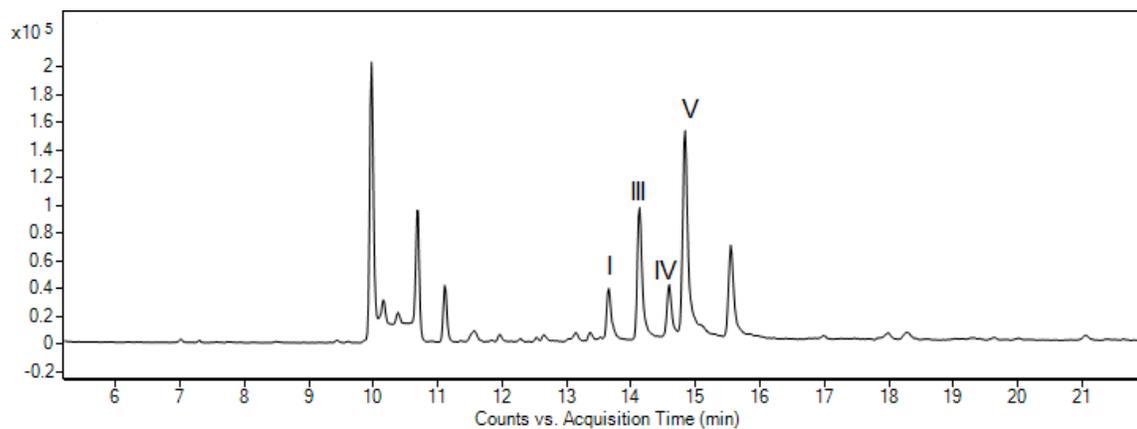


Figura 73 Cromatograma muestra Pino 1

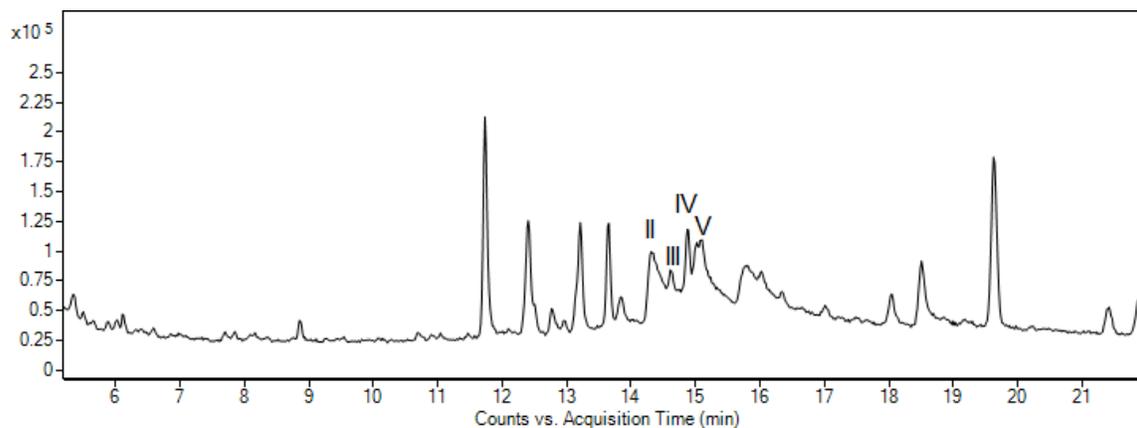


Figura 74 Cromatograma muestra Pino 2

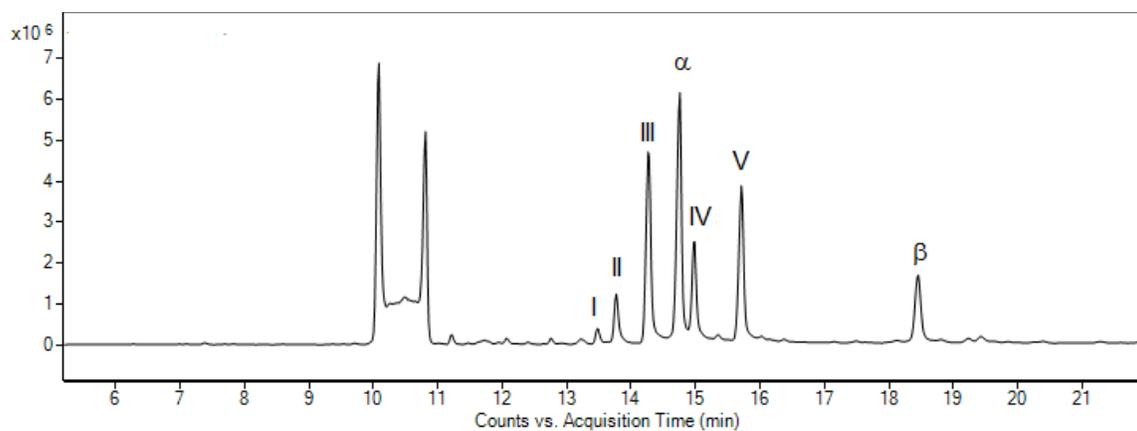


Figura 75 Cromatograma muestra Pino 3

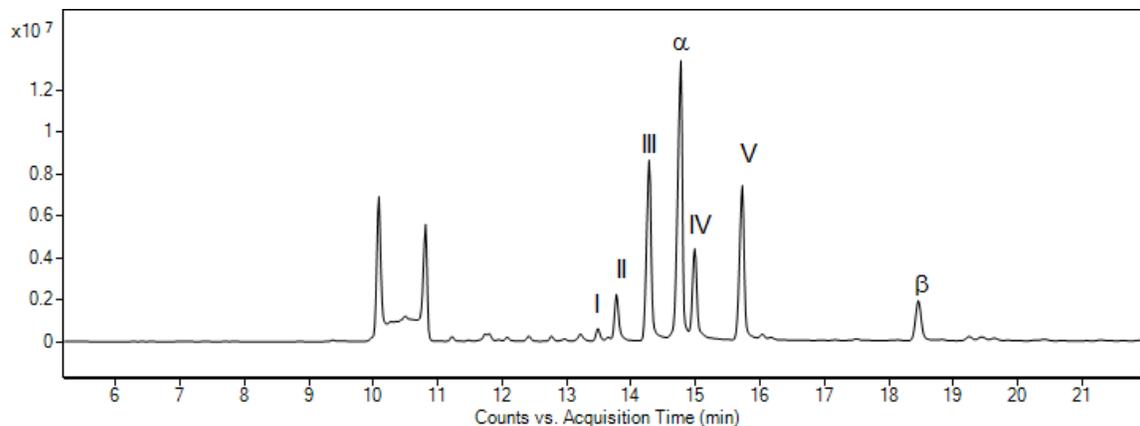


Figura 76 Cromatograma muestra Pino 4

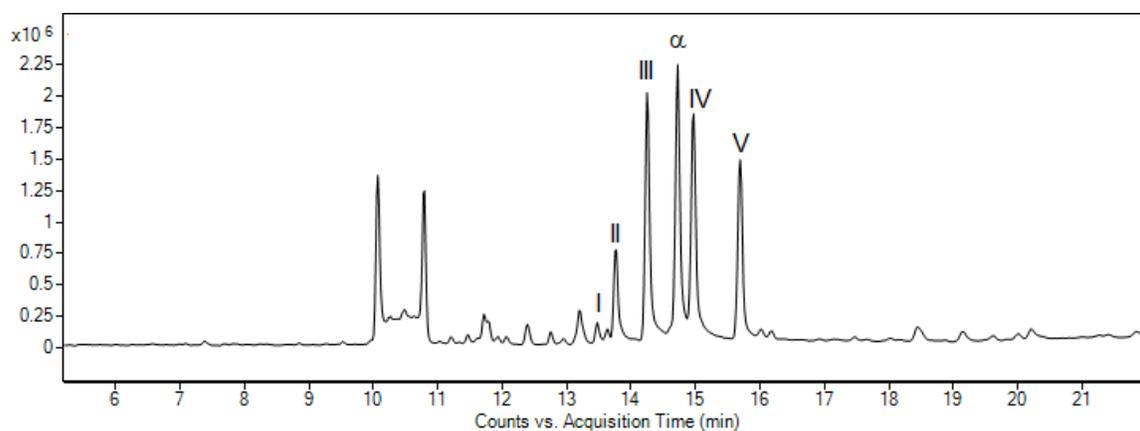


Figura 77 Cromatograma muestra Pino 5

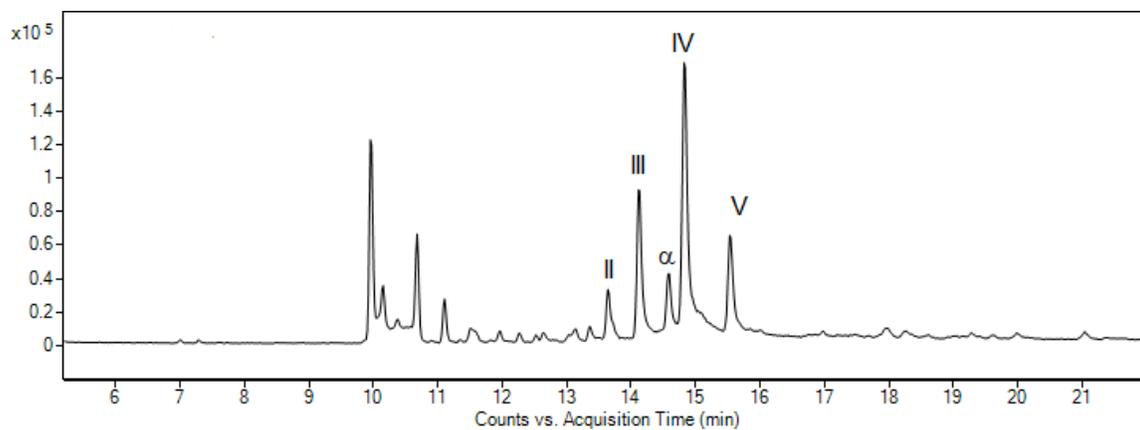


Figura 78 Cromatograma muestra Pino 6

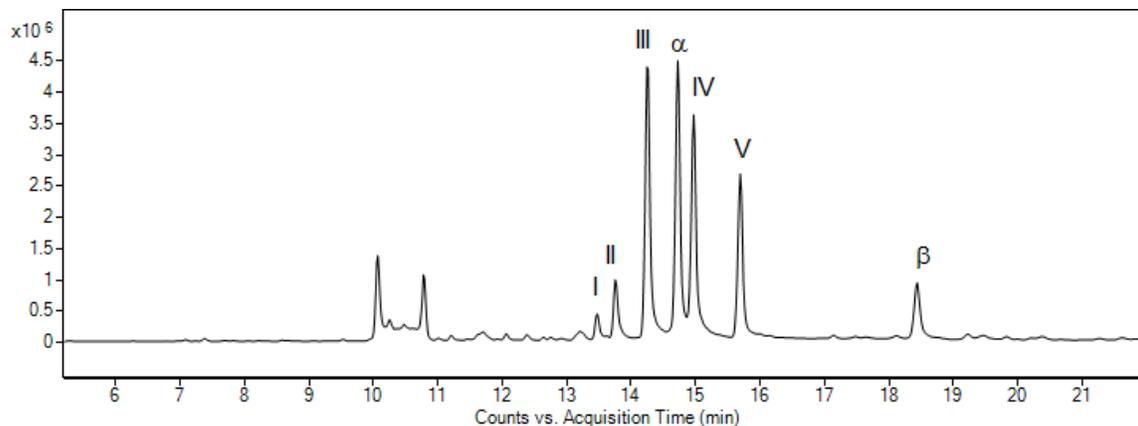


Figura 79 Cromatograma Pino 7

