



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Análisis cualitativo del adhesivo
natural *tzauhtli* mediante
cromatografía de gases con
detector de ionización de flama
(CG-DIF)**

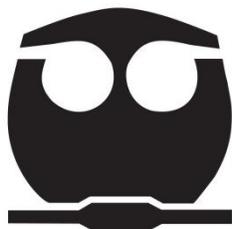
TESIS

Que para obtener el título de

Químico

PRESENTA

Alberto Fiesco Velázquez



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019



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: Profesor: José Manuel Méndez Stivalet

VOCAL: Profesor: Marisol Reyes Lezama

SECRETARIO: Profesor: Mayra León Santiago

1er. SUPLENTE: Profesor: Emely Baché Ortega

2º SUPLENTE: Profesor: Everardo Tapia Mendoza

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC), Instituto de Química UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Mayra León Santiago

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Everardo Tapia Mendoza

SUSTENTANTE:

Alberto Fiesco Velázquez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que me ha brindado en aspectos académicos, culturales y sociales. Parte del ser humano que soy, se lo debo indiscutiblemente a cada fragmento de mi vida dentro de mi alma mater.

A la Facultad de Química por ser mi segunda casa y la responsable de mi desarrollo como profesionista.

Al Instituto de Química por darme la oportunidad de realizar este proyecto y a su vez, por permitirme ser parte de una comunidad científica altamente preparada.

Se agradece el apoyo del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC) a través de los proyectos CONACYT LN279740, LN293904 y LN299076.

A mi asesora de tesis la M. en C. Mayra León Santiago por confiar en mí en todo momento, impulsarme en todos los ámbitos de mi vida y brindarme un espacio de su tiempo, compartiendo su vasto conocimiento y experiencia en el desarrollo de este trabajo.

Al resto de los miembros del laboratorio donde tuve la oportunidad de trabajar, LANCIC-IQ. Al Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez, La Dra. Marisol Reyes Lezama y el M. en C. Everardo Tapia Mendoza, por cada comentario para el progreso de mi aprendizaje, por la compañía tan agradable y las historias que voy a recordar.

A la Maestra en Restauración Lilian García-Alonso Alba y al Dr. José Luis Ruvalcaba Sil miembros de LANCIC-IF, por proporcionarme los materiales naturales y las piezas de patrimonio cultural, para llevar a cabo mi investigación.

A la Dra. Celia Bustos Brito y al Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, por su apoyo en el uso de equipos para el desarrollo de este trabajo.

A los académicos de la Facultad de Química que resaltaron mis habilidades y siempre estuvieron al pendiente de mi avance en la carrera: Q. Mercedes Guadalupe Llano Lomas, M. en C. Mónica Paredes Farfán y el M. en C. Paulino Guillermo Zeron Espinosa.

Los productos de esta investigación se muestran a continuación:

- Alberto Fiesco Velázquez, Mayra León Santiago, Baldomero Esquivel Rodríguez, Everardo Tapia Mendoza y Marisol Reyes Lezama. **Identificación de carbohidratos en orquídeas mexicanas utilizando cromatografía de gases con detección de ionización de flama (CG-DIF) para caracterizar el adhesivo natural "tzauhtli"**. En XXII Congreso Nacional de Química Analítica: 12-14 de junio del 2019. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí.

- Alberto Fiesco Velázquez, Mayra León Santiago, Baldomero Esquivel Rodríguez, José Luis Ruvalcaba y Lilian García-Alonso Alba. **Identificación de carbohidratos en orquídeas mexicanas utilizando cromatografía de gases con detección de ionización de flama (CG-DIF)**. En Simposio del Instituto de Química: 19-21 de junio del 2019. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Índice

Abreviaturas	7
Índice de tablas	8
Índice de figuras	9
Introducción	11
Objetivos	13
Hipótesis	14
Capítulo 1 . Antecedentes	15
1.1 Ciencia de la conservación	15
1.2 Técnicas analíticas como apoyo en la restauración	16
1.3 Materiales filmógenos	17
1.3.1 Adhesivos y adhesión	18
1.3.2. Gomas y mucílagos	19
1.4 Familia <i>Orchidaceae</i> en México	20
1.4.1 Características morfológicas de las orquídeas	21
1.4.2 Usos de la orquídea	23
1.5 Adhesivo en instrumentos musicales de cuerda	24
1.5.1 El <i>tzácuhtli</i>, <i>tzaucitli</i> o <i>tzauhtli</i>	26
1.5.1.1 Usos del <i>tzauhtli</i>	27
1.6 Química de los carbohidratos	28
1.6.1 Polisacáridos	34
1.6.1.1 Análisis de estructuras de polisacáridos	34
1.7 Cromatografía de gases	35
1.7.1 Derivatización de carbohidratos	36
1.7.2 Instrumentación	38
1.8 Parámetros cromatográficos	44
Capítulo 2 . Metodología experimental	48
2.1 Disolventes y reactivos	48
2.2 Estándares	48

2.3 Equipos e Instrumentos	48
2.4 Muestras de pseudobulbos de orquídeas y gomas	49
2.5 Muestras de patrimonio cultural	50
2.6 Sistema cromatográfico	51
2.7 Método cromatográfico para el análisis de carbohidratos	52
2.8 Controles	53
2.9 Evaluación de la precisión del método	53
2.10 Preparación de las muestras	53
2.10.1 Preparación de las disoluciones	53
2.10.2 Obtención de los derivados sililados de los estándares	54
2.10.3 Extracción e hidrólisis parcial de polisacáridos en orquídeas	54
2.10.4 Extracción e hidrólisis parcial de polisacáridos en muestras de patrimonio cultural	56
2.10.5 Extracción e hidrólisis parcial de polisacáridos en gomas	57
Capítulo 3 . Resultados y discusión	58
3.1 Evaluación del sistema cromatográfico	58
3.2 Controles	58
3.3 Análisis cromatográfico de los estándares de carbohidratos	59
3.4 Precisión del método	65
3.5 Muestras de pseudobulbos de orquídeas	66
3.6 Comparación del perfil cromatográfico de un pseudobulbo "joven" y uno "maduro"	70
3.7 Muestras de patrimonio cultural	72
Laúd de la colección "Gran Nayar"	72
Laúd huichol de madera de pino "Kanari Wixarika"	75
3.8 Análisis de gomas	78
Conclusiones	81
Perspectivas	83
Referencias bibliográficas	84

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
LANCIC	Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural
ICC	<i>International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works</i>
CG	Cromatografía de gases
CL	Cromatografía de líquidos
CG-DIF	Cromatografía de gases con detector de ionización de flama
CG-EM	Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
TMS	Trimetilsilano
HDMS	Hexametildisilazano
TFA	Ácido trifluoroacético
Ox-TMS	Oxima trimetilsilano
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
Py	Piridina
ENCRyM	Escuela Nacional de Conservación, Restauración y Museografía
STOCRIM	Seminario Taller de Conservación y Restauración de Instrumentos Musicales
SLP	San Luis Potosí
AP	Alta pureza
M	Monosacáridos
D	Disacáridos
T	Trisacáridos

Índice de tablas

Tabla	Descripción	Página
1	Reacciones generales de los carbohidratos	32
2	Listado de algunos detectores y el tipo de compuestos analizados	43
3	Parámetros cromatográficos calculados para la evaluación del sistema	58
4	Tiempo de retención correspondientes a los estándares de azúcares derivatizados	65
5	Porcentaje de área de las regiones de carbohidratos de las tres orquídeas	69
6	Carbohidratos identificados en las 3 especies de orquídeas estudiadas	70

Índice de figuras

Figura	Descripción	Página
1.0	Interacción de las fases en el fenómeno de adherencia	19
1.1	Esquema de la morfología de una orquídea	22
1.2	<i>Bletia campanulata</i>	23
1.3	<i>Laelia speciosa</i>	23
1.4	<i>Cyrtopodium macrobulbon</i>	23
1.5	<i>Cattleya</i>	24
1.6	<i>Cymbidium</i>	24
1.7	Jarana huasteca	25
1.8	San Francisco en oración	26
1.9	Fabricantes de pegamento, código Florentino	28
2.0	Ejemplos de algunas cetosas y aldosas	29
2.1	Representaciones tridimensionales y proyecciones de Fischer para los enantiómeros del gliceraldehído	30
2.2	Representación de la forma piranosa de la glucosa y furanosa de la fructosa	31
2.3	Equilibrio de mutarrotación	30
2.4	Conformaciones de silla para los anómeros de la glucosa	32
2.5	Fragmento de la estructura de la celulosa	34
2.6	Esquema de reacción general de la sililación	36
2.7	Reactivos para sililación	37
2.8	Esquema de reacción para la derivatización de la glucosa	38
2.9	Esquema general de los componentes de un cromatógrafo de gases	39
3.0	Sección transversal típica de un inyector <i>split/splitless</i>	40
3.1	Fases estacionarias más utilizadas en CG	42
3.2	Diagrama representativo de un detector de ionización de flama	44
3.3	Pseudobulbos de: A) <i>Bletia campanulata</i> , B) <i>Laelia speciosa</i> y C) <i>Cyrtopodium macrobulbon</i>	50
3.4	Cromatógrafo de gases <i>Agilent 7890B</i> , utilizado en el análisis experimental	52
3.5	Programa de temperatura para el método cromatográfico	52
3.6	Pseudobulbos limpios de: A) <i>Bletia campanulata</i> , B) <i>Laelia speciosa</i> y C) <i>Cyrtopodium macrobulbon</i>	54
3.7	Mucílago de <i>Cyrtopodium macrobulbon</i> seco	55
3.8	Laúd de la colección "El gran Nayar" (derecha), muestras tomadas para el análisis (izquierda)	56
3.9	Muestra laúd madera de pino "Kanari Wixarika"	56
4.0	Cromatogramas de los blancos evaluados	59
4.1	Cromatograma del derivado Ox-TMS de arabinosa	60
4.2	Cromatograma del derivado Ox-TMS de fructosa	60

4.3	Cromatograma del derivado Ox-TMS de glucosa	61
4.4	Cromatograma del derivado Ox-TMS de galactosa	61
4.5	Cromatograma del derivado de sacarosa	63
4.6	Cromatograma del derivado de rafinosa	63
4.7	Cromatograma correspondiente de una disolución de los estándares derivatizados	64
4.8	Perfiles cromatográficos de la especie <i>C. macrobulbon</i>	66
4.9	Perfiles cromatográficos de las orquídeas estudiadas	68
5.0	Comparación de los perfiles cromatográficos de los pseudobulbos de la especie <i>B. campanulata</i>	71
5.1	Comparación de perfiles cromatográficos para las dos regiones de análisis de la muestra de laúd Gran Nayar	73
5.2	Comparación de perfiles de orquídeas con la muestra de laúd Gran Nayar	74
5.3	Comparación de los cromatogramas de orquídeas con la muestra de laúd Kanari Wixarika	76
5.4	Comparación de los perfiles cromatográficos de laudes	77
5.5	Comparación de los perfiles cromatográficos de gomas	78

Introducción

La Química, Física, Historia, Arqueología e Historia del Arte son distintos campos del conocimiento que ayudan para identificar los materiales de los que están hechos los bienes que forman parte del patrimonio cultural. Además de la identificación de los materiales, su análisis ayuda a la conservación de dichos bienes.

Ejemplo de estos materiales es el *tzauhtli*, que es el mucílago extraído de los pseudobulbos de orquídeas, utilizado durante las épocas prehispánicas y colonial como adhesivo y aglutinante para realizar mosaicos de pluma y otros trabajos artísticos. En la actualidad existen reportes, que diferentes etnias de México siguen utilizando el mucílago de orquídeas en la construcción y reparación de instrumentos musicales de cuerda.

Este estudio buscó caracterizar el mucílago sin tratamiento previo alguno, de 3 orquídeas: *Bletia campanulata*, *Laelia speciosa* y *Cyrtopodium macrobulbon*. Se hizo un análisis cualitativo de los carbohidratos del mucílago, mediante cromatografía de gases.

Para ello se trabajó primero con la orquídea *Bletia campanulata*, para reproducir y comparar con el método de referencia (desde la preparación de la muestra hasta el análisis por cromatográfico). Una vez que se adaptó el método, se estudiaron las otras dos especies de orquídeas: *L. speciosa* y *C. macrobulbon*. Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de las tres orquídeas y finalmente se aplicó el método de análisis a un par de muestras de instrumentos musicales que probablemente fueron pegados utilizando *tzauhtli*.

Este proyecto de tesis se distingue de otros por trabajar de manera multidisciplinaria con especialistas de las ciencias exactas y las humanidades. Fue desarrollado en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural sede Instituto de Química (LANCIC-IQ),

Las dependencias universitarias que participan en este tipo de proyectos son el Instituto de Investigaciones Estéticas, el Instituto de Física, el Instituto de Química y el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), estas instancias académicas se encargan del manejo, gestión, estudio, protección y conservación del patrimonio cultural de México.

Objetivos

Objetivo general:

- Obtener el perfil cromatográfico de los carbohidratos provenientes del mucílago de las orquídeas *Cyrtopodium macrobulbon*, *Bletia campanulata* y *Laelia speciosa* mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-DIF).

Objetivos particulares:

- Reproducir y adaptar un método cromatográfico cualitativo para la identificación de los carbohidratos provenientes del mucílago obtenido directamente al cortar el pseudobulbo de la orquídea.
- Aplicar el método implementado, para el análisis del adhesivo natural utilizado en 2 muestras de patrimonio cultural de instrumentos musicales.
- Obtener el perfil cromatográfico de otros adhesivos naturales como gomas y ver si existe diferencia con los perfiles del mucílago de las orquídeas.
- Proporcionar los perfiles cromatográficos de las orquídeas *Bletia campanulata*, *Laelia speciosa* y *Cyrtopodium macrobulbon* para colaborar con la base de datos "Orquídeas productoras de *tzauhtli*", para su caracterización (sitio en construcción).

Hipótesis

- Con la comparación de los perfiles cromatográficos del mucílago de tres especies de orquídeas mexicanas se podrá identificar al mucílago utilizado como adhesivo natural en dos muestras de patrimonio cultural.

Capítulo 1 . Antecedentes

1.1 Ciencia de la conservación

El desarrollo de procedimientos científicos que pueden usar cantidades pequeñas de muestras, junto con la mayor disponibilidad de instrumentación analítica, han despertado gran interés en el estudio químico de los materiales utilizados en patrimonio cultural. Esto ha dado lugar a un aumento en los estudios de investigación entre las áreas del arte, la arqueología, la química y las ciencias de los materiales. Como resultado, las colaboraciones multidisciplinarias exitosas han florecido entre los investigadores de museos, instituciones de conservación, universidades y laboratorios científicos (Colombini & Madugno, 2009).

Los objetos que conforman el **patrimonio cultural** tangible, pueden ser **muebles e inmuebles**. Entre los primeros se encuentran pinturas, esculturas, mobiliario, textiles, objetos de culto, joyería orfebrería, plumaria, instrumentos musicales, documentos y fotografías, entre otros. Los segundos incluyen edificios, construcciones conmemorativas, cuevas y espacios abiertos adaptados y construidos por el hombre. Todo este universo se caracteriza porque posee características que lo colocan en un grupo separado del resto de otros objetos similares (Aparisi, 2015).

Según el *International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works* (IIC), **la Conservación** es definida como "cualquier acción que se toma para determinar la naturaleza y propiedades de los materiales empleados en cualquier clase de bien cultural, o en su alojamiento, manejo o tratamiento, así como cualquier acción que se

toma para entender y controlar las causas del deterioro, y cualquier acción tomada para mejorar la condición de tales bienes". Por lo tanto, la conservación del patrimonio cultural es una actividad de gran importancia para proteger los objetos que guardan los vestigios de los testimonios históricos y culturales de los pueblos y mantener así el sentido de identidad de los grupos humanos, asunto que reviste una consideración de primer orden en el mundo actual globalizado (Sánchez & Álvarez, 2011).