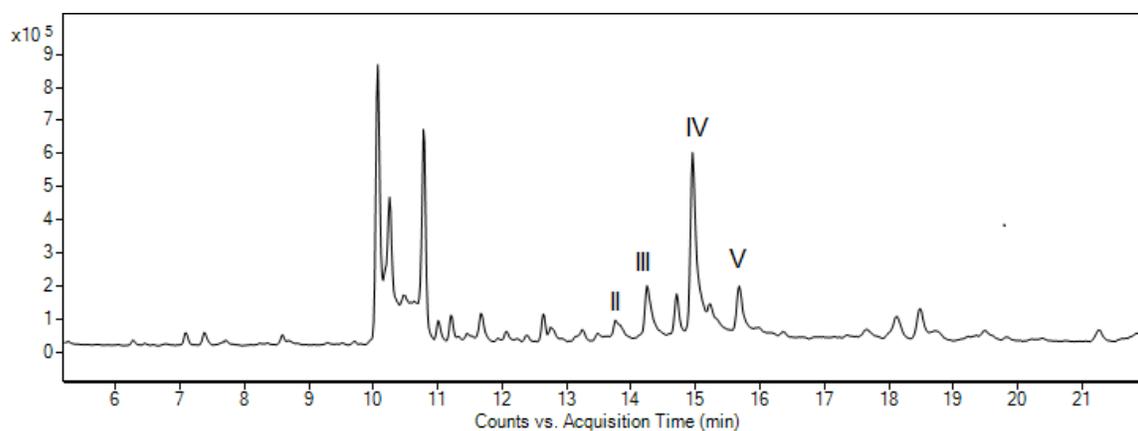


Figura 80 Cromatograma muestra Pino 8

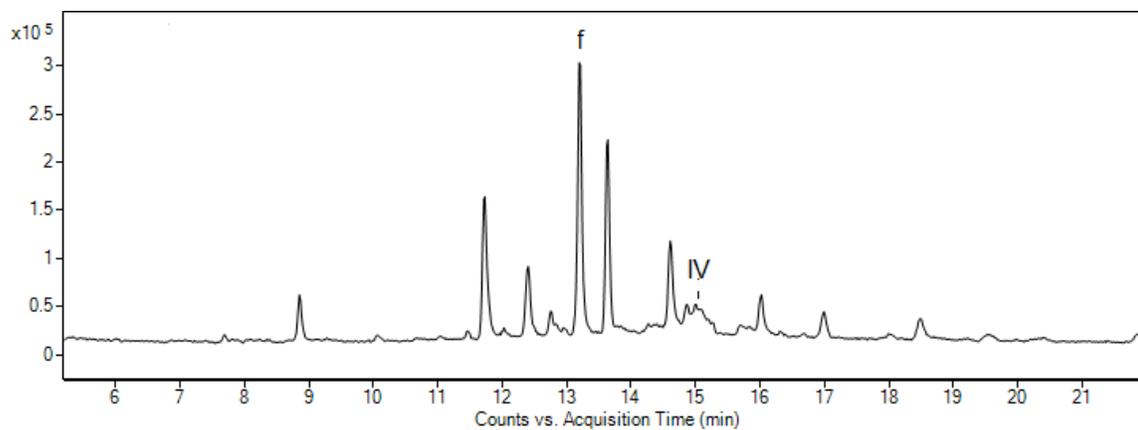


Figura 81 Cromatograma muestra Pino 9

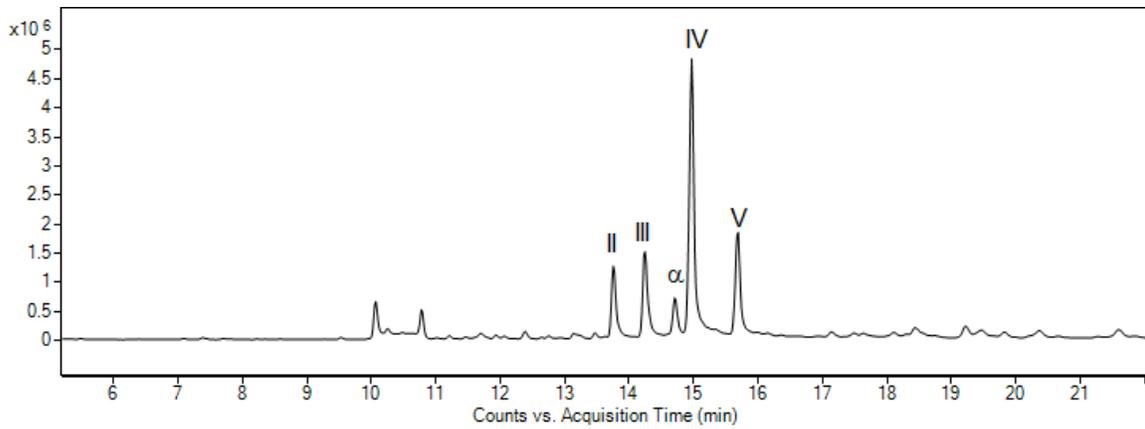


Figura 82 Cromatograma muestra Pino 10

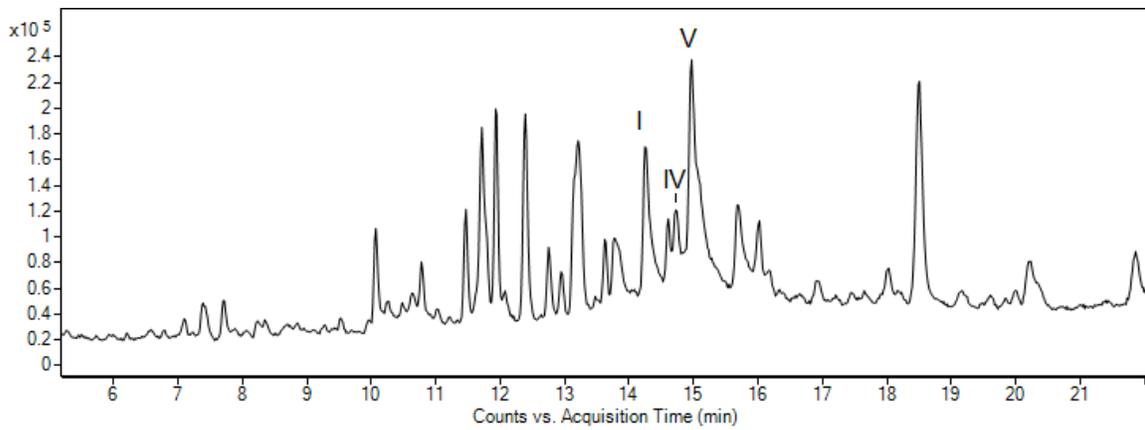


Figura 83 Cromatograma muestra Pino 11

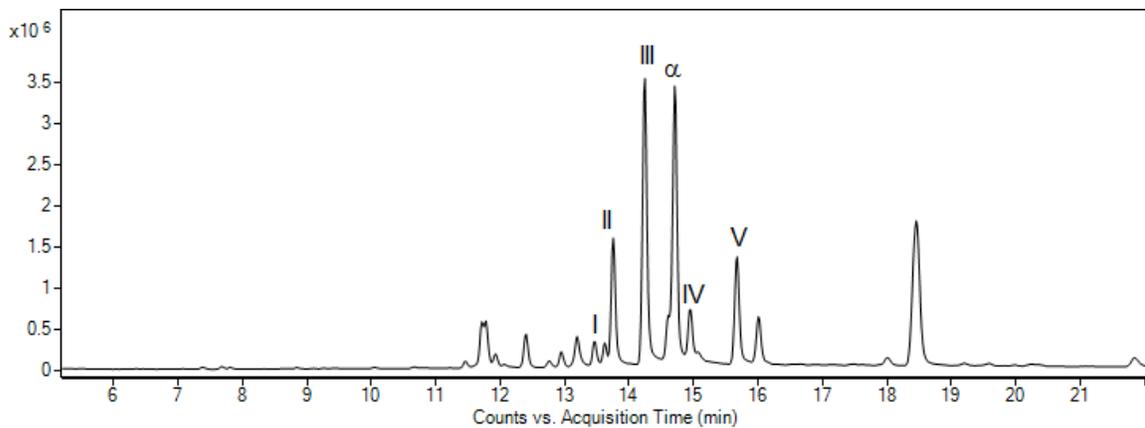


Figura 84 Cromatograma muestra Pino 12

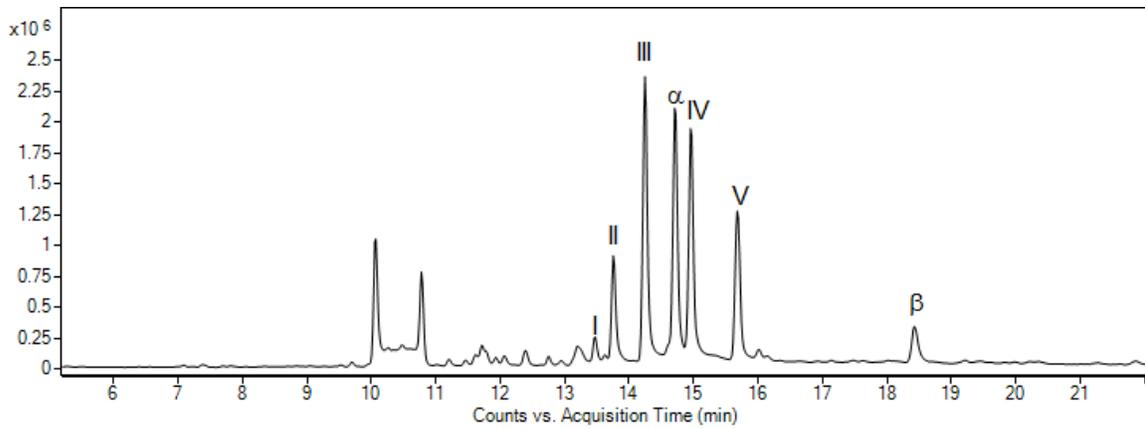


Figura 85 Cromatograma muestra Pino 13

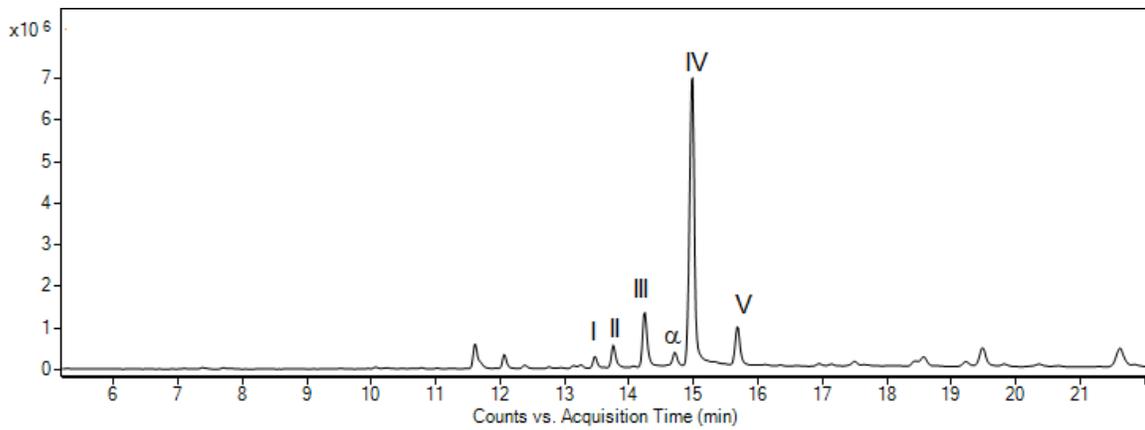