De la mano con la conservación va la restauración, R. Alcántara define **la restauración** como: una disciplina profesional que busca asegurar la conservación material de los bienes culturales, de manera que preserven su valor testimonial y puedan cumplir con su función social actual. La disciplina involucra la aplicación de una serie de conocimientos e investigaciones científicas, técnicas y humanísticas, según ciertos lineamientos teóricos, a través de una amplia gama de procedimientos prácticos realizados sobre el bien y/o sobre su entorno inmediato. La restauración requiere un estudio previo antes de cualquier intervención en el monumento, este tiene un doble valor, el histórico y el estético. Es necesario, respetar ambas instancias de tal modo de no falsificar ni el documento histórico, ni el estético (Arroyo, 2005).

1.2 Técnicas analíticas como apoyo en la restauración

Algunas de las intervenciones que tiene la química dentro de la restauración y conservación de monumentos son: determinar las propiedades de los materiales utilizados, así como conocer los procesos de deterioro y determinación de contaminantes presentes en aire, tierra y agua. Esta información es fundamental para elegir la

sustancia protectora a aplicar para conservar los monumentos adecuadamente y se logra a través de múltiples técnicas, como son:

- La difracción de rayos X (polvos, fluorescencia y monocristal) y el análisis por microscopía de luz polarizada. Estas técnicas sirven para determinar la composición mineralógica de los diversos tipos de piedra, del adobe, de ladrillo y materiales cerámicos.
- La cromatografía, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y espectroscopía de infrarrojo se emplean en la mayoría de las veces para el estudio de material orgánico, como la madera, el papel, pigmentos o el caso de los diversos mucílago y materiales proteicos usados como adhesivos.
- La espectroscopía de fluorescencia de rayos X por luz ultravioleta y espectrometría de absorción atómica, sirven para conocer la composición elemental y los porcentajes presentes de los diferentes metales que integran las aleaciones o las pinturas elaboradas con materiales térreos (Sánchez & Álvarez, 2011).

1.3 Materiales filmógenos

Los materiales filmógenos son aquellos que, se aplican en estado líquido sobre una superficie y al secar forman capas o películas transparentes, utilizándose para preparar aglutinantes (sustancia orgánica o inorgánica que se mezcla con el pigmento para fijarlo sobre un soporte), adhesivos y barnices (Bruno & Moles, 2011).

Pueden ser orgánicos naturales u orgánicos artificiales. Los filmógenos **orgánicos naturales** se extraen de los reinos vegetal y animal, formados por mezclas de compuestos con largas cadenas que contienen átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Según

su solubilidad se clasifican en lipófilos e hidrófilos. Los lipófilos son solubles o hinchables en los disolventes orgánicos no polares. Ejemplos de ellos son: los aceites secantes, las ceras y las resinas naturales. Los hidrófilos son solubles o hinchables en agua, como son: proteínas, gomas, mucílagos y almidones. Ambos tipos se han utilizado como aglutinantes en las técnicas puramente acuosas o temple, también pueden ser usados en la preparación de adhesivos.

Los materiales filmógenos **orgánicos artificiales** en su mayoría son polímeros orgánicos sintéticos, por ejemplo: termoplásticos, emulsiones vinílicas, acetatos de polivinilo, policiclohexanonas y resinas acrílicas y alquídicas (Gómez, 1998).

1.3.1 Adhesivos y adhesión

Un adhesivo puede definirse como un material que cuando se aplica a superficies las une y resisten la separación. Su clasificación depende de la forma física (líquido o película), química (epóxidos, cianoacrilatos, policloroprenos, carbohidratos, etc.) y el tipo de superficie donde se adhiere (madera, plásticos, metales, vidrios, etc.) (Kjnloch, 2012).

Los adhesivos funcionan por fenómenos de unión (figura 1.0). La adhesión es la atracción entre dos sustancias resultante de fuerzas intermoleculares que se establecen entre la interfase. Este concepto es diferente al de cohesión que solo involucra fuerzas intermoleculares dentro de una sustancia (Da Silva, Öchsner, & Adams, 2011).

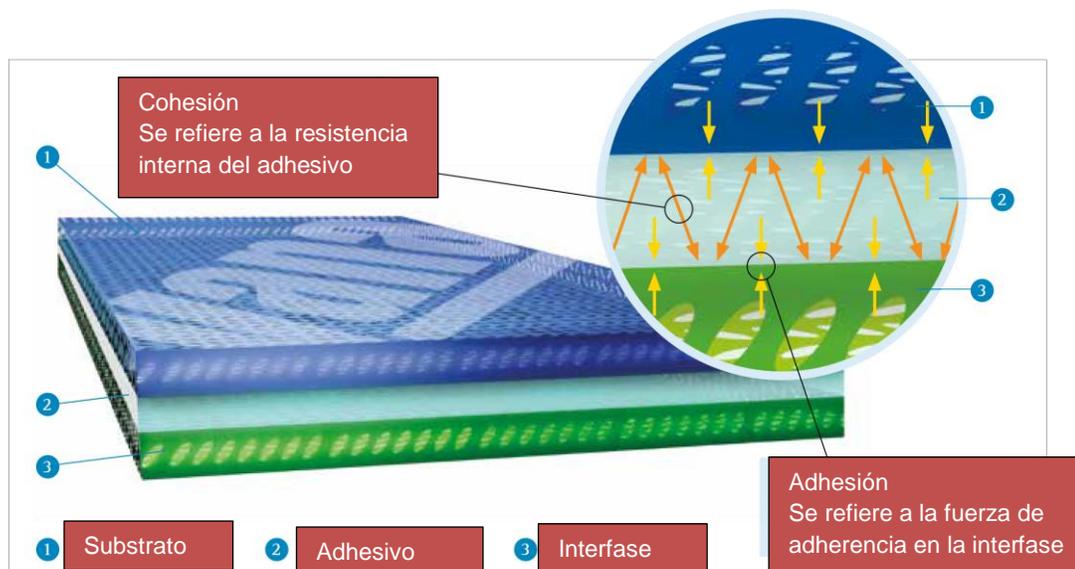


Figura. 1.0 Interacción de las fases en el fenómeno de adherencia (Lüder, 2018).

Los avances en la tecnología de adhesivos ofrecen una variedad de materiales prometedores para su uso en la conservación. Sin embargo, los conservadores no pueden usar ningún material sin probarlo antes. Por lo tanto, se debe desarrollar un sistema de prueba completo que permita al conservador / científico decidir si un nuevo adhesivo es adecuado para su uso en la conservación (Berger, 1972).

1.3.2. Gomas y mucílagos

Las gomas y mucílagos, son materiales utilizados en la preparación de adhesivos, están compuestos de polisacáridos que presentan uno o más monosacáridos o sus derivados unidos en una variedad de posiciones de enlace y estructuras; están presentes en grandes variedades de plantas, animales, algas marinas, hongos y otras fuentes microbianas (Vipul, Girish, Naresh, & Narayan, 2013).

Las **gomas** son productos exudados en respuesta a ataques físicos de insectos, infecciones microbianas u otras condiciones adversas que no forman parte de la pared celular. Su función es sellar el área

lesionada y se pueden recoger del sitio de exudación en la planta. Los polisacáridos del **mucílago** son parte de la célula, una parte normal del metabolismo de las plantas y productos fisiológicos. Son carbohidratos solubles en agua producidos dentro de las células que se extruyen a través de los poros de la pared celular. Se ha descubierto que los mucílagos desempeñan un papel en el almacenamiento y la retención del agua, la lubricación, la germinación de semillas y también pueden funcionar como una reserva de energía secundaria. Los mucílagos típicamente requieren procesamiento como remojo, cocción o compresión para extraer el polisacárido para su uso (Bisulca, Odegaard, & Zimmt, 2016).

La hidrólisis de gomas permite identificar los siguientes azúcares: glucosa, manosa y xilosa; mientras que los producidos por el mucílago son: galactosa y arabinosa principalmente (Vipul, Girish, Naresh, & Narayan, 2013).

1.4 Familia *Orchidaceae* en México

La palabra "orquídea" se deriva de la palabra griega "*orchis*", que significa testículo, sugiriendo la similitud de los pseudobulbos o cormos de algunas de las especies de orquídeas a los órganos genitales masculinos (López, 2009).

La familia *Orchidaceae* constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 25 mil especies conocidas a nivel mundial. Las orquídeas se distribuyen en todos los continentes (excepto la Antártida) pero su mayor diversidad se concentra en las regiones tropicales. México, situado en el límite norte del trópico de cáncer, alberga una notable riqueza de orquídeas y han sido registrados en el país alrededor de 1260 especies y 170 géneros. Se estima que

alrededor del 40% de las orquídeas mexicanas son endémicas (Salazar G. , 2004).

Los bosques de neblina y selvas tropicales húmedas del sur del país son ecosistemas más favorables para la existencia de orquídeas, éstas se distribuyen en gran parte del territorio nacional, con excepción de las zonas de aridez extrema. Las áreas montañosas, con una sequía estacional marcada, como la cuenca de México, albergan una diversidad moderada de especies y en ellas predominan los taxones terrestres, en contraste con los ambientes más cálidos y húmedos, donde son preponderantes las especies de orquídeas epífitas (Salazar G. , 2004).

1.4.1 Características morfológicas de las orquídeas

Las orquídeas son plantas herbáceas, perennes (raramente anuales), terrestres o epífitas, ocasionalmente trepadoras, algunas saprófitas (nutrición de los residuos procedentes de otros organismos) o raramente, micoparasitas. La raíz es la parte de la planta que la mantiene fija a la tierra o al sustrato y por medio de la cual toma agua y otros minerales del suelo. Las hojas actúan como estructura de reserva para sobrevivir los periodos largos de sequía y el rizoma son tallos horizontales de donde se originan los pseudobulbos. Los pseudobulbos por lo general son utilizados por la planta como almacén de agua y de sustancias de reserva que en parte son utilizadas para producir flores, frutos y nuevos tallos (Téllez, 2011). En la figura 1.1 se muestra un esquema general de la morfología de una orquídea.

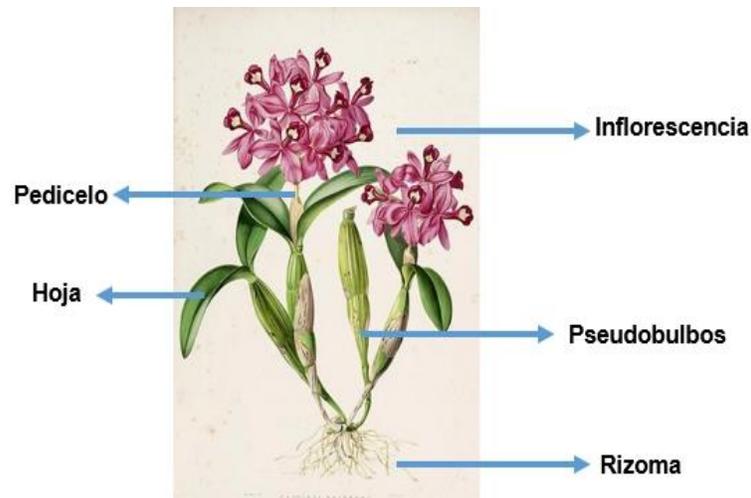


Figura 1.1 Esquema de la morfología de una orquídea (Fontana, 2017).

A continuación, se describen las tres especies estudiadas.

A) *Bletia campanulata*

Es una especie de orquídea de hábitat terrestre, crece principalmente en matorrales, así como en laderas herbosas en bosques de encino o coníferas. Se distribuye desde el occidente y centro de México por Centroamérica, el norte de Sudamérica y, siguiendo la cordillera de los Andes, hasta el oeste de Argentina (CONABIO, 2009) se puede observar en la figura 1.2.

B) *Laelia speciosa*

Es una especie epífita originaria de México con amplia distribución en bosques templados de sierras altas de varios estados de la República Mexicana. Ésta es quizá, una de las especies de orquídeas más conocidas debido a sus grandes y llamativas flores de hasta 10 cm de ancho (Campo & Muñoz, 2012) se presenta en la figura 1.3.

C) *Cyrtopodium macrobulbon*

Es una orquídea terrestre que se distribuye en algunos estados del sur de la República Mexicana. Es una planta terrestre que crece sobre

las rocas y alcanza dimensiones de hasta 1.3 metros de alto, presenta pseudobulbos en grupos, erectos y rígidos, de 15 a 40 cm de largo y de 1.5 a 3.0 cm de diámetro. Sus hojas son lineares y presenta flores numerosas de más de 100 inflorescencias y de coloración vistosa (Carranza, Maldonado, Carrillo, & Hernández, 2015) se puede observar en la figura 1.4.



Figura 1.2 *Bletia campanulata* (Bodofzt, 2017).



Figura 1.3 *Laelia speciosa* (*laelia majalis orquídeas speciosa*, 2019).



Figura 1.4 *Cyrtopodium macrobulbon* (Caro, 2019)

1.4.2 Usos de la orquídea

El uso más común de las orquídeas es ornamental y algunas veces como saborizante (vainilla). Durante muchos años, las flores se convirtieron principalmente en ramilletes grandes y llamativos, utilizando especies como: *Cattleya* y *Cymbidum* (Arditti, 1992). En las figuras 1.5 y 1.6 se muestran ejemplos de estas orquídeas.



Figura 1.5 *Cattleya* (Colibri orquídeas, 2019).



Figura 1.6 *Cymbidium* (Orchid Web, 2019).

1.5 Adhesivo en instrumentos musicales de cuerda

Se ha documentado que artesanos de instrumentos musicales utilizaban un adhesivo para ensamblar las piezas, Martínez (Martínez, 1974) menciona que, en el poblado de Villa de Juárez, Puebla, una persona empleaba la “babilla” del mucílago de una orquídea para pegar guitarras y violines, sin especificar la especie ni el modo de preparación. En el estudio de Berdan y colaboradores (Berdan, Stark, & Sahagún, 2009), se menciona que en la región de la huasteca las orquídeas *Govenia liliace* y *Govenia superba* han sido utilizadas como tubérculos frescos para reparar instrumentos musicales, además menciona el uso de la orquídea *Encyclia cochleata* para el encolado de instrumentos musicales.

En el estudio de etnobotánica en la sierra tarahumara, se menciona un pegamento llamado *Ikí* proveniente de la orquídea *Bletia aff. macrithmochila*, definiéndolo como “un pegamento fuerte” del pseudobulbo de esta orquídea de tierra, utilizado en la construcción de violines, guitarras y sonajeros. De manera breve se describe su uso de la siguiente forma: “el bulbo fresco se pone en ceniza caliente, luego se raspa con un cuchillo para producir una pasta”

(Wyndham, 2004). En reportes más recientes se habla acerca de la elaboración de la jarana tradicional veracruzana, se menciona que los constructores todavía preparan los adhesivos con los mucílago obtenidos de los pseudobulbos de diversos géneros de orquídeas, como las *Bletia*, *Cyrtopodium*, *Govenia* y *Prosthechea* (Quiroz & Lavallo, 2019).

Existe otro estudio acerca de la construcción de la jarana huasteca, en el poblado de Texquitote, SLP. Los primeros reportes se datan en 1920, donde se relata que la jarana era hecha de madera de un árbol llamado *jonote* (*Heliocarpus appendiculatus*) y el adhesivo utilizado fue el *tzactli*: mucílago derivado del pseudobulbo de una orquídea, la cual no lograron identificar debido a que al parecer se extinguió. Sin embargo, relata que hoy en día, para obtener el adhesivo en la región, se utiliza la orquídea identificada como *Cyrtopodium macrobulbon* (Guerrero, 2017). La figura 1.7 muestra una jarana huasteca.