Figura 86 Cromatograma muestra Pino 14

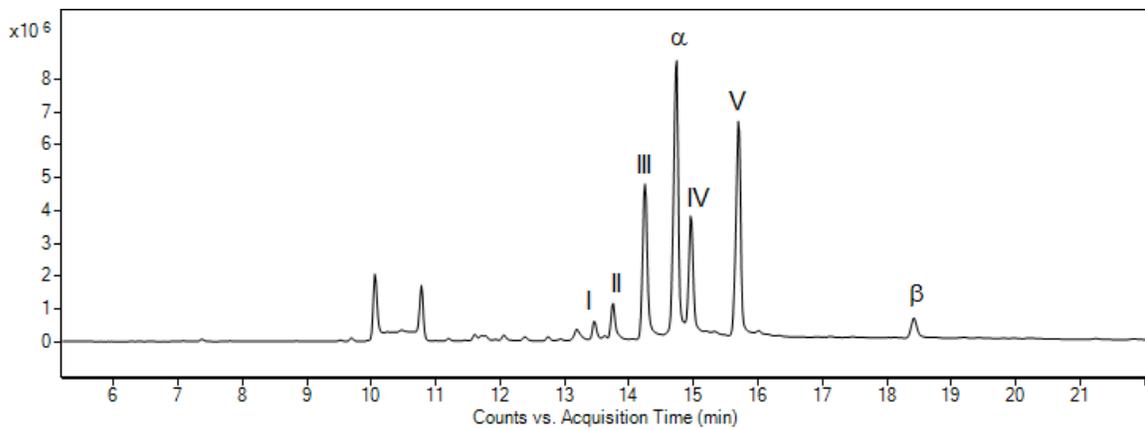


Figura 87 Cromatograma muestra Pino 15

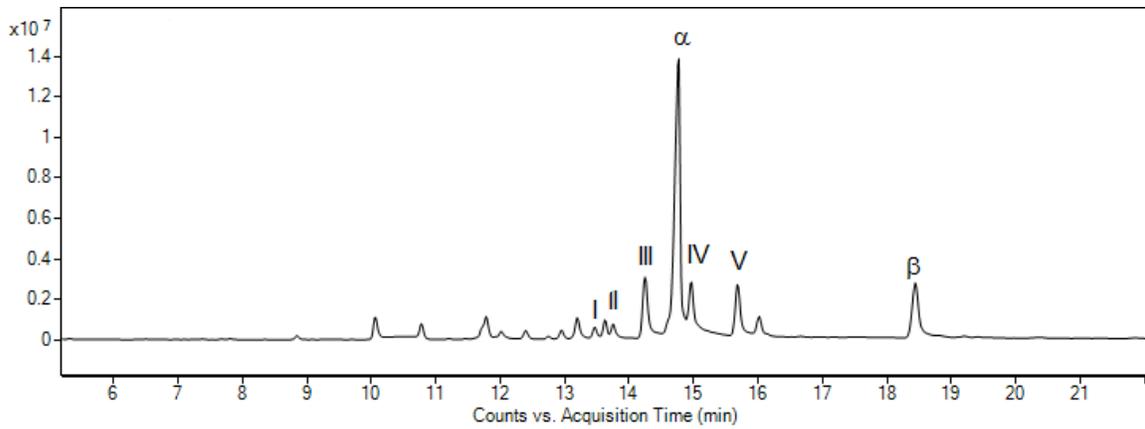


Figura 88 Cromatograma muestra Pino 16

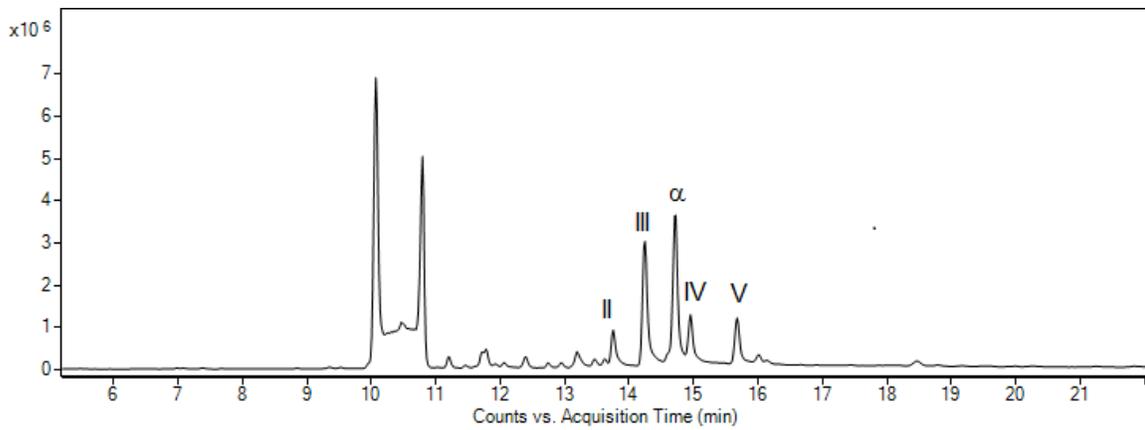


Figura 89 Cromatograma muestra Pino 17

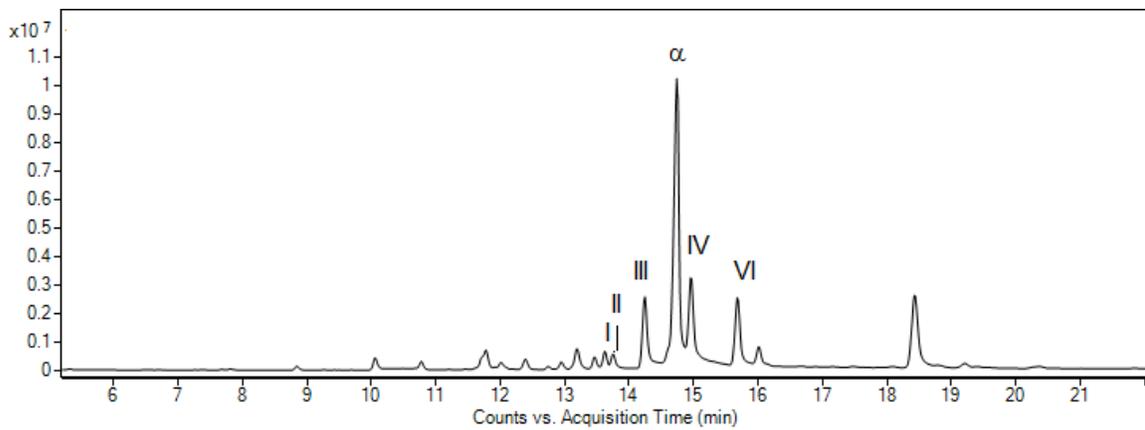


Figura 90 Cromatograma muestra Pino 18

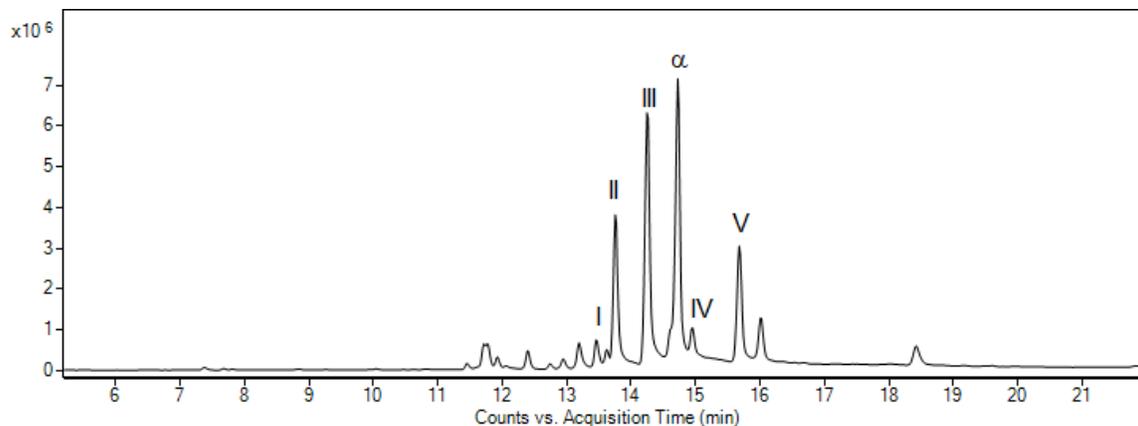


Figura 91 Cromatograma muestra Pino 19

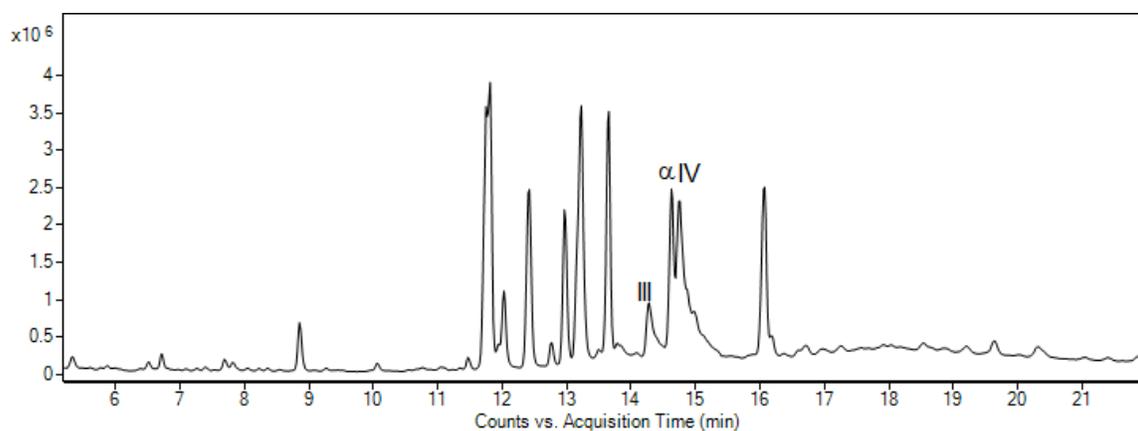


Figura 92 Cromatograma muestra Pino 20

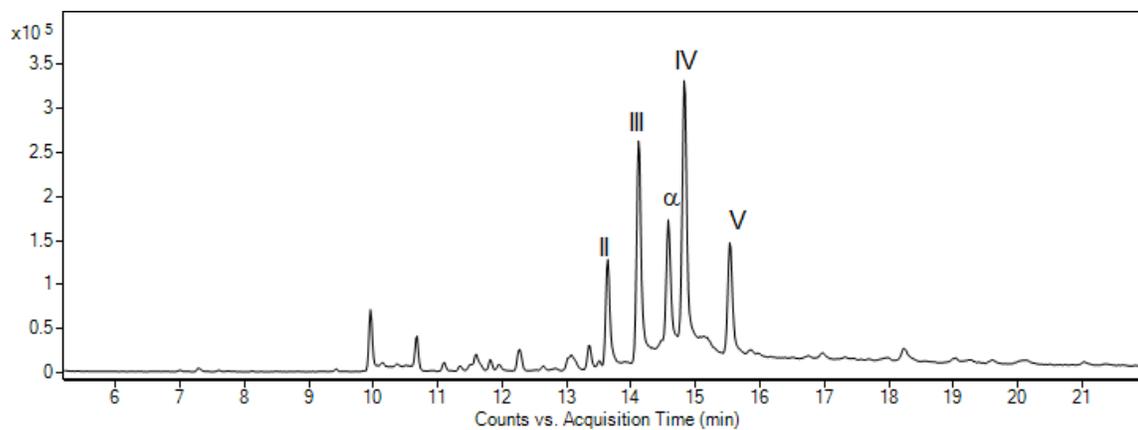


Figura 93 Cromatograma muestra Pino 21

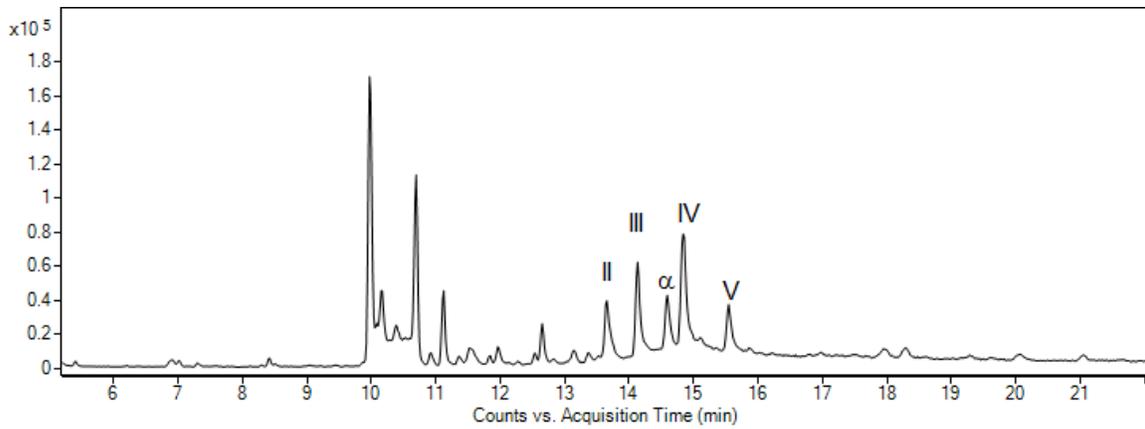


Figura 94 Cromatograma muestra Pino 22

13.2.3 Cromatogramas de resinas de origen comercial

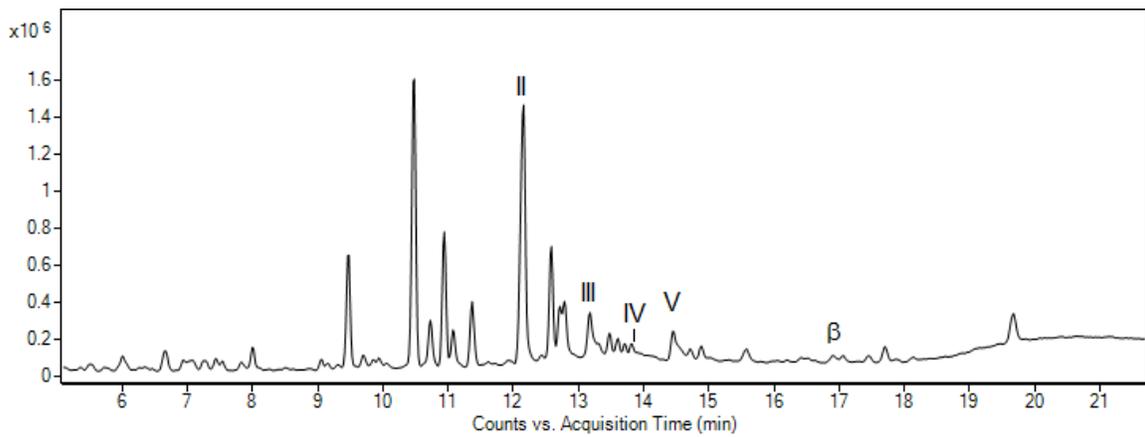


Figura 95 Cromatograma CamL1

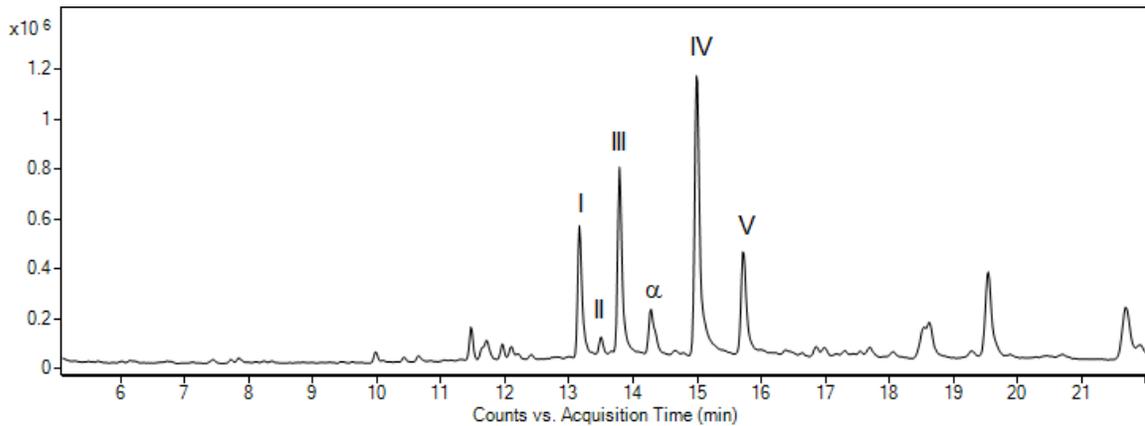


Figura 96 Cromatograma ColL2

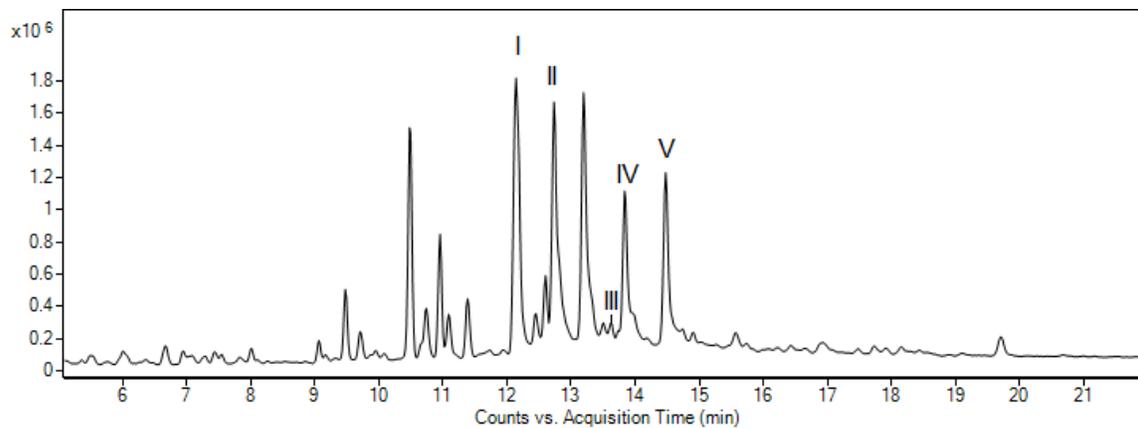


Figura 97 Cromatograma MerA1

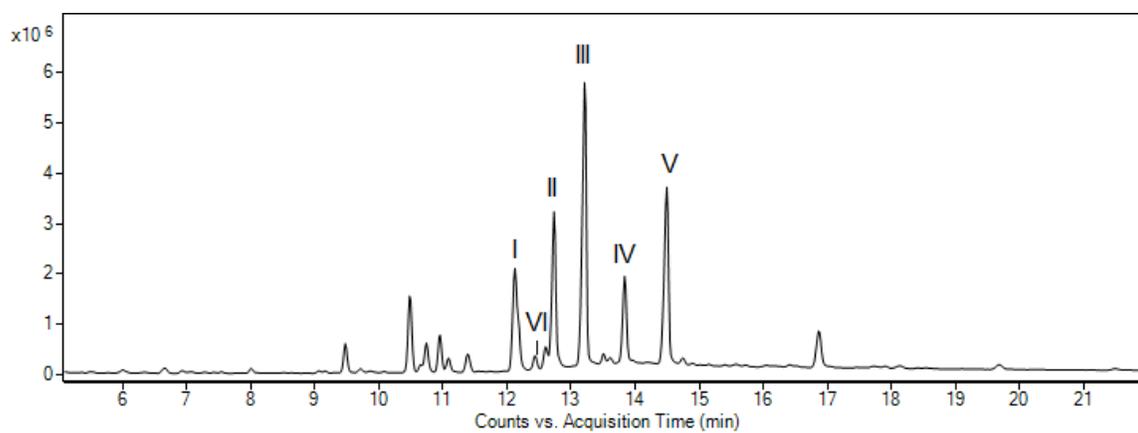


Figura 98 Cromatograma MerA2

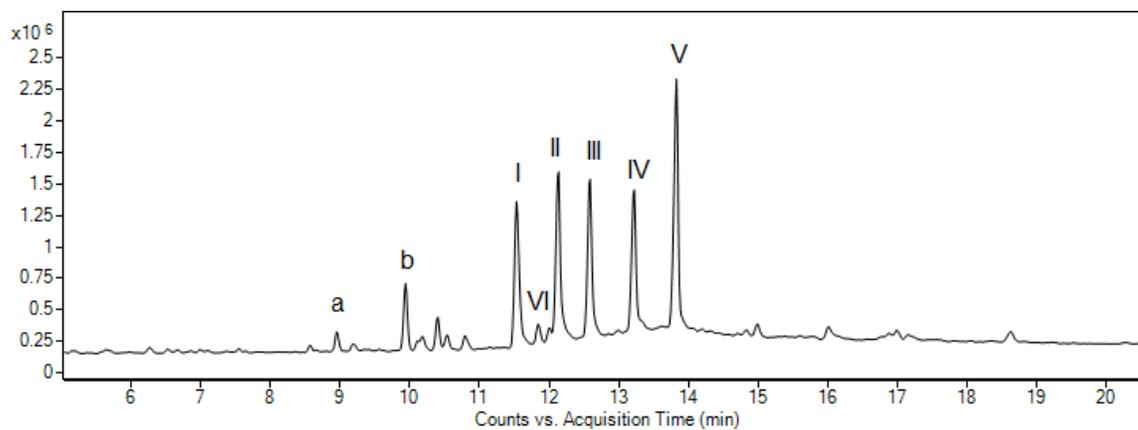


Figura 99 Cromatograma MerA3