Figura 1.7 Jarana huasteca (Guerrero, 2017).

1.5.1 El *tzácuhtli*, *tzaucitli* o *tzauhtli*

En el vocabulario que Fray Alonso Molina compuso en el siglo XVI, está consignada la palabra *tzácuhtli* como equivalente al vocablo español "engrudo". En realidad, no se trata de un verdadero engrudo, ya que el *tzácuhtli* o *tzauhtli* no contiene almidón (Martínez, 1974). A principios del siglo XX, se comenzó a estudiar el *tzauhtli* y lo describieron como: el principal producto adhesivo que los nahuas emplearon, unas veces como pegamento y otras como aglutinante, era de origen vegetal. Lo obtenían de los pseudobulbos de ciertas orquídeas que crecían –y crecen- en diversos lugares de Mesoamérica (Urbina, 1903).

El *tzauhtli* o mucílago de orquídeas fue estudiado por primera vez en 1995 por Peña y Carolusa. Este trabajo buscó caracterizar el adhesivo del mosaico plumario "San Francisco en Oración" (figura 1.8), del siglo XVI. En su trabajo, Peña muestra que el *tzauhtli* está compuesto por polisacáridos de altos pesos moleculares solubles y dispersables en agua. Dentro de la composición de las gomas y mucílago, además del polisacárido (que es su principal constituyente), se encuentran moléculas pequeñas de azúcares libres que no están unidos al polisacárido (López, 2009).

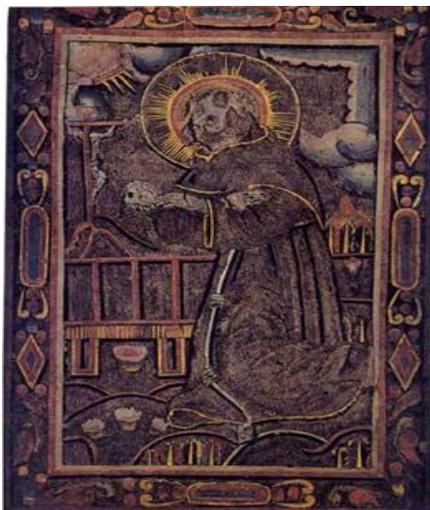


Figura 1.8 San Francisco en oración

1.5.1.1 Usos del *tzauhtli*

A) Arte plumario

El *tzauhtli* se usaba para fabricar diversos artículos de pluma, destacando aquellos en los que se seguía una técnica semejante a la del mosaico, pegando sobre un fondo hecho también de plumas adheridas sobre algodón, las plumas de colores que requería el modelo de la obra. También se usaba *tzauhtli* para hacer una pasta con caña de maíz seca y molido, con la cual se modelaban diversas figuras, generalmente pequeñas y representando animales, que luego se cubrían con plumas (Martínez, 1974).

B) El *tzauhtli* y los pintores

Hay referencias precisas del uso de *tzauhtli* como aglutinante de los pigmentos utilizados en múltiples aplicaciones en el México antiguo. Generalmente con fines rituales, se usaban para teñir la piel de diversas partes del cuerpo: para ennegrecer los cabellos, para decorar vasijas y otros objetos. También se utilizaban colores para consignar datos en los libros o códices, para teñir plumas, el algodón y otras fibras (González, 2006).

1.5.1.2 Preparación del pegamento en la época prehispánica y colonial

Se tiene registro de acuerdo con los escritos de Sahagún y de Hernández, que había 3 maneras diferentes de preparar el *tzauhtli*: la primera era que una vez recolectado el pseudobulbo, se seccionaba en pequeños trozos, se ponían a secar al sol y después se trituraban hasta hacer un polvo. Este polvo se podía almacenar y en el momento en que se requería se disolvía en agua. La segunda era recolectar el pseudobulbo, cortarlo y cocerlo en agua, para así

extraer el adhesivo en el agua. La tercera forma de utilizar el *tzauhtli* era secretarlo (compresión) directamente de los pseudobulbos (Hernández F. , 1942). En la figura 1.9 se aprecia una imagen del códice Florentino que se asocia con la preparación del *tzauhtli*.

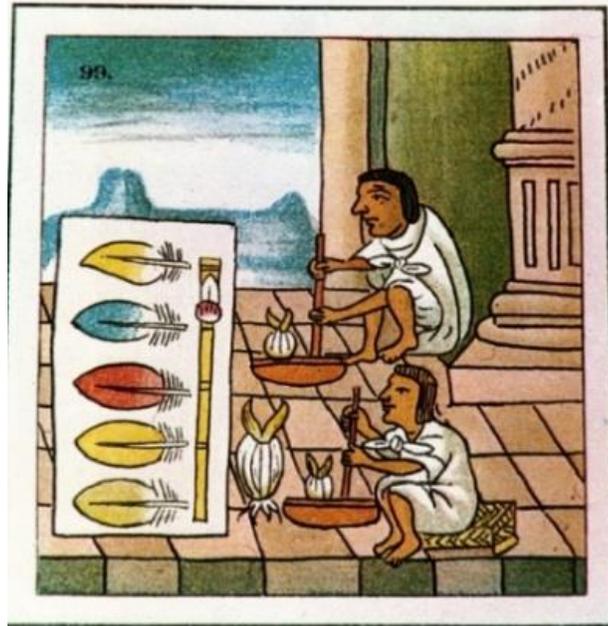


Figura 1.9 Fabricantes de pegamento, códice Florentino (Martínez, 1974).

1.6 Química de los carbohidratos

Los carbohidratos son aldehídos o cetonas polihidroxilados, funcionan como sistemas de almacenamiento de energía química, metabolizándose a agua, dióxido de carbono y calor. Los miembros de esta clase de compuestos dan estructura a plantas, flores y árboles (Ege, 1998).

Carbohidratos es el nombre general para los monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, la clasificación se deriva del latín "*saccharum*" que significa azúcar. Un monosacárido, o azúcar simple, es un aldehído o cetona que contiene al menos dos grupos hidroxilo adicionales. Por lo tanto, los dos miembros más simples de esta clase de compuestos son 2,3-

dihidroxipropanal (gliceraldehído) y 1,3-dihidroxiacetona. Los azúcares aldehídicos se clasifican como aldosas; aquellos con un grupo funcional cetona se llaman cetosas (Vollhardt & Schore, 2018). En la figura 2.0 se muestran las estructuras de algunas cetosas y aldosas.

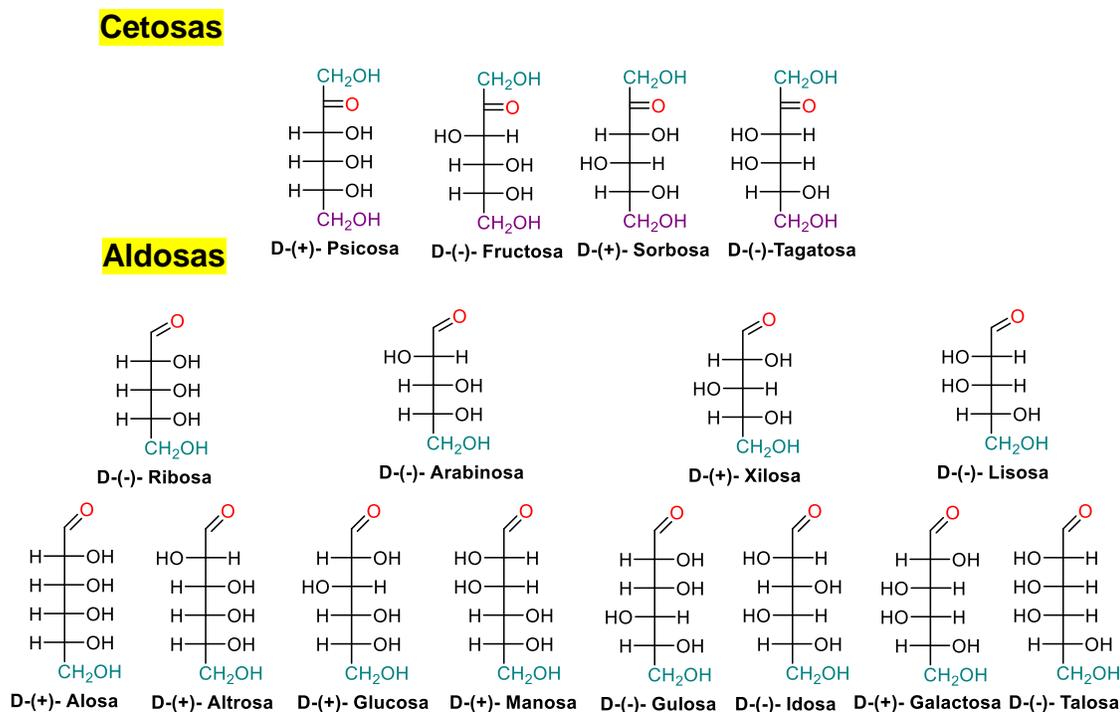


Figura 2.0 Ejemplos de algunas cetosas y aldosas

La nomenclatura de los azúcares D y L indican la configuración de un centro quiral, pero no indican si el compuesto hace girar la luz polarizada a la derecha (+) o a la izquierda (-). En otras palabras, la rotación óptica, como los puntos de fusión o de ebullición, es una propiedad física de un compuesto, mientras que "R, S, D y L" son convenciones que usa el hombre para indicar la configuración en torno de un centro quiral (Bruice, 2016).

El gliceraldehído presenta un estereocentro (figura 2.1), puede existir como un par de enantiómeros, los isómeros *R* y *S*. Fischer asignó la configuración D-gliceraldehído de forma equivalente a (*R*)-(+)-gliceraldehído, y el L-gliceraldehído es (*S*)-(-)-gliceraldehído (Carey, 2016).

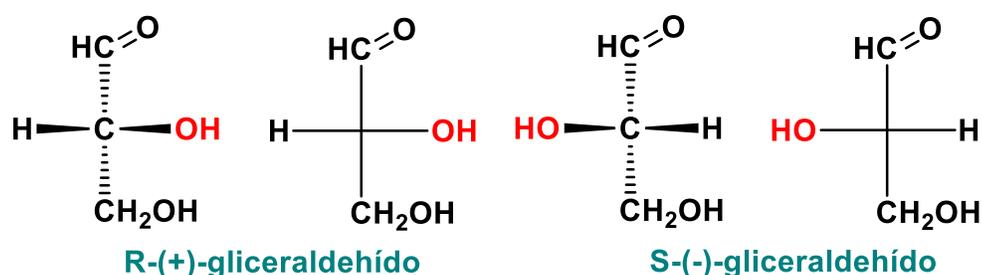


Figura 2.1 Representaciones tridimensionales y proyecciones de Fischer para los enantiómeros del gliceraldehído.

Formas cíclicas de los carbohidratos

Las aldosas y cetosas tienen dos grupos funcionales, el carbonilo y el OH, que son capaces de reaccionar entre sí. La adición nucleofílica del alcohol al carbonilo forma un hemiacetal. Cuando los grupos hidroxilo y carbonilo son parte de la misma molécula, resulta un hemiacetal cíclico (Bruice, 2016).

La formación de los hemiacetales cíclicos se encuentra más favorecida cuando el anillo que resulta tiene cinco o seis miembros. A los hemiacetales cíclicos de cinco miembros de los carbohidratos se les llama forma furanosa y a los de seis miembros se les llama forma piranosa (figura 2.2). El carbono del anillo que se deriva del grupo carbonilo, el que tiene dos sustituyentes oxígeno, se llama carbono anomérico (Carey, 2016).

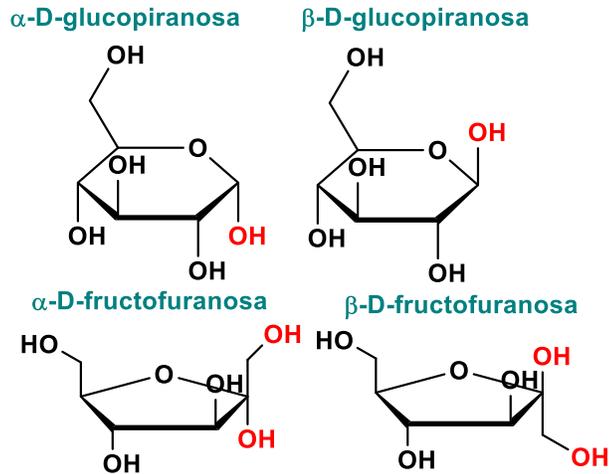


Figura 2.2 Representación de la forma piranososa de la glucosa y furanosa de la fructosa.

Por ejemplo, la D-glucosa existe en tres formas diferentes: su forma de cadena abierta y dos formas cíclicas: α -D-glucopiranososa y β -D-glucopiranososa (figura 2.3).

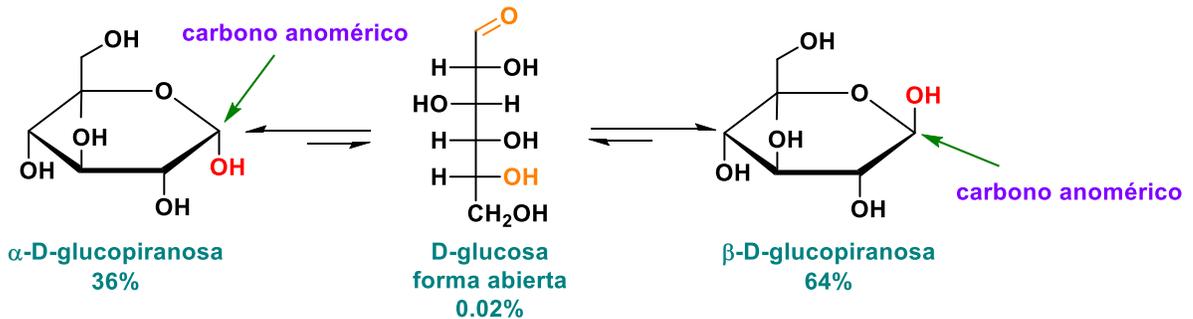


Figura 2.3 Equilibrio de mutarrotación.

El equilibrio para que puedan darse ambas formas cíclicas de la glucosa recibe el nombre de mutarrotación (Morrison & Boyd, 2010).

Al acetal o al cetal de un azúcar se le llama glicósido y al enlace entre el carbono anomérico y el oxígeno del grupo alcoxi se le llama enlace glicosídico. Los glicósidos reciben su nombre sustituyendo la terminación "a" del nombre del azúcar por "ido" (Bruice, 2016).

Los hemiacetales formados por un anillo de seis miembros se trazan en forma de proyecciones de Haworth. Una forma equivalente de las representaciones de Haworth son las conformaciones de silla como se presenta en la figura 2.4.

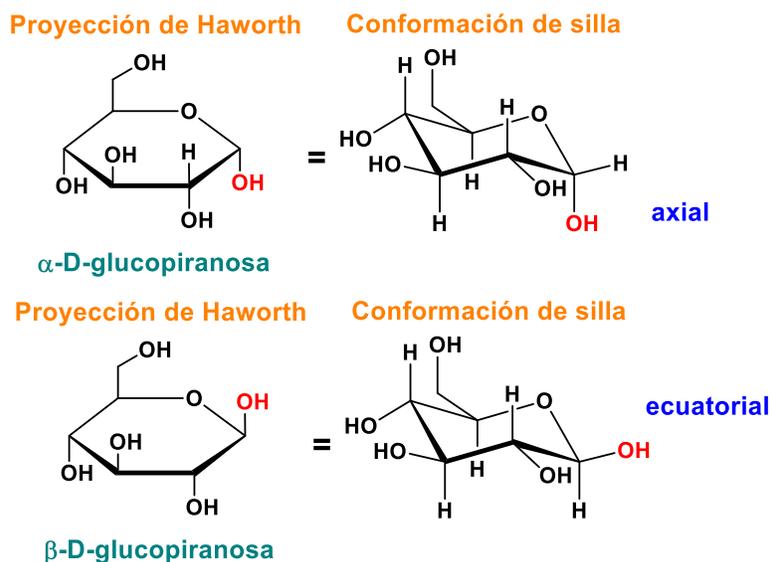


Figura 2.4 Conformaciones de silla para los anómeros de la glucosa.

En la tabla 1 se presenta un resumen de las reacciones más generales de los carbohidratos.

Tabla 1 Reacciones generales de los carbohidratos

Reacción	Esquema
Epimerización (Vollhardt & Schore, 2018)	
Reordenamiento (Carey, 2016)	
Reducción (Stick & Williams, 2010)	
Oxidación (Carey, 2016)	<p style="text-align: center;">Ácido aldónico</p> <p style="text-align: center;">Ácido aldárico</p>
Alargamiento de cadena, Kiliani Fischer (Hornbæk, 2005)	
Acortamiento de cadena, degradación de Wohl (Fieser & Fieser, 1981)	

1.6.1 Polisacáridos

Los polisacáridos se pueden definir como polímeros de condensación de alto peso molecular basados en unidades de monosacáridos simples. Una unidad de monosacáridos se une a la siguiente unidad de monosacáridos mediante un enlace glicosídico (Aspinall, 1970).

Los polisacáridos son biopolímeros únicos con una enorme diversidad estructural. Grandes cantidades de polisacáridos se forman biosintéticamente por muchos organismos, incluidos plantas, animales, hongos, algas y microorganismos (Heinze, Liebert, & Koschella, 2006). En la figura 2.5 se señalan los enlaces glicosídicos característicos de los polisacáridos, además se muestra la glucosa como unidad monomérica de la celulosa.

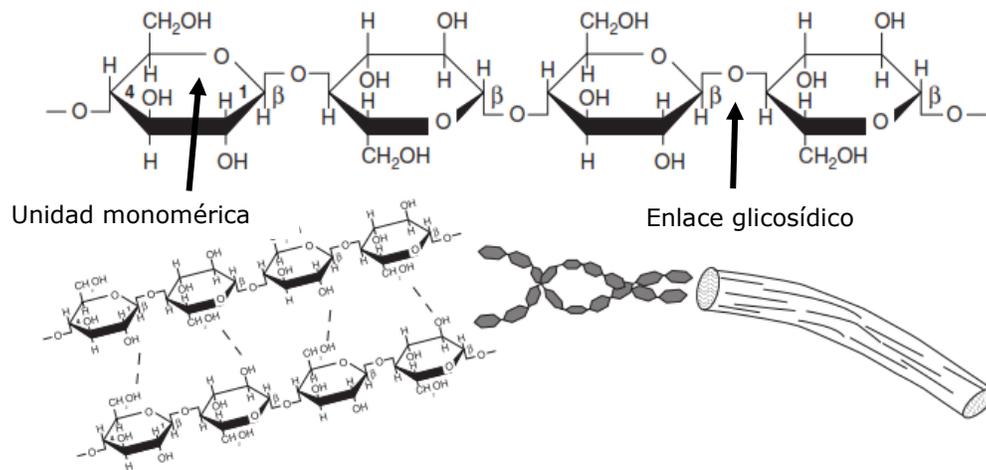


Figura 2.5 Fragmento de la estructura de la celulosa (*Ciencia del suelo*, 2015).

1.6.1.1 Análisis de estructuras de polisacáridos

La estructura completa de los polisacáridos se establece cuando se determinan los siguientes puntos: el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de monosacáridos presentes en la molécula del polímero; la naturaleza de la secuencia de

monosacárido y el tamaño del anillo (piranosa o furanosa), la posición de enlace de los diferentes monosacáridos y la configuración anomérica (alfa o beta) (El Khadem, 2012).

Algunas técnicas para estas determinaciones son: la espectroscopía IR ayuda a identificar grupos funcionales (Heinze, Liebert, & Koschella, 2006), la resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C sirve para el análisis estructural, la espectrometría de masas da la masa molecular del polisacárido (El Khadem, 2012) y la cromatografía de gases (GC) y líquidos (CL) son útiles para la identificación de carbohidratos (Heinze, Liebert, & Koschella, 2006).

1.7 Cromatografía de gases

La cromatografía es un método físico de separación en donde los componentes a separar, se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria, mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida (Mc Nair & Miller, 1998).

En la cromatografía de gases la muestra es vaporizada y acarreada por un gas inerte a lo largo de la columna. Los componentes de la muestra son separados unos de otros en función de su presión de vapor relativa y de la afinidad por la fase estacionaria (Mc Nair & Miller, 1998).

La cromatografía de gases se ha convertido en la técnica principal para la separación y el análisis de compuestos volátiles. Se pueden analizar mezclas complejas de hidrocarburos, pesticidas en suelo y productos vegetales, drogas en sangre, disolventes de uso industrial, contaminantes ambientales, aromas, saborizantes empleados para alimentos, fragancias para la industria de perfumes y la identificación de sustancias inflamables causantes de incendios (Barquero, 2006).

Para el manejo rápido y simple de un gran número de muestras se utiliza la CG (Davison & Young, 1969) que comúnmente ocupa los detectores de ionización de flama (CG-DIF) y espectrometría de masas (CG-EM). Previo a su análisis mediante esta técnica instrumental, los carbohidratos deben volverse volátiles mediante derivatización. La derivatización es una transformación química del analito. El derivado puede tener una estructura similar o estrechamente relacionada, pero no es lo mismo que el compuesto químico original no modificado (Orata, 2012).

1.7.1 Derivatización de carbohidratos

Una de las reacciones de derivatización utilizada para modificar los carbohidratos a moléculas volátiles es la sililación. Los derivados de sililo se forman por el desplazamiento del protón activo en los grupos -OH, -NH y -SH (Evershed, 1993). La reacción general para la formación de derivados de sililo se muestra en la figura 2.6.

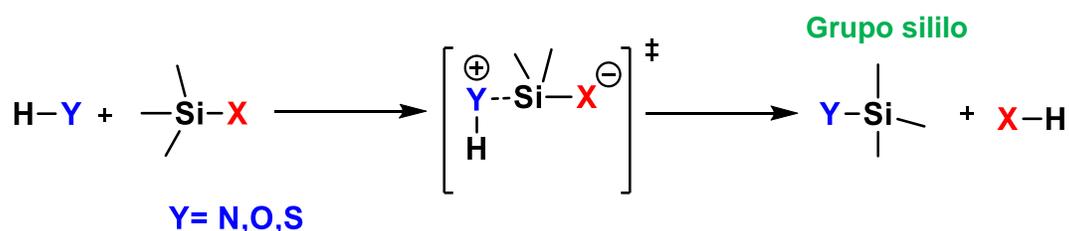


Figura 2.6 Esquema de reacción general de la sililación.

Se trata de una sustitución nucleofílica bimolecular donde el grupo donador de sililo debe presentar mayor basicidad que el grupo de los protones activos, además debe ser capaz de estabilizar la carga negativa y no tener interacción del tipo π (p-d) (Evershed, 1993).

Existen otros métodos de derivatización para azúcares, pero el más simple y el más rápido para el análisis de rutina es la sililación, que

producen los derivados del trimetilsilano (TMS) (Rojas, Alarcón, Elizalde, & Rojo, 2004). Algunos de los reactivos más utilizados para llevar a cabo la sililación son los que se presentan en la figura 2.7, las condiciones de temperatura y tiempo de reacción difieren con cada uno de ellos (Ruíz, Hernández, Rodríguez, Sanz, & Martínez, 2011).

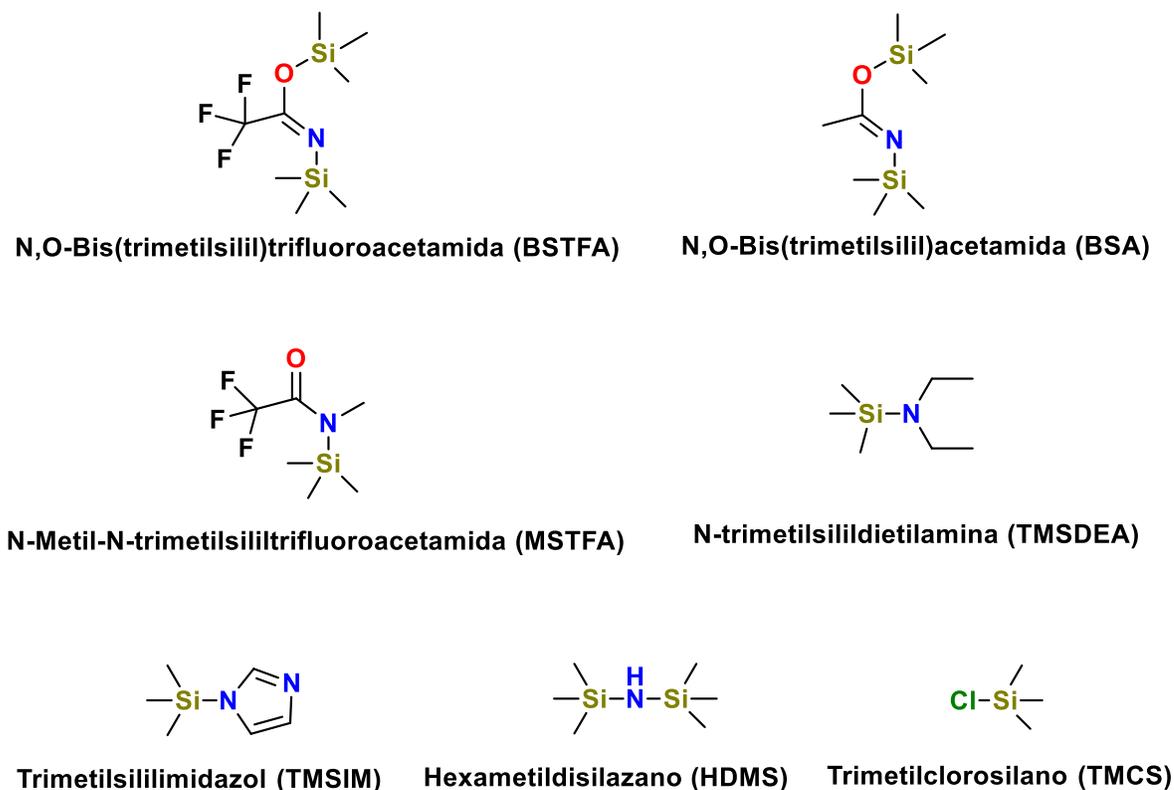


Figura 2.7 Reactivos para sililación

El análisis de aldosas y cetosas es complicado por el gran número de compuestos homólogos y por las múltiples estructuras presentes en solución: α - y β -piranosa y α - y β -furanosa además de la forma abierta del monosacárido. Es común primero convertir los azúcares en derivados de la cadena abierta y el método tradicional de elección ha sido la oximación, que produce solo dos picos por monosacárido (los isómeros *syn* y *anti*) y un pico para polisacáridos (Andrews,

1989). Un procedimiento popular está basado en el trabajo original de Sweeley que fue subsecuentemente desarrollado por otros grupos, donde los azúcares inicialmente son convertidos en oximas a partir de una reacción con hidroxilamina en piridina, y después con hexametildisilazano (HDMS) y ácidos orgánicos forman los derivados de trimetilsilano (Ox-TMS). Las ventajas de este método son: tiempos relativamente cortos de reacción, manejo simple de la muestra y reactivos económicos (Adams, Chen, Landman, & Colmer, 1999). En la figura 2.8 se muestra a manera de ejemplo la reacción para la formación de la oxima y la sililación de la glucosa.

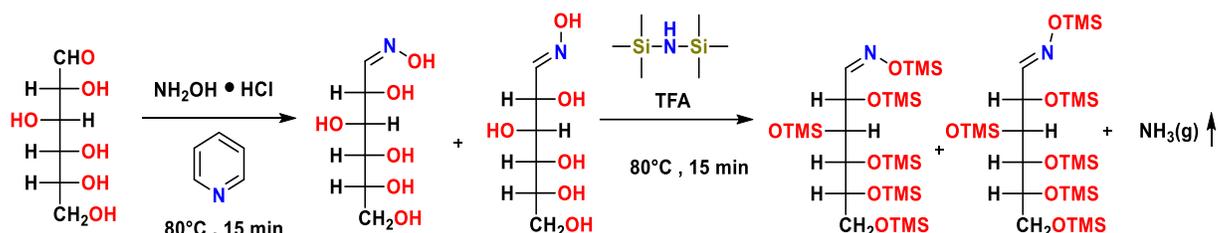


Figura 2.8 Esquema de reacción para la derivatización de la glucosa

1.7.2 Instrumentación

Un esquema general de los componentes de un cromatógrafo de gases se muestra en la figura 2.9. Sus componentes principales son: la fase móvil, controladores de presión, puerto de inyección, columna, horno, detector y el procesador de datos (*software*). Más adelante se irán describiendo cada uno de ellos.

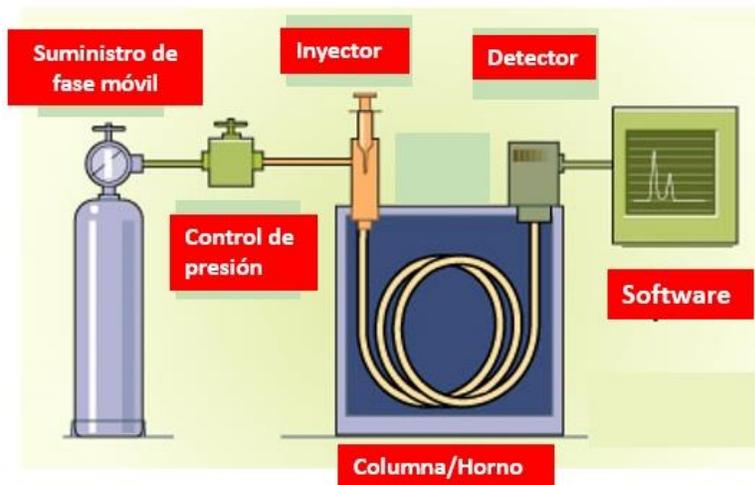


Figura 2.9 Esquema general de los componentes de un cromatógrafo de gases (CHROMEDIA ANALYTICAL SCIENCES, 2019).

Fase móvil (Gas acarreador)

El gas acarreador es la fase móvil en CG. Su función es llevar la mezcla de los solutos desde que se introduce en el inyector hasta la salida del detector, pasando a través de la columna donde se produce la separación. Debe ser químicamente inerte y no interaccionar con la columna ni con los componentes de la mezcla, es decir, no debe afectar el proceso de separación que ocurre en la columna. Los gases más utilizados son: nitrógeno, helio, hidrógeno y argón (Valcárcel & Gómez, 1994).

Puerto de inyección

La función principal del puerto de inyección en CG es proporcionar una transferencia precisa y reproducible de la muestra a la columna (Handley & Adlard, 2011).

Algunos puertos de inyección que se han desarrollado para cromatografía de gases son: *split/splitless*, *cold on column*, *PTV*, entre otros (Robards, Haddad, & Jackson, 1994).