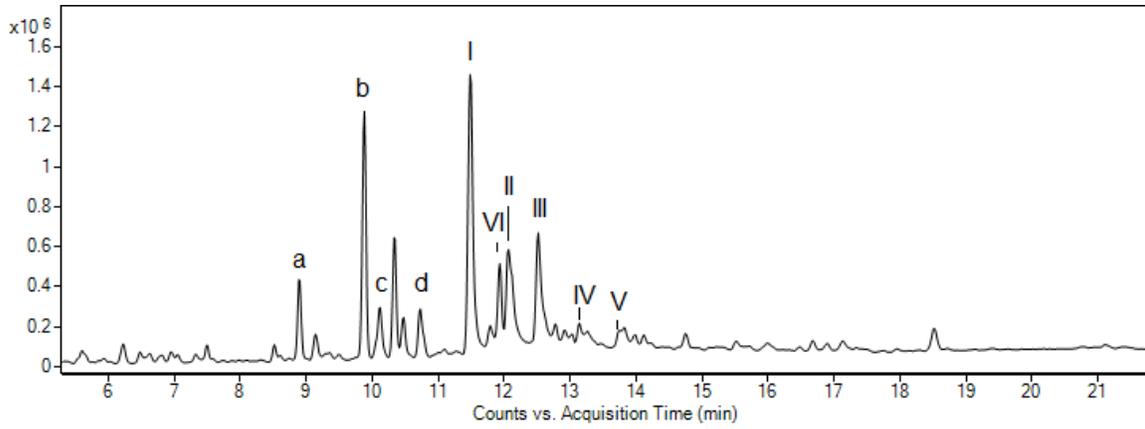


Figura 100 Cromatograma MerA4

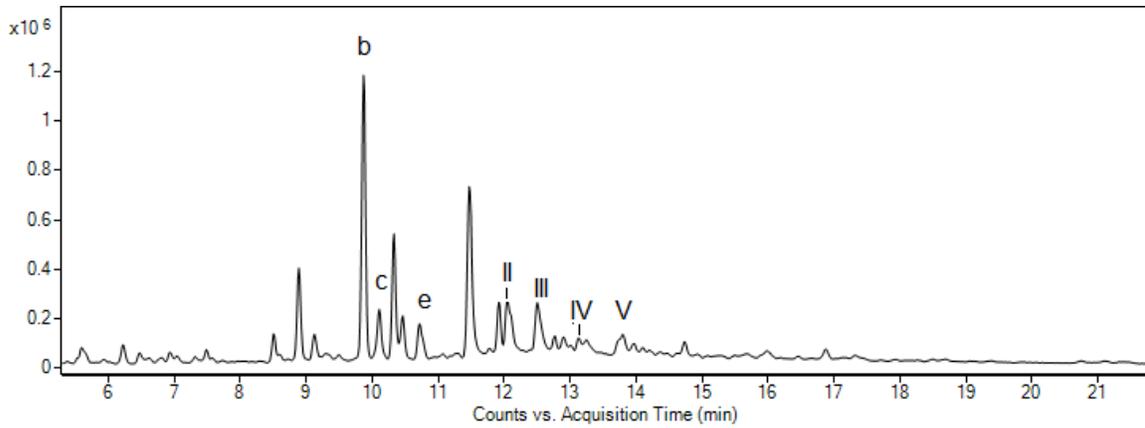


Figura 101 Cromatograma MerA5

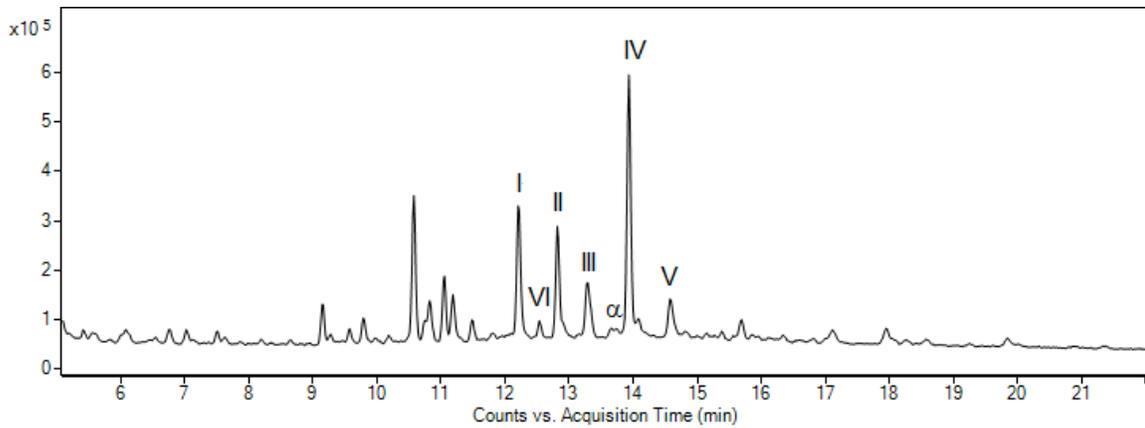


Figura 102 Cromatograma MilA1

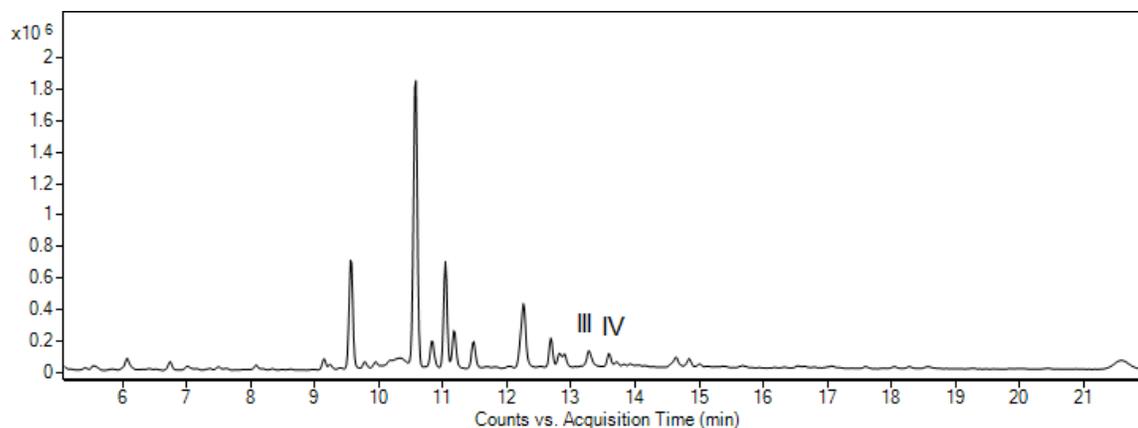


Figura 103 Cromatograma MilA2

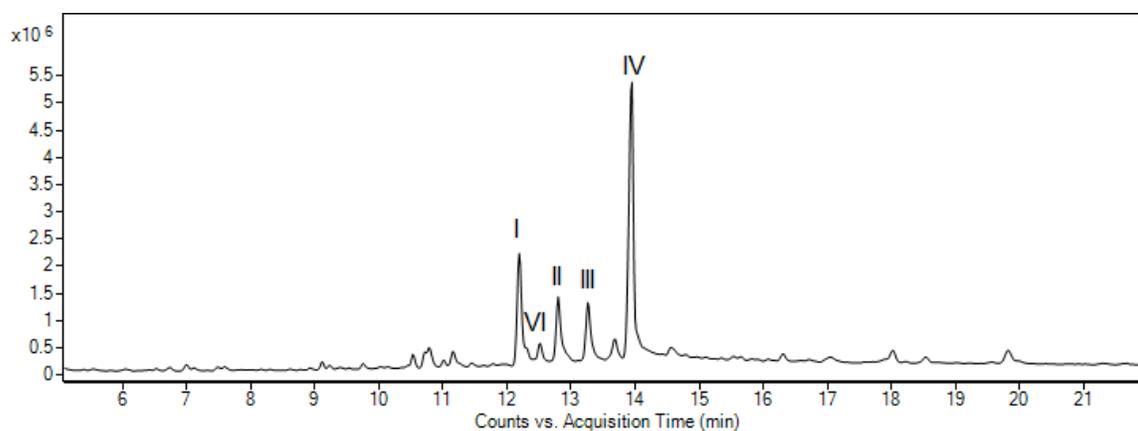


Figura 104 Cromatograma MilB2

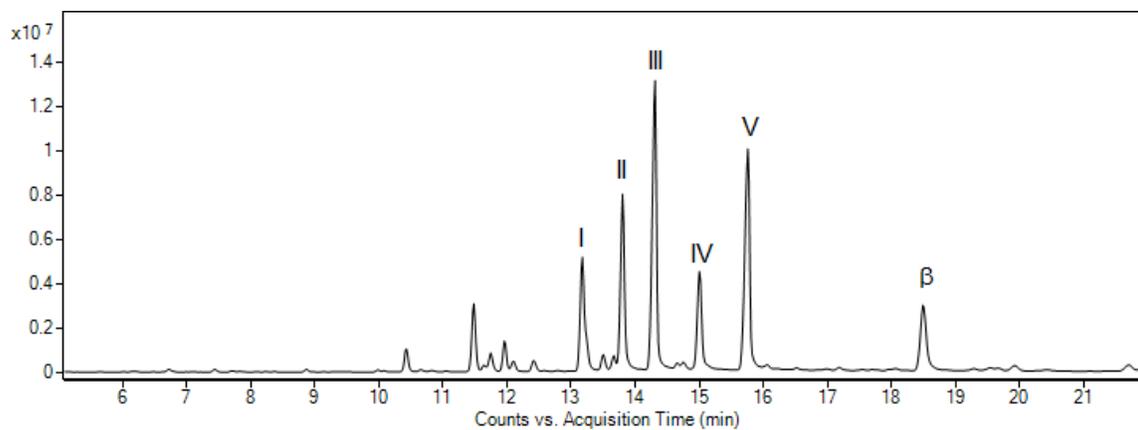


Figura 105 Cromatograma MixA1

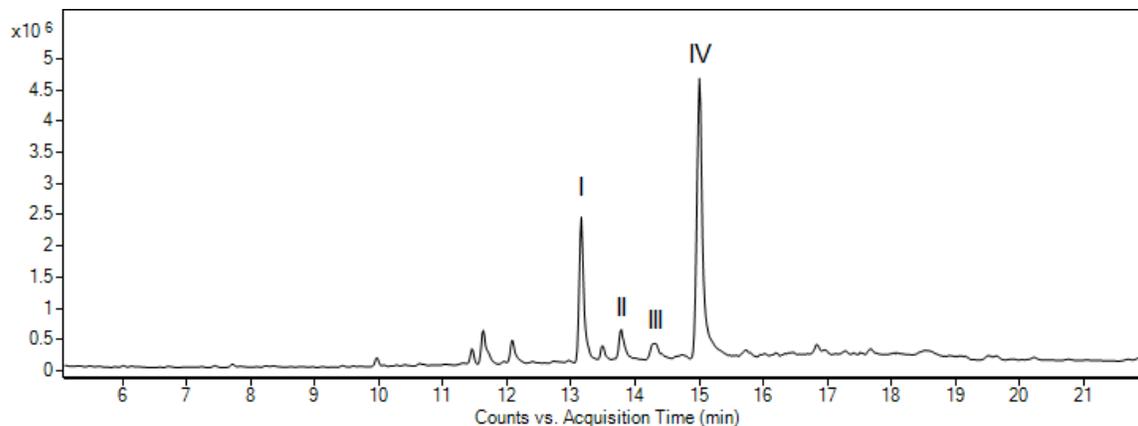


Figura 106 Cromatograma OaxC3

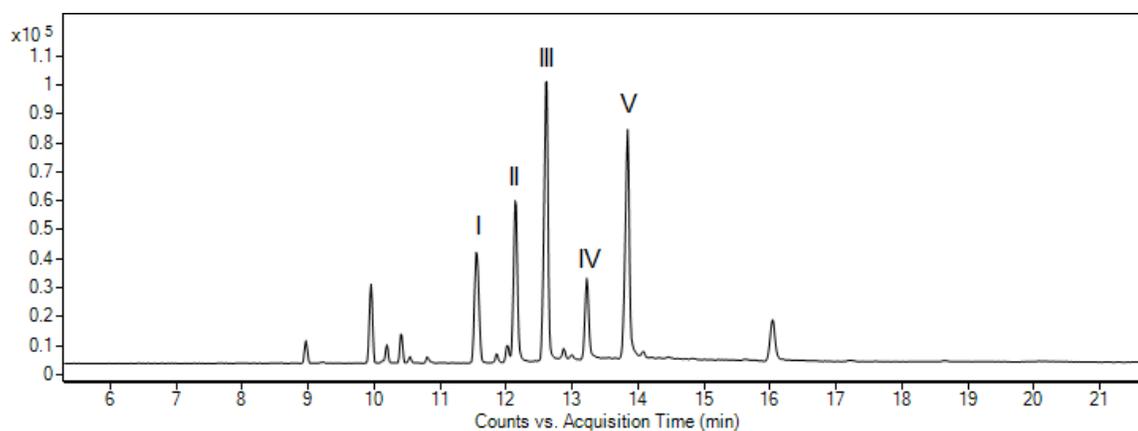