El puerto de inyección más común y ampliamente utilizado es el llamado ***split/splitless***. En el modo ***split***, la muestra se inyecta, luego se evapora y se mezcla homogéneamente con el gas portador,

se divide en dos porciones desiguales, la más pequeña pasa a la columna, mientras que el resto se desecha, por lo tanto este modo no es el más apropiado para el análisis de trazas o para muestras muy complejas que contienen componentes que sobrecargarían la columna (Robards, Haddad, & Jackson, 1994).

En el modo ***splitless***, la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, se utiliza para el análisis de trazas de analitos, que representan menos del 0.01% de la muestra. Se introduce un volumen entre 1-5 μL de muestra (Robards, Haddad, & Jackson, 1994).

En la figura 3.0 se muestran los componentes principales en un inyector tipo *split/splitless*.

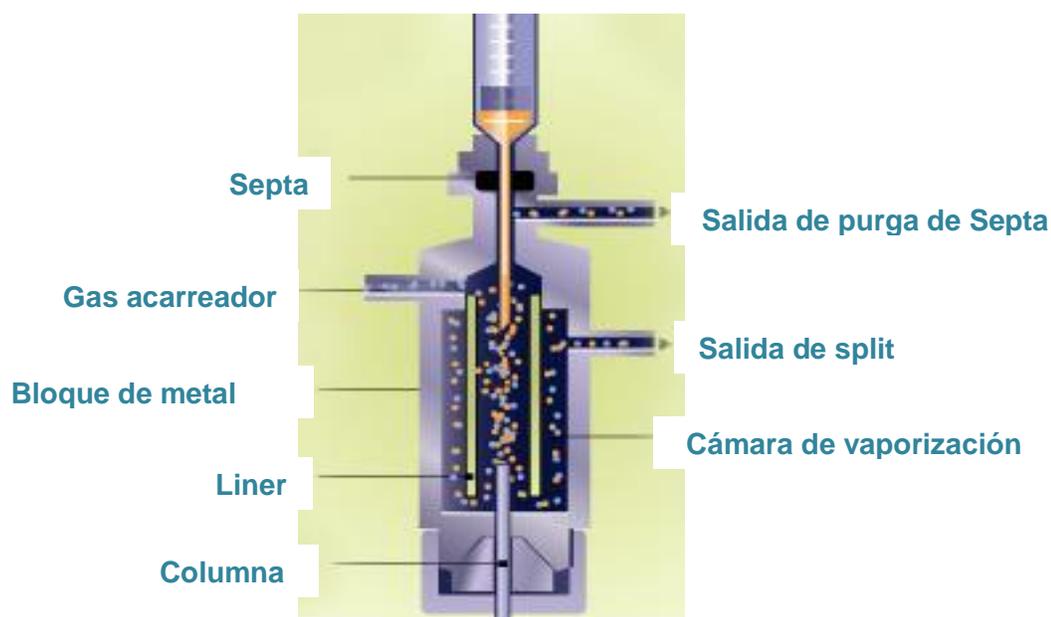


Figura 3.0 Sección transversal típica de un inyector *split/splitless* (CHROMEDIA ANALYTICAL SCIENCES, 2019).

Sistema de separación

La columna es el corazón del sistema cromatográfico. Determina la selectividad y eficiencia de la separación. El proceso de separación que se produce en la columna implica un equilibrio establecido por el soluto entre la fase estacionaria y la móvil (Mc Nair & Miller, 1998).

La fase estacionaria debe ser térmicamente estable, no reactiva, tener una volatilidad despreciable y no exceder la temperatura máxima de operación que pueda provocar el sangrado de la columna, lo que contribuye al ruido del detector y la deriva de la línea base (Braithwaite & Smith, 1985). Existen 2 tipos de columnas cromatográficas, que se describen a continuación.

A) Columnas empacadas

Contienen un soporte sólido de partículas finas recubiertas de una fase estacionaria líquida no volátil, o el sólido mismo es la fase estacionaria. A pesar de su menor eficiencia, las columnas empacadas son útiles para separaciones preparativas, en las que se precisa una gran cantidad de fase estacionaria, o para separar gases que no son muy retenidos. Las columnas, son de acero inoxidable, níquel o vidrio, sus dimensiones típicas son 3-4 mm de diámetro y 1-5 m de longitud (Harris, 2007).

B) Columnas capilares

Son columnas largas, abiertas y estrechas, fabricadas de sílice fundida (SiO_2) y recubiertas de poliimidias (un polímero capaz de resistir más de 350 °C), como soporte y como protección contra la humedad atmosférica. Los diámetros interiores típicos son entre 0.1 y 0.53 mm, las longitudes típicas están entre 15 y 100 m. Las columnas estrechas dan mayores resoluciones que las columnas

anchas, pero requieren una presión de trabajo mayor y tienen menor capacidad de muestra (Harris, 2007).

La elección de la fase estacionaria se basa en la estructura química de los componentes, pueden ser polares o no polares. En la figura 3.1 se muestran las fases estacionarias de uso frecuente.

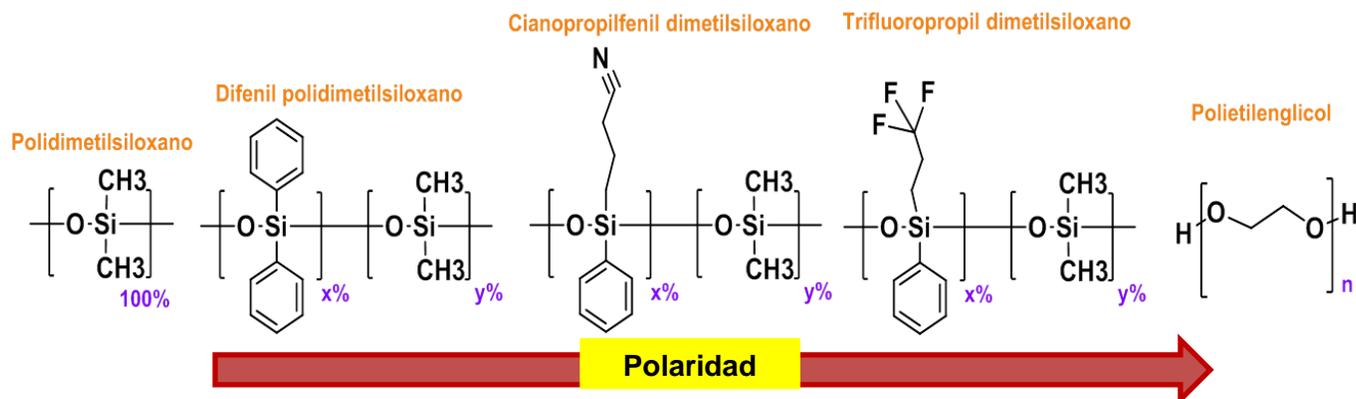


Figura 3.1 Fases estacionarias más utilizadas en CG (Chromacademy, 2019).

Sistema de detección

El propósito del detector es monitorear el efluente de la columna, midiendo las variaciones en su composición, la mayoría son del tipo diferencial, dan una señal de cero cuando solamente está pasando el gas portador. Cuando un componente se eluye y se detecta, la señal producida es proporcional a la concentración o masa del componente (Braithwaite & Smith, 1985). A continuación, en la tabla 2 se presentan los detectores más utilizados en CG.

Tabla 2. Listado de algunos detectores y el tipo de compuestos que se pueden analizar (Ahuja, 2003).

Detector	Compuestos analizados
Conductividad térmica (DCT)	Universal
Ionización de flama (DIF)	La mayoría de los compuestos de carbono
Captura de electrones (DCE)	Compuestos halogenados
Fotoionización (DF)	Compuestos aromáticos
Nitrógeno/ fósforo	N-, P-, y compuestos que contengan halógenos
Flama fotométrica (DFF)	Compuestos que contengan S- y P-
Emisión atómica (DEA)	Metales, y compuestos que contengan halógenos
Electroconductividad (DEC)	S-, N- y compuestos que contengan halógenos
Quimioluminiscencia	Compuestos que contengan S-
Radiactividad	^1H y ^{13}C
Espectrómetro de masas	Variedad de compuestos

Uno de los detectores más comunes y con gran variedad de aplicaciones es el **detector de ionización de flama (DIF)**.

El DIF proporciona una respuesta selectiva a los compuestos orgánicos, bajos límites de detección, estabilidad a largo plazo, simplicidad de operación, bajo volumen muerto, una respuesta rápida y un buen intervalo de respuesta lineal (Cazes, 2004).

El detector funciona porque la combustión de compuestos de carbono producen iones (Holm, 1999), el mecanismo de respuesta de este detector (figura 3.2) se ha descrito de la siguiente manera: el gas acarreador de la columna se mezcla con el gas de combustión y con el gas auxiliar (*make-up*), se quema en una cámara a través de la cual fluye el exceso de aire y la llama prende mediante un ignitor. Un

colector cilíndrico, colocado a poca distancia sobre la llama, recoge iones mediante la aplicación de un voltaje (200–300 V) entre la punta del efluente y el electrodo colector. Las pequeñas corrientes de iones se convierten a un voltaje y se aumentan mediante un amplificador (Poole, 2015).

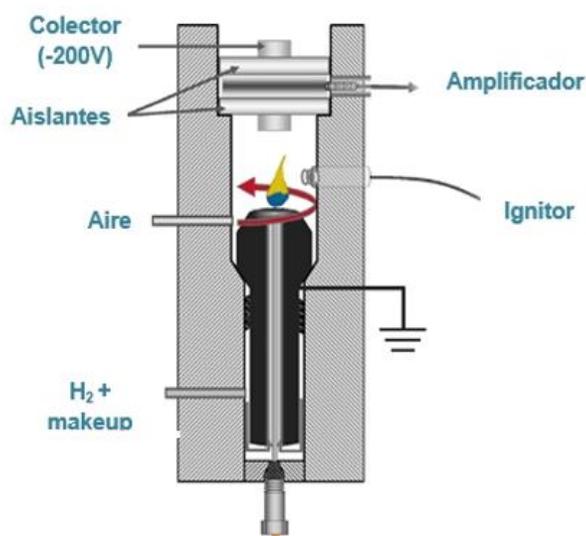
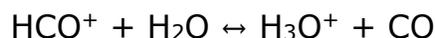


Figura 3.2 Diagrama representativo de un detector de ionización de flama (Poole, 2015).

En general, se cree que la formación de iones resulta de la ionización química de la molécula CHO* producida por la reacción radicalaria de O• y CH•



El ion CHO⁺ original luego reacciona rápidamente para producir iones H₃O⁺ y otros iones de hidrocarburos secundarios (Poole, 2015).



1.8 Parámetros cromatográficos

Un parámetro es una cantidad que puede tener distintos valores que caracteriza un proceso, una operación o un resultado.

Se puede evaluar la forma, la posición y la resolución de los picos de un análisis cromatográfico y se pueden correlacionar con factores químicos. En el caso de la cromatografía los parámetros que describen un cromatograma pueden correlacionarse satisfactoriamente con descripciones de los procesos moleculares que tienen lugar durante las separaciones (Rubinson & Rubinson, 2001).

Los conceptos en los que se basan las separaciones cromatográficas y aquellos parámetros que son de utilidad para comprender y mejorar la calidad de los cromatogramas, se presentan a continuación.

Tiempo de retención t_R : es el tiempo característico que tarda un analito particular en pasar a través del sistema (desde la entrada de la columna hasta el detector) bajo las condiciones fijadas. Este parámetro consta de dos componentes y la forma de calcularlo se muestra en la ecuación 1.

$$t_R = t_M + t'_R \dots (1)$$

- t'_R , tiempo de retención corregido, tiempo que realmente se invierte en la retención de un soluto por la fase estacionaria (Hernández & Claudio, 2002).
- t_M , tiempo muerto es lo que tarda una especie no retenida en llegar al detector (Dettmer-Wild & Engewald, 2014).

Factor de retención k' : Las características de retención de los componentes suelen describirse en la práctica por el factor de retención o capacidad, el cual relaciona el tiempo que un soluto pasó en la fase estacionaria con el tiempo que pasó en la fase móvil. En la ecuación 2 se presenta la expresión matemática, donde t'_R es el

tiempo de retención corregido y t_M es el tiempo muerto (Dettmer-Wild & Engewald, 2014).

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} \dots (2)$$

Los factores de retención mayores favorecen una buena separación, pero también incrementan el tiempo de elución y el ancho de la banda. Idealmente las separaciones adecuadas se realizan cuando el valor de k' es entre 1 y 5 (Hernández & Claudio, 2002).

Selectividad α : La capacidad de una determinada fase estacionaria para separar dos componentes A y B, se expresa como α , matemáticamente es la relación de tiempos de retención corregidos entre dos solutos adyacentes (ecuación 3). Los valores óptimos tienen que ser mayores a la unidad (Sierra, Gómez, Pérez, & Morante, 2009), α describe la separación entre los centros de los máximos de los picos cromatográficos, pero no tiene en cuenta las anchuras de pico.

$$\alpha = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} = \frac{k'_B}{k'_A} \dots (3)$$

Platos teóricos N : Se considera que la columna cromatográfica está constituida por numerosas etapas, denominadas platos. Se considera que en cada plato se establece un equilibrio del componente entre la fase móvil y la fase estacionaria y el desplazamiento del analito a través de la columna se trata como una transferencia de la fase móvil desde un plato al siguiente. La eficiencia de la columna aumenta al hacerlo el número de estas transferencias (Hernández & Claudio, 2002).

El número de platos teóricos se puede calcular con la siguiente expresión (ecuación 4), donde; t_R es el tiempo de retención sin corregir, σ es la desviación estándar del pico gaussiano, w_b es el ancho de pico y w_h es el ancho de pico a la mitad de la altura.

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \dots (4)$$

Altura equivalente a un plato teórico (AEPT), H: La forma de representar los “n” equilibrios entre los analitos y la fase estacionaria se puede calcular mediante H, ya que el número de platos teóricos será directamente proporcional a la longitud de la columna, de forma que, si ésta se representa por L, H viene dada por la ecuación 5.

$$H = \frac{L}{N} \dots (5)$$

Es un criterio importante que relaciona la eficiencia de una columna y que se puede usar con fines comparativos (Dettmer-Wild & Engewald, 2014).

Resolución: Es una medida del grado cuantitativo de la separación, a partir de los valores de los picos gaussianos observando su ancho a la base. Si $R= 1.5$, los dos picos se superponen un 0.3%, mientras que si $R=1$, la superposición es del orden del 2%, que puede considerarse adecuada para muchos análisis; para calcular este valor se utiliza la ecuación 6 (Dettmer-Wild & Engewald, 2014) (Hernández & Claudio, 2002).

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \dots (6)$$

Capítulo 2 . Metodología experimental

2.1 Disolventes y reactivos

- 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano [HDMS] ($\geq 99.0\%$) Fluka Analytical (USA)
- piridina (py) 99+% Sigma Aldrich (USA)
- hidróxido de sodio BioXtra ($\geq 98\%$) anhidro Sigma Aldrich (Suecia)
- ácido sulfúrico al 98% m/v Sigma Aldrich (USA)
- clorhidrato de hidroxilamina (99%) Sigma Aldrich (USA)
- isoctano (HPLC) Fermont (Monterrey, N.L Mex.)
- ácido trifluoroacético (TFA) ReagentPlus (99%) Sigma Aldrich (USA)
- dióxido de carbono (hielo seco)
- agua tipo I

2.2 Estándares

- glucosa, arabinosa, galactosa, fructosa, sacarosa, rafinosa SUPELCO (USA)
- 1-Dodecanol Fluka (USA)
- Patrón MDL *Agilent Technologies* (USA)

2.3 Equipos e Instrumentos

- Micropipeta 100-1000 μL VWR modelo 613-5265
- Micropipeta 20-200 μL Biohit modelo m200
- Balanza analítica marca A&D modelo GH-202
- Ultraconcentrador SpeedVac Concentrator Thermo SCIENTIFIC modelo SAVANT ISS110.
- Vortex Genie-2

- Cromatógrafo de gases con un detector de ionización de flama marca Agilent modelo 7890B, automuestreador 7693 y *software Open LAB CDS* 2014.
- Columna capilar HP-1 (100% polidimetilsiloxano), dimensiones 15 m x 250 μm x 0.25 μm (*Agilent Technologies, USA*).

Material de laboratorio

- Matraces volumétricos de 100, 50, 25 mL
- Vaso de precipitado de 100 mL
- Pipeta graduada de 2 mL
- Probeta graduada de 10 mL
- Viales de reacción de 5 mL
- Espátula
- Tiras reactivas de pH
- Tubos *ependorf* 1 mL
- Viales para CG
- Insertos

2.4 Muestras de pseudobulbos de orquídeas y gomas

Las orquídeas mencionadas en fuentes históricas con las que se desarrolló este proyecto provienen del **acervo vivo** que se encuentra ubicado dentro de las instalaciones de la Escuela Nacional de Conservación Restauración y Museografía (ENCRyM). Todas las orquídeas fueron identificadas por la Dra. Irene Ávila Díaz, Dr. Adolfo Espejo y el Dr. Miguel Soto Arenas. Proporcionadas por la Maestra en Restauración Lilian García-Alonso, tuvieron permiso de colecta (Ley General de Vida Silvestre, 2000) y fueron cuidadas en condiciones ambientales óptimas durante 2 años. Las orquídeas también representan lo que se ha denominado patrimonio biocultural.

- *Bletia campanulata* el ejemplar pertenece a una colección de García-Alonso, de la ENCRyM. De esta especie se trabajaron 2 pseudobulbos, uno joven recolectado en marzo y uno maduro recolectado en junio, figura 3.3.A).
- *Laelia speciosa* el ejemplar provino de la colecta en Hualula, Hidalgo 2016, figura 3.3.B).
- *Cyrtopodium macrobulbon* el ejemplar provino de la colecta en San Andrés de la Cal, Morelos 2016, figura 3.3.C).
- Goma de nopal provino de "El llanito, Guanajuato".
- Goma sandarak de la marca Kremer.

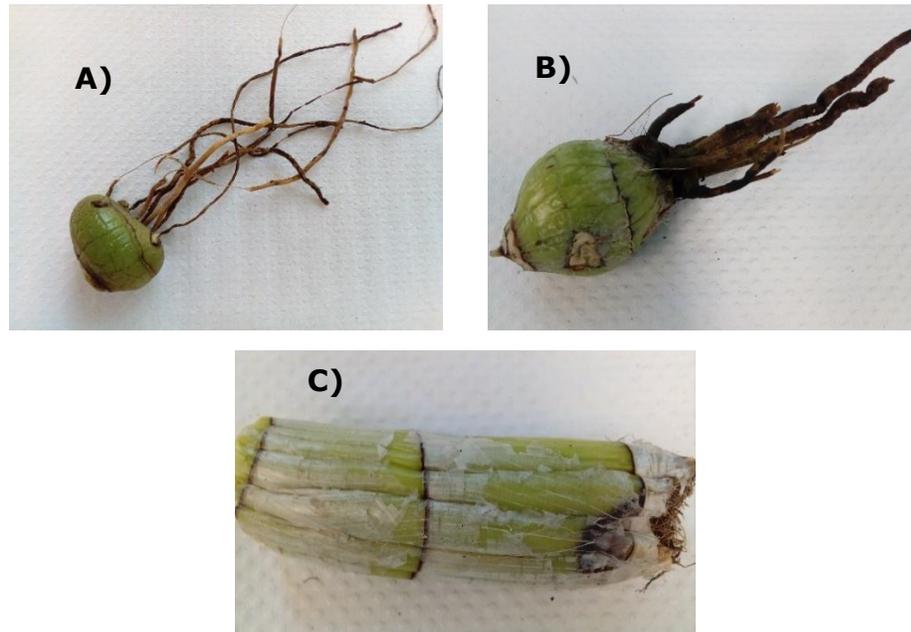


Figura 3.3 Pseudobulbos de: A) *Bletia campanulata*, B) *Laelia speciosa* y C) *Cyrtopodium macrobulbon*

2.5 Muestras de patrimonio cultural

- Laúd de madera de pino, colección del Gran Nayar del Museo Nacional de Antropología. Fue adquirido por Alfonso Soto Soria en 1964, procedió de San Sebastián, Mezquitic, Jalisco.

- Laúd huichol de madera de pino “Kanari Wixarika” es parte de la colección de instrumentos del Seminario Taller de Conservación y Restauración de Instrumentos Musicales (STOCRIM) en la ENCRyM. Fue adquirido por Sandra María Álvarez Jacinto en 2013, provino de México, Gran Nayar, Jalisco, Mezquitic, Keruwitia “las latas”.

2.6 Sistema cromatográfico

Se utilizó un cromatógrafo de gases (figura 3.4) con un detector de ionización de flama (*Agilent 7890B*, automuestreador 7693), con un puerto de inyección *split/splitless* y He como gas acarreador. La adquisición y tratamiento de datos se hizo con el *software Open Lab CDS*.

Se determinaron experimentalmente los parámetros cromatográficos de la columna, previo a realizar los análisis de los azúcares derivatizados. Se preparó una disolución que contuviera algunos de los compuestos con los que el fabricante (Agilent Technologies) evaluó la columna, para ello se utilizó la disolución patrón MDL, que contiene tridecano (C_{13}), tetradecano (C_{14}), pentadecano (C_{15}) y se le agregó 1-dodecanol. Para evaluar el tiempo muerto se inyectó gas butano. Las condiciones de análisis fueron las mismas que reporta el certificado de desempeño de la columna, la fase móvil utilizada fue He, a un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue 275 °C, modo *splitless*, la temperatura del detector fue 325 °C. Se realizó un análisis isotérmico a 135 °C.



Figura 3.4 Cromatógrafo de gases *Agilent 7890B*, utilizado en el análisis experimental.

2.7 Método cromatográfico para el análisis de carbohidratos

El análisis cromatográfico se realizó con base en el método propuesto por Peña y colaboradores, se hicieron ajustes de acuerdo con las características de la instrumentación con la que cuenta el LANCIC. La fase móvil utilizada fue He, a un flujo de 2 mL/min. La temperatura del inyector fue 280 °C, modo *splitless*, la temperatura del detector fue 300 °C. Se utilizó un programa de temperatura (figura 3.5) iniciando en 40 °C durante 0 min, incrementando a 15 °C/min hasta 150 °C, volviendo a incrementar a 4 °C/min hasta 170 °C, y finalmente incrementando a 8 °C/min hasta 280 °C durante 5 min. Se inyectó 1 μ L de la muestra.

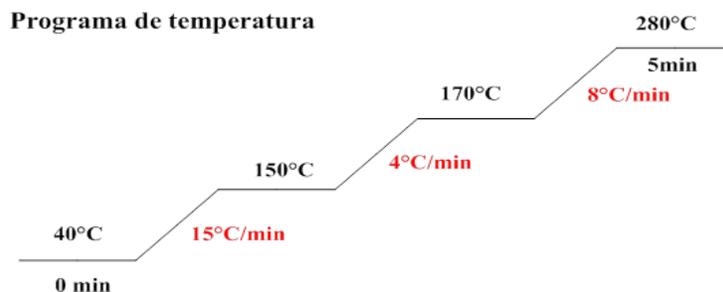


Figura 3.5 Programa de temperatura para el método cromatográfico.

2.8 Controles

Con el fin de evaluar que la señal electrónica del sistema cromatográfico, del disolvente y las señales provenientes de los reactivos utilizados en la derivatización, no interfirieran con las señales provenientes de las muestras, en cada análisis se inyectaron 3 blancos: blanco electrónico, de disolvente y de reactivos. El blanco electrónico se realizó inyectando 1 μL de aire de un vial vacío, para el blanco de disolvente se inyectó 1 μL de isoctano y para el blanco de reactivos, se hizo todo el procedimiento de preparación de muestra (hidrólisis y derivatización) y se inyectó 1 μL de la disolución resultante.

2.9 Evaluación de la precisión del método

En tres días diferentes se realizó la extracción e hidrólisis de los polisacáridos de las tres orquídeas estudiadas, siguiendo la misma metodología que se presenta en la sección 2.10.3 después se procedió a realizar la derivatización como se indica en la sección 2.10.2. Se obtuvieron los perfiles cromatográficos y se evaluó la precisión del método calculando la desviación estándar.

2.10 Preparación de las muestras

2.10.1 Preparación de las disoluciones

Se preparó una disolución de H_2SO_4 0.05 M tomando 0.4 mL de una disolución de H_2SO_4 al 98% m/v y se llevó a un volumen de 100 mL con agua desionizada. La disolución de NaOH 2 M se preparó pesando 2 g de esta sustancia y disolviendo en un volumen de 25 mL.

Para la disolución de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ al 2.5 % m/v se pesaron 1.25 g del reactivo y se disolvió en un volumen de 50 mL de piridina.

2.10.2 Obtención de los derivados sililados de los estándares

De cada estándar de azúcar se pesó en un vial de reacción, aproximadamente 5 mg. Posteriormente se derivatizaron cada uno de los azúcares adicionando 500 μL de clorhidrato de hidroxilamina en piridina al 2.5 %m/v. La disolución se calentó a 80 °C en un horno durante 15 minutos posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 450 μL hexametildisilazano y 50 μL de TFA. Esta mezcla se calentó a 80°C durante 15 minutos. Pasado el tiempo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se liberó el amoniaco generado. Finalmente se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso AP (N_2). Se realizó una extracción de los compuestos derivados con 4 mL de isooctano y finalmente se inyectó 1 μL al cromatógrafo de gases.

Preparación de la mezcla de estándares: en un vial de inyección se colocaron 100 μL de cada uno de los estándares derivatizados, se agitaron y se inyectó 1 μL al cromatógrafo de gases.

2.10.3 Extracción e hidrólisis parcial de polisacáridos en orquídeas

Se lavó con agua cada uno de los pseudobulbos de las tres especies de orquídeas, se retiró el tejido epidérmico y se cortó en varios fragmentos, para obtener directamente el mucílago de cada orquídea. Los pedazos de pseudobulbos obtenidos se muestran en la figura 3.6.



Figura 3.6 Pseudobulbos limpios: A) *Bletia campanulata*, B) *Laelia speciosa* y C) *Cyrtopodium macrobulbon*.

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de pseudobulbo y se colocaron en un vial de reacción, se añadieron 4 mL de la disolución de H₂SO₄ 0.05 M y se calentó a 80 °C durante 2 horas 30 minutos. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó el exceso de ácido con una disolución de NaOH 2 M.

La disolución anterior se transfirió a tubos *ependorf* de 1 mL, cada uno de ellos se congeló con un baño de hielo seco/acetona y se colocaron en el ultraconcentrador durante 6 horas. Se obtuvo un polvo fino blanco, que fue transferido a un vial de reacción (ver figura 3.7).



Figura 3.7 Mucílago de *Cyrtopodium macrobulbon* seco.

El residuo seco, que contiene los polisacáridos, se derivatizó como se describe en la sección 2.10.2.

Se practicó el mismo análisis para los dos pseudobulbos de la especie *Bletia campanulata*, recolectados en el mes de marzo el “pseudobulbo joven” y en el mes de julio el “pseudobulbo maduro”.

2.10.4 Extracción e hidrólisis parcial de polisacáridos en muestras de patrimonio cultural

Como se puede apreciar en la imagen 3.8, la muestra proporcionada es un trozo de madera, donde se supone hay presencia del adhesivo *tzauhtli*, por ello se tomó muestra de 2 regiones, una en donde se apreciaba un recubrimiento ligeramente blanco y otra donde se veía limpia la superficie de la madera. Se rasparon ambas superficies y se pesaron 10 mg de cada una, los cuales se colocaron en un vial de reacción para realizar la preparación de la misma forma que en la sección 2.10.3 y 2.10.2.



Figura 3.8 Laúd de la colección "El gran Nayar" (arriba), muestras tomadas para el análisis (abajo).

Para el análisis de polisacáridos en la segunda muestra de patrimonio cultural, laúd huichol de madera de pino "Kanari Wixarika", debido a la pequeña muestra con que se contaba (como puede observarse en la figura 3.9), se pesó toda ella (4 mg) en un vial de reacción para realizar la preparación como se indica en la sección 2.10.3 y 2.10.2.

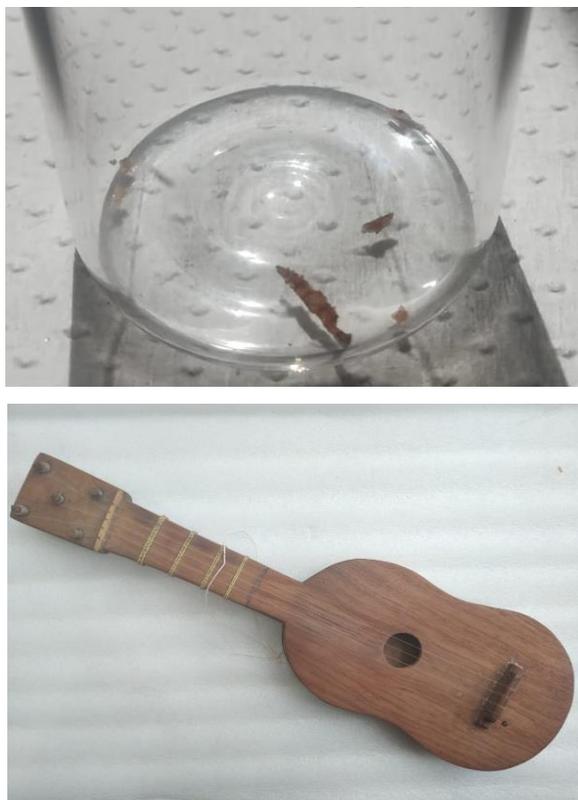


Figura 3.9 Muestra laúd de madera de pino "Kanari Wixarika".

2.10.5 Extracción e hidrólisis parcial de polisacáridos en gomas

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de las tres muestras de gomas. Para el proceso de extracción e hidrólisis se siguió la misma metodología presentada en la sección 2.10.3, la derivatización de los carbohidratos extraídos se llevó a cabo como se indica en la sección 2.10.2.

Capítulo 3 . Resultados y discusión

3.1 Evaluación del sistema cromatográfico

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos de los parámetros evaluados: tiempo de retención (t_r), factor de retención (k'), platos teóricos por metro (N/m), selectividad (α) y resolución (R_s). Los valores obtenidos de t_r , k' y (N/m) se compararon con respecto al valor de referencia del certificado de la columna usada en este trabajo, resultando ser muy parecidos los datos obtenidos en el laboratorio. El tiempo muerto fue de 0.66 minutos.

Se puede observar que los valores experimentales de α y R_s para el par C₁₅ y 1-dodecanol, indican que hay una adecuada separación, comparando con los datos que proporciona el certificado. De acuerdo con los datos obtenidos, se determinó que el sistema es adecuado para realizar las separaciones cromatográficas.

Tabla 3 Parámetros cromatográficos calculados para la evaluación del sistema.