Figura 107 Cromatograma SonA1

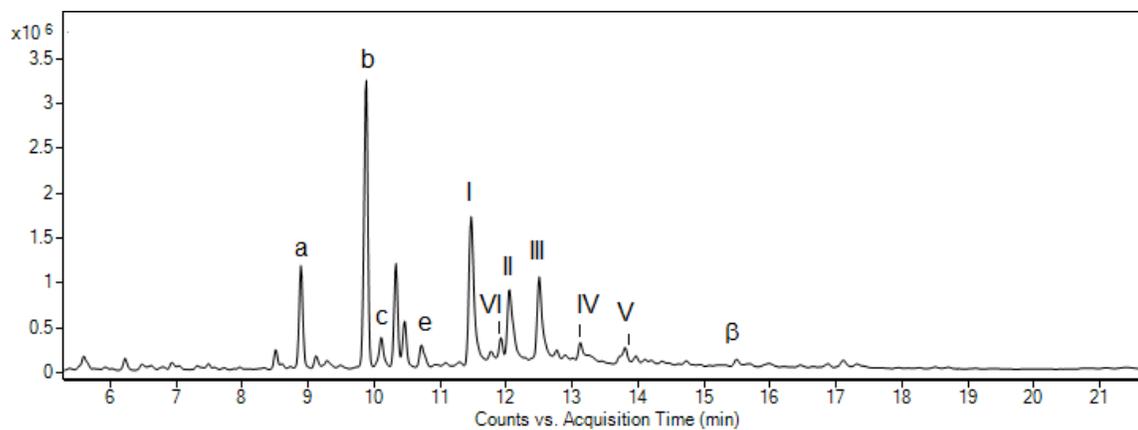


Figura 108 Cromatograma SonA2

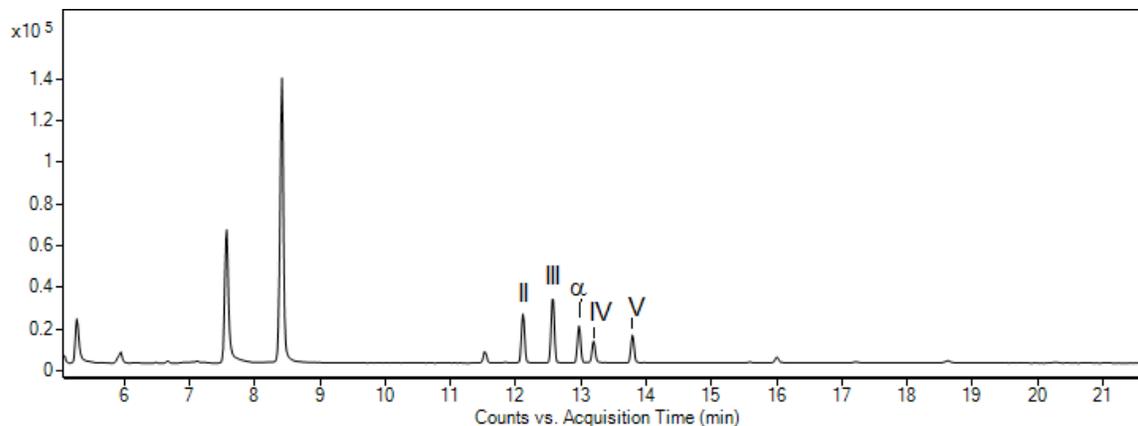


Figura 109 Cromatograma SonP1

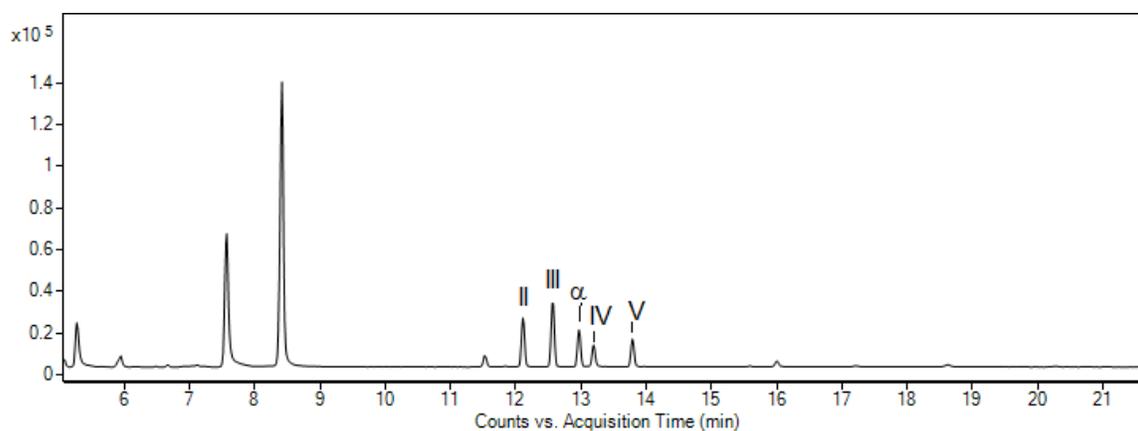


Figura 110 Cromatograma TolA1

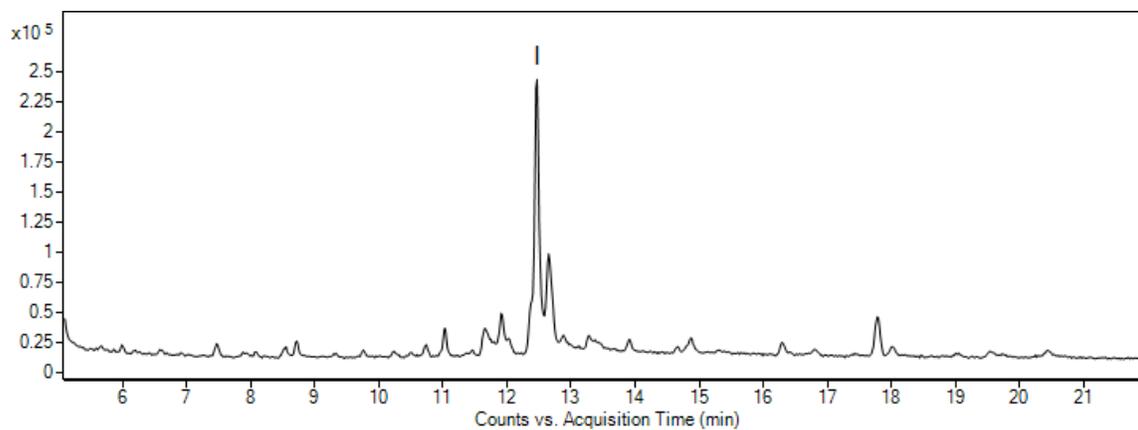


Figura 111 Cromatograma TuxA1

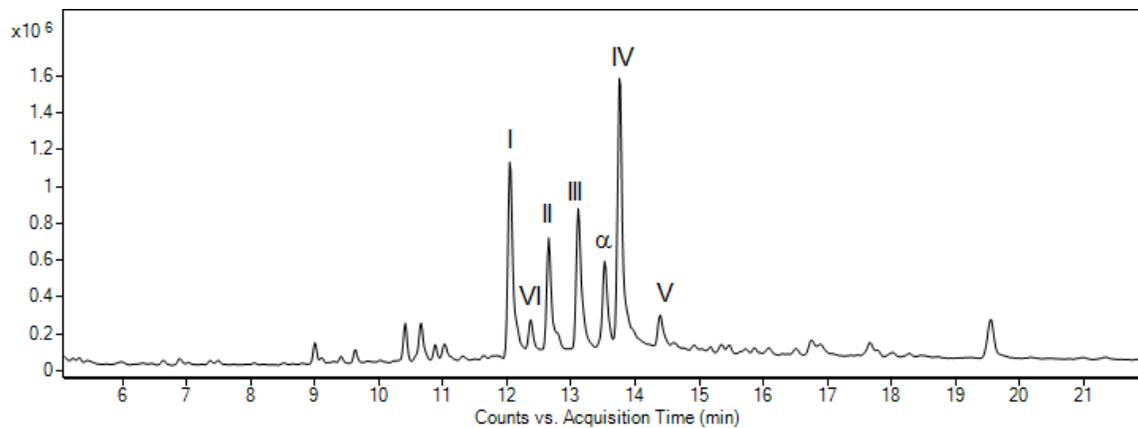


Figura 112 Cromatograma TuxA2

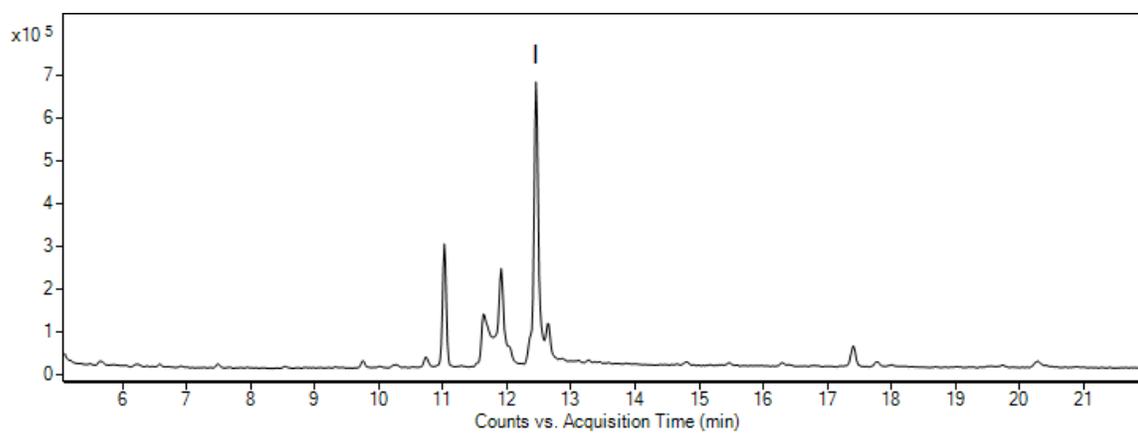


Figura 113 Cromatograma TuxA3

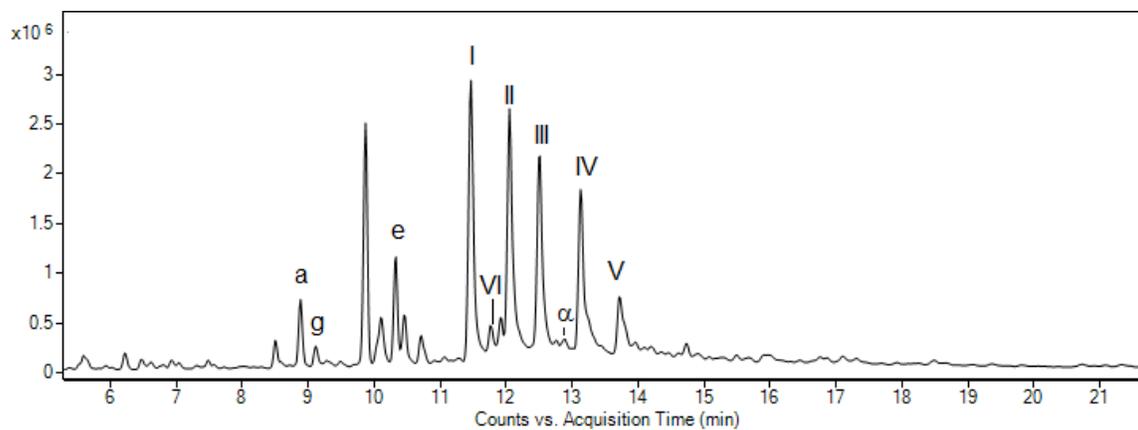


Figura 114 Cromatograma TuxA4

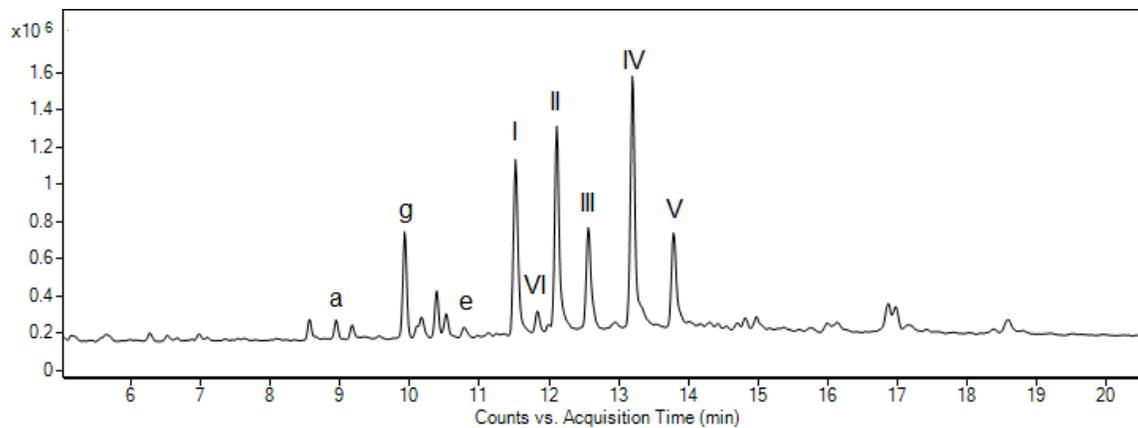