Estándar	t_r experimental min	t_r referencia min	k' experimental	k' referencia	α	R_s	N	Platos teóricos/metro (N/m)	
C ₁₃	2.206	2.388	2.337	2.220	-	-	-	Experimental 2853	Certifica- do 3677
C ₁₄	3.214	3.520	3.862	3.750	-	-	-		
1-dodecanol	4.041	4.448	5.113	5.000	1.66	8.79	34235		
C ₁₅	4.894	5.408	6.404	6.290					

3.2 Controles

Los cromatogramas obtenidos de los controles (blanco electrónico, blanco de disolventes y blanco de reactivo) se presentan en la figura 4.0. Mediante estos controles se determinó que a partir del minuto 2.5, las señales detectadas corresponden a la muestra analizada.

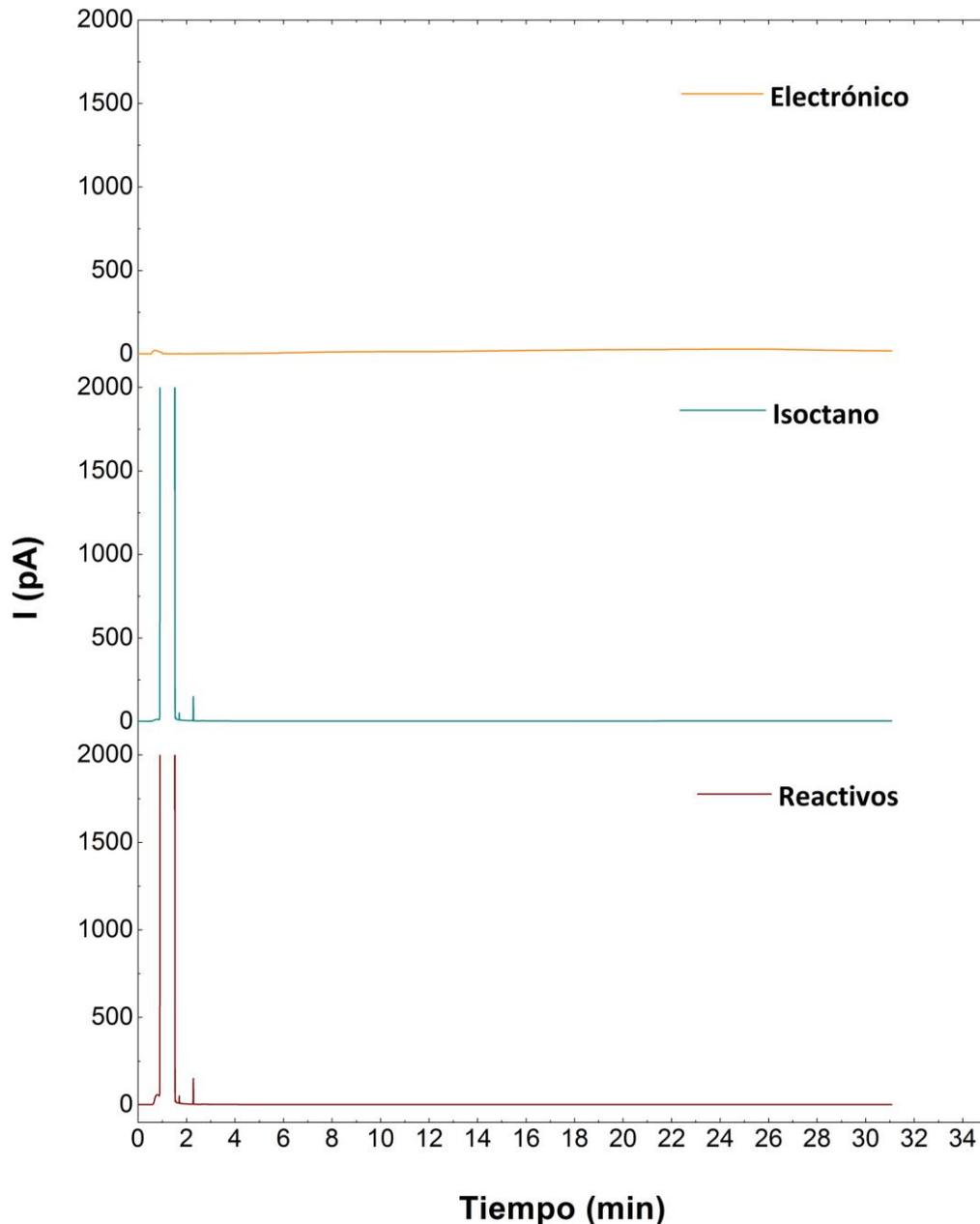


Figura 4.0 Cromatogramas de los blancos evaluados.

3.3 Análisis cromatográfico de los estándares de carbohidratos

El tratamiento de los estándares comenzó con la etapa de derivatización. Al añadir la disolución de clorhidrato de hidroxilamina en py, se pudo observar que después del calentamiento se logra disolver el estándar. Con la adición de HDMS y TFA se forma un precipitado de color amarillo paja de consistencia pastosa (lo más

probable es que sea una sal de py ya que está en exceso). Sin embargo, la extracción con isooctano del analito derivatizado resultó ser una disolución homogénea e incolora.

A continuación, en las figuras 4.1 a 4.6 se presentan los cromatogramas correspondientes a los estándares de los monosacáridos derivatizados.

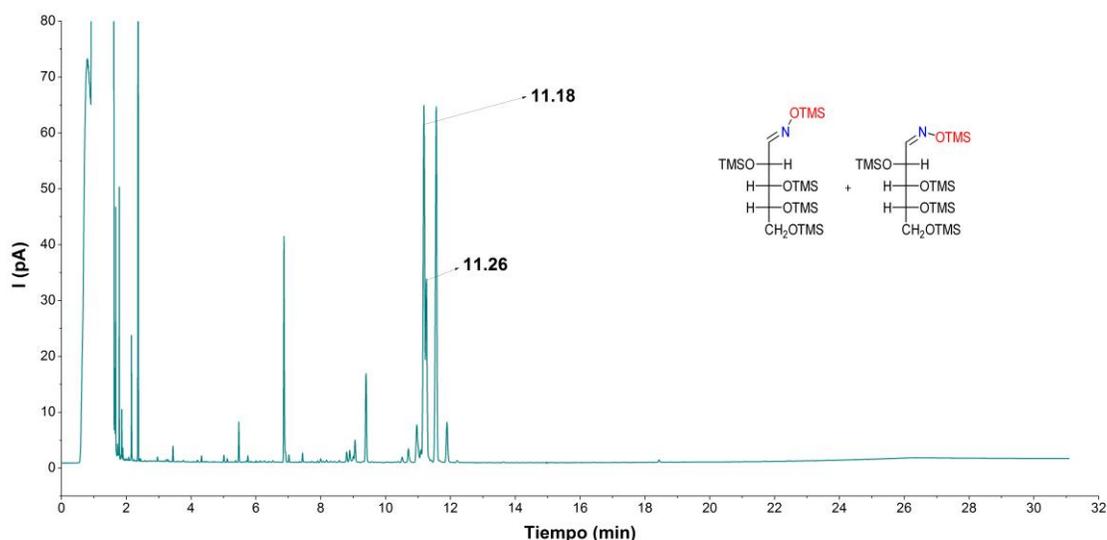


Figura 4.1 Cromatograma del derivado Ox-TMS de arabinosa.

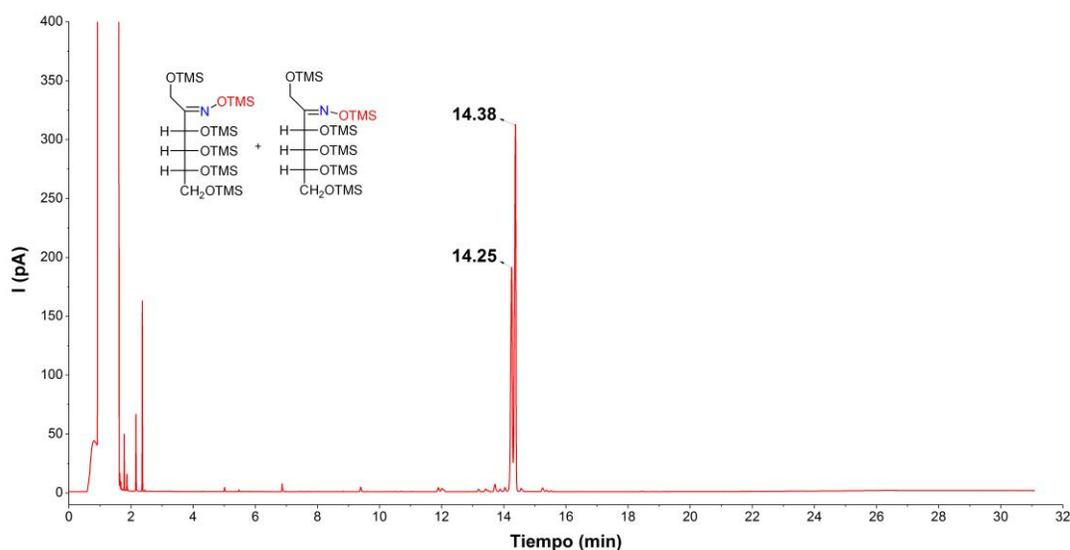


Figura 4.2 Cromatograma del derivado Ox-TMS de fructosa.

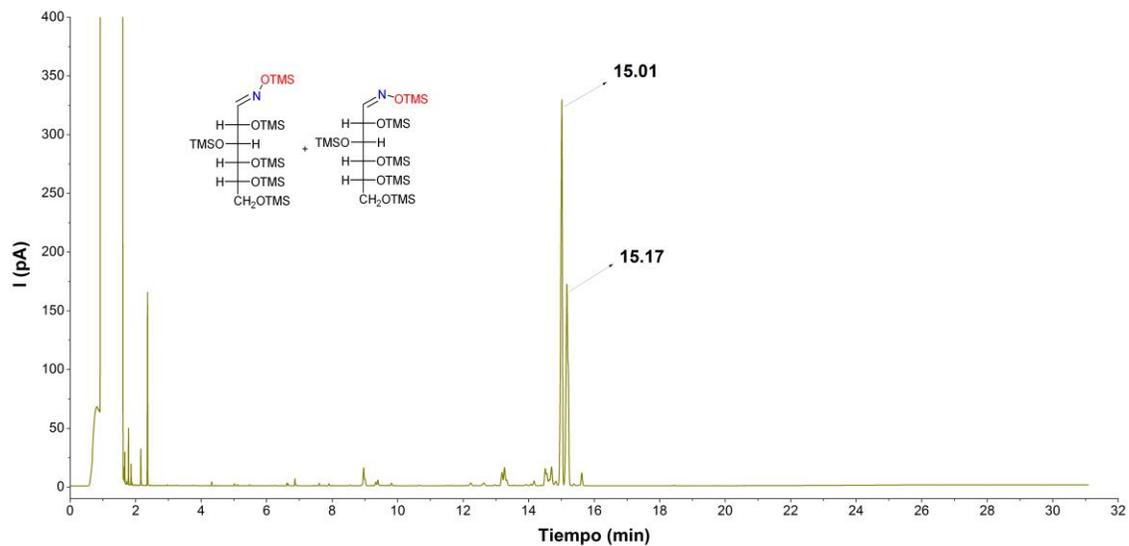


Figura 4.3 Cromatograma del derivado Ox-TMS de glucosa.

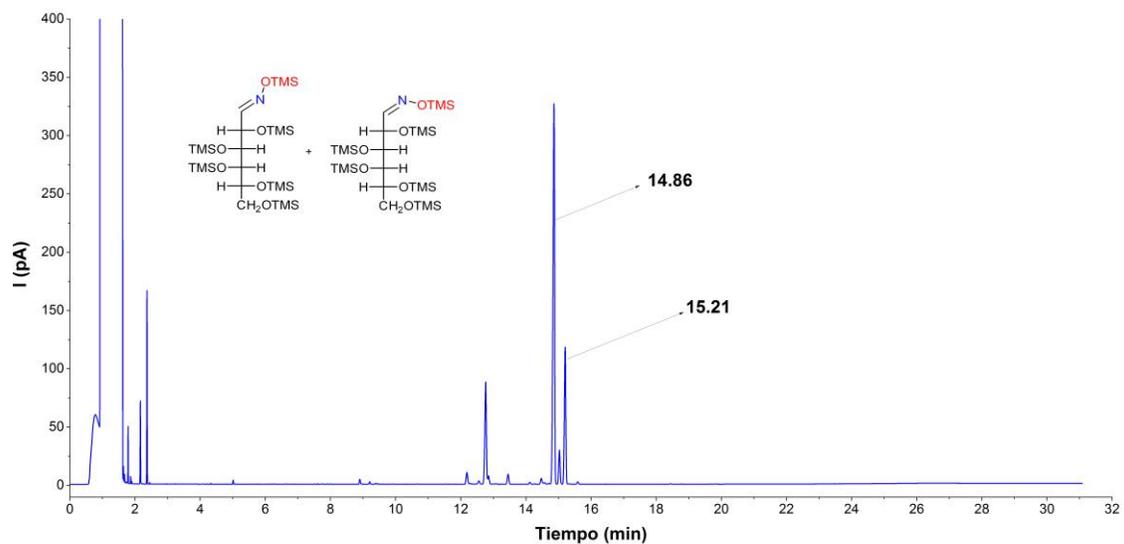


Figura 4.4 Cromatograma del derivado Ox-TMS de galactosa.

En la serie de cromatogramas que corresponden a las figuras 4.1-4.4 se observan dos picos en mayor proporción, con respecto a las demás señales. Se observan algunas señales de menor intensidad, probablemente impurezas. Los dos picos mayoritarios corresponden a los monosacáridos derivatizados en su forma *syn* y *anti*, que de acuerdo con el trabajo de Sweeley (Adams, Chen, Landman, &

Colmer, 1999) los azúcares inicialmente son convertidos en oximas a partir de una reacción con hidroxilamina en piridina y después en la reacción con HDMS y ácidos orgánicos forman los derivados de trimetilsilano (Ox-TMS). Los productos de estas reacciones se presentan en cada uno de los cromatogramas. Debido a la formación de la oxima se producen dos isómeros geométricos *syn* y *anti*, por lo tanto, se infiere que el impedimento estérico del derivado *anti* provocará menor interacción de las moléculas y de esta forma la volatilidad del derivado aumentará. En consecuencia, este compuesto es el que eluye primero.

La derivatización, para los monosacáridos implica la formación de una oxima. Para que esto ocurra es fundamental que exista un grupo carbonilo, ahí se llevará a cabo la condensación con la hidroxilamina. En la sacarosa y la rafinosa no ocurre la reacción de oximación debido a la ausencia del grupo carbonilo, en estos carbohidratos solo ocurre la reacción de sililación.

Para el caso de los di y trisacáridos, se puede observar solo un pico (figura 4.5 y 4.6) correspondiente al estándar sililado en todas las posiciones donde encuentre al grupo hidroxilo.