Figura 115 Cromatograma TuxA5

13.3 Anexo 3

An analytical strategy based on Fourier transform infrared spectroscopy, principal component analysis and linear discriminant analysis to suggest the botanical origin of resins from *Bursera*. Application to archaeological Aztec Samples.

**C. Piña-Torres¹, S. Nieto¹, L. Bucio², I. Belio³, R. Vega³, C. Mathe⁴, C. Vieillescazes⁴,
P. Lucero-Gómez^{1*}.**

¹ Laboratory 2-5 of Chemistry Applied to Art and Archaeology and LANCIC, Chemistry Institute, National Autonomous University of Mexico (UNAM),

² Physics Institute, National Autonomous University of Mexico (UNAM)

³ Cuerpo de Materiales, Sinaola University, Mexico

⁴ IMBE UMR, Avignon University/ CNRS/ IRD/ AMU, Restoration Engineering of Natural and Cultural Heritage, Faculty of Sciences, Avignon, France.

***Corresponding Author: Dr. P. Lucero-Gómez¹**

- Tel.: +52 55 53530415
- E-mail address: plucero@unam.mx, paola.lucero@gmail.com
- Permanent address: Laboratory 2-5 of Chemistry Applied to Art and Archaeology, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán C.P. 04510, Cd. de México.