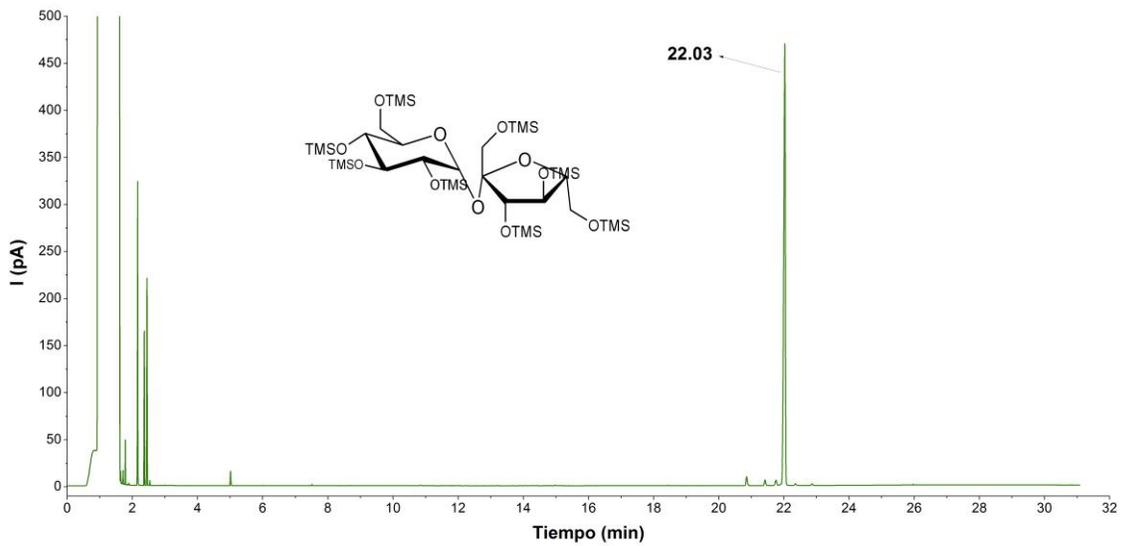


Figura 4.5 Cromatograma del derivado sililado (TMS) de sacarosa.

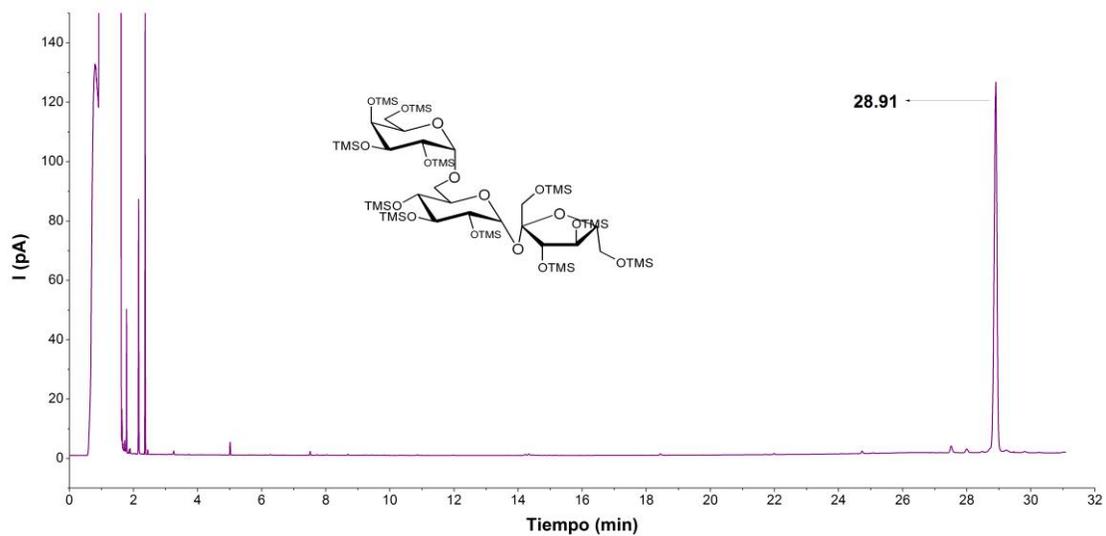


Figura 4.6 Cromatograma del derivado sililado (TMS) de rafinosa.

La figura 4.7 muestra el cromatograma de una disolución de la mezcla de los estándares utilizados.

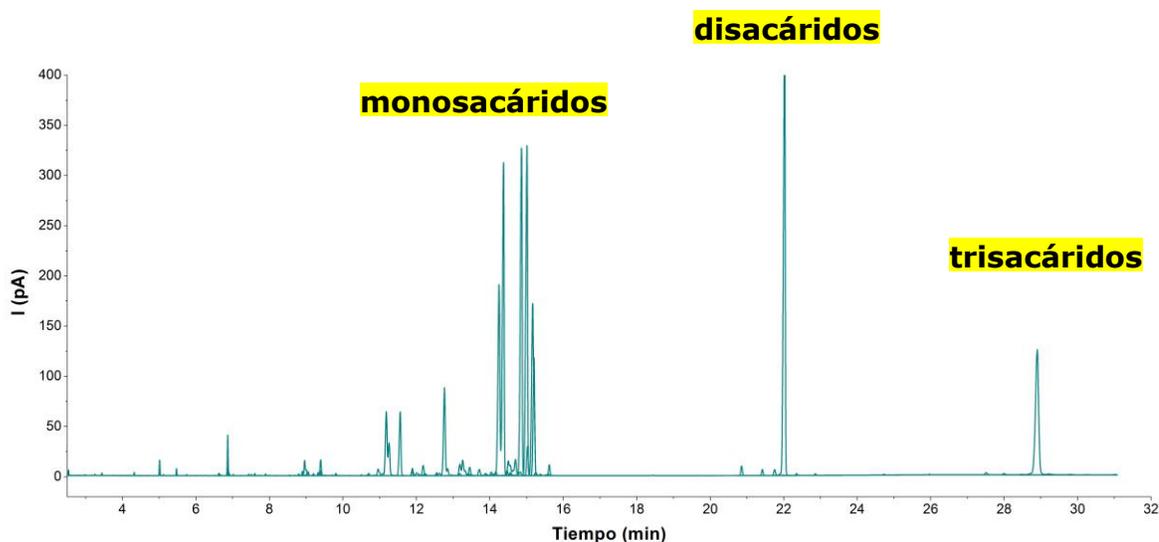


Figura 4.7 Cromatograma de una disolución de los estándares derivatizados.

Los tiempos de retención de cada uno de los estándares y saber el número de unidades monoméricas que representan, sirvió para definir intervalos de tiempo que, permitieron identificar señales de mono, di o trisacáridos.

Para definir estos intervalos se utilizó como referencia el trabajo de A. López. A continuación, en la tabla 4, se muestran los intervalos de tiempo establecidos.

Tabla 4 Tiempo de retención correspondientes a los estándares de azúcares derivatizados.

Carbohidratos	Estándar	t _r / min	Intervalo de tiempo/min
Monosacáridos	Arabinosa-Ox-TMS- <i>anti</i>	11.18	11.00-16.00
	Arabinosa-Ox-TMS- <i>syn</i>	11.26	
	Fructosa-Ox-TMS- <i>anti</i>	14.25	
	Fructosa-Ox-TMS- <i>syn</i>	14.38	
	Glucosa-Ox-TMS- <i>anti</i>	15.01	
	Glucosa-Ox-TMS- <i>syn</i>	15.17	
	Galactosa-Ox-TMS- <i>anti</i>	14.86	
	Galactosa-Ox-TMS- <i>syn</i>	15.21	
Disacáridos	Sacarosa-TMS	22.03	22.00-25.00
Trisacáridos	Rafinosa-TMS	28.91	28.00-31.00

3.4 Precisión del método

Se realizaron tres ensayos en diferentes días para calcular la precisión intermedia de la metodología utilizada. Como ejemplo, en la figura 4.8, se muestra el perfil cromatográfico de la especie *C. macrobulbon*. Se observó que los picos correspondientes a los monosacáridos tienen la misma intensidad y resolución. En la región de los disacáridos, en los 3 cromatogramas solo se observa la señal de la sacarosa y la señal de los trisacáridos es muy baja. Se observó lo mismo para las otras 2 especies.

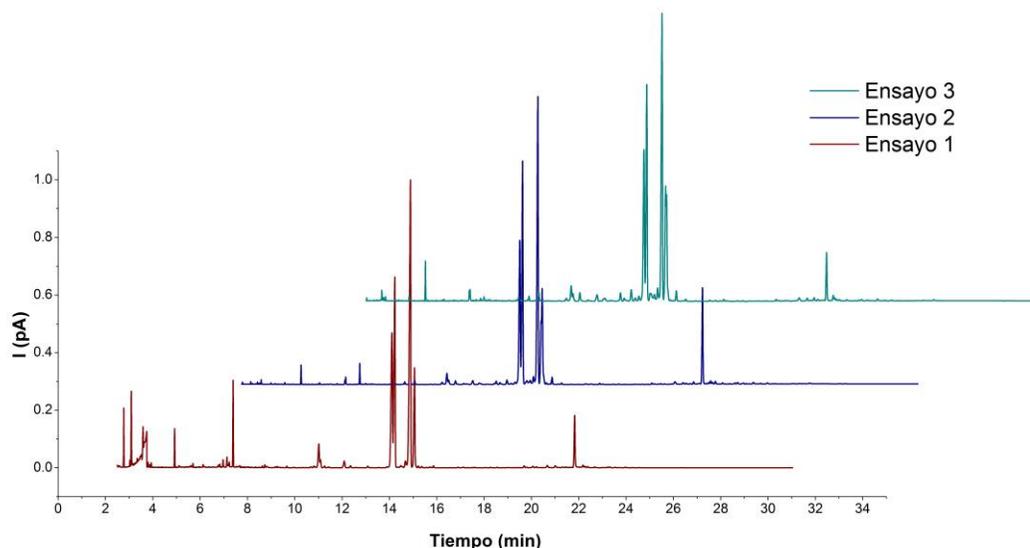


Figura 4.8 Perfiles cromatográficos de la especie *C. macrobulbon*.

3.5 Muestras de pseudobulbos de orquídeas

El primer estudio del *tzauhtli*, se hizo con la especie *Bletia campanulata* (Peña, Capella, & González, 1995), es por ello por lo que se comenzó a reproducir el método de preparación de muestra y adaptar el método cromatográfico con esta especie de orquídea. Posteriormente se aplicó el método a las otras dos especies que también ha sido parte de estudios de adhesivos naturales (López, 2009) *Laelia speciosa* y *Cyrtopodium macrobulbon*.

Comenzando con la descripción física del pseudobulbo de las especies *B. campanulata* y *L. speciosa* se observó, en ambas, que al retirar el tejido epidérmico la superficie estaba húmeda y presentaban poros finos y pequeños.

Al realizar la preparación de la muestra, el primer paso fue hacer la hidrólisis del mucílago. Una vez terminada la reacción, se observó que el medio acuoso no presentaba coloración, pero al neutralizar el exceso de ácido cambiaba a un color amarillo paja, es posible que entre los componentes de la extracción uno de ellos presente propiedades similares a un indicador ácido-base.

Después de evaporar el agua en el ultraconcentrador, se obtuvo un polvo fino color blanco. Al añadir la disolución de clorhidrato de hidroxilamina al vial de reacción, se formó un gel. Posterior a el proceso de derivatización se formó un precipitado color amarillo tenue, muy probablemente sea la sal de piridina. Finalmente, en la extracción con isooctano se obtuvo una disolución incolora.

En el caso del *C. macrobulbon*, la apariencia física del pseudobulbo de esta especie no era parecido a los anteriores, como se pudo observar en la figura 3.6. Es un tallo alargado y de consistencia fibrosa después de haber quitado el tejido epidérmico. Al neutralizar, después de la hidrólisis, también presentó una coloración amarillenta, y posteriormente al secar el medio acuoso, se obtuvo un polvo fino color blanco. La apariencia de las disoluciones en el proceso de derivatización y la extracción con isooctano fue muy similar a las otras 2 orquídeas.

En la figura 4.9 se muestran los perfiles cromatográficos de las 3 especies de orquídeas estudiadas. En los cromatogramas se resaltan los intervalos determinados para monosacáridos (M), disacáridos (D) y trisacáridos (T).

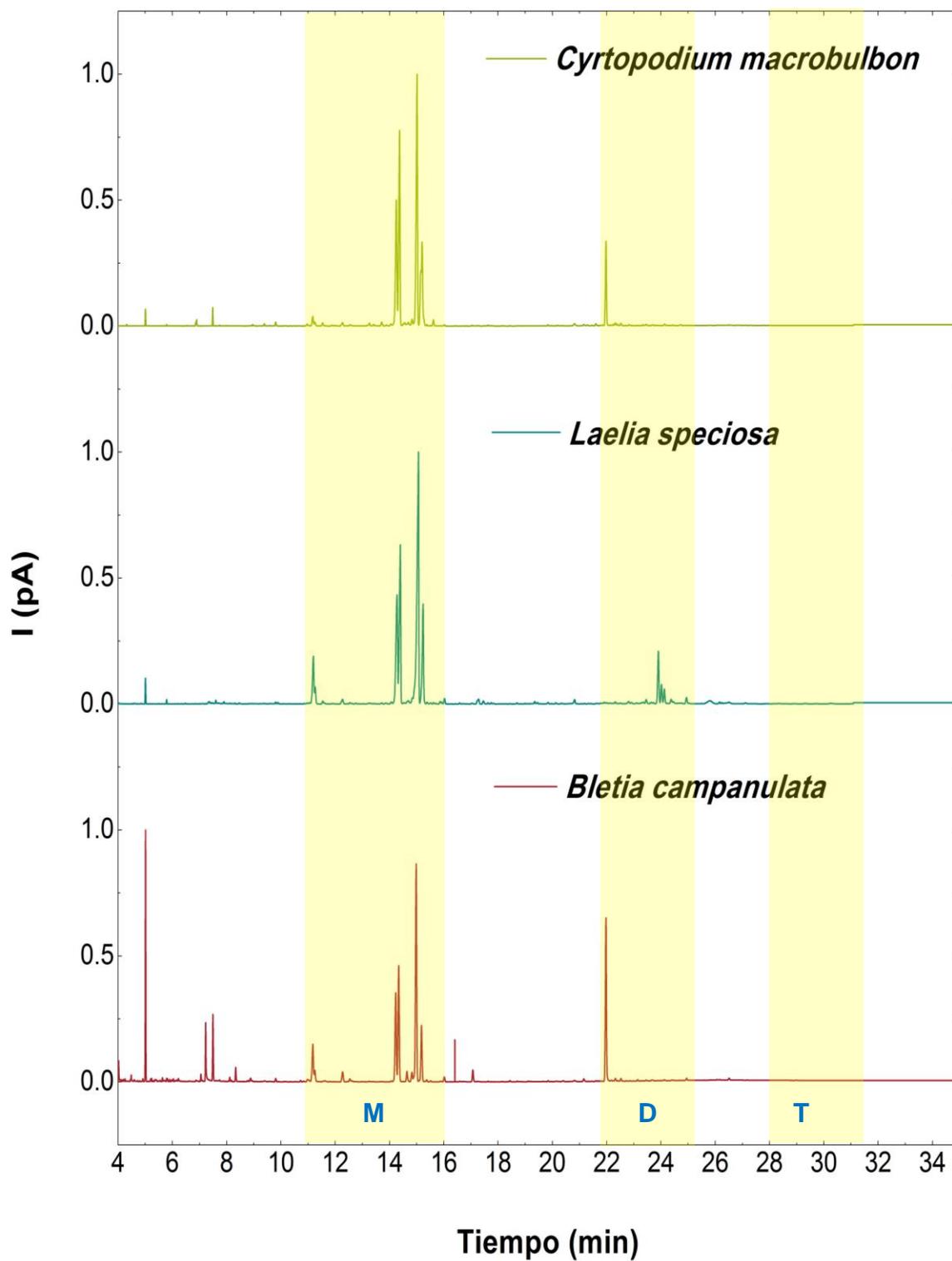


Figura 4.9 Perfiles cromatográficos de las orquídeas estudiadas.

En la tabla 5 se muestra el porcentaje en área que representa la presencia de mono, di y trisacáridos. El porcentaje mayoritario lo tiene la parte correspondiente a la región de los monosacáridos, así que este parámetro puede ser útil al comenzar con la distinción entre ellas ya que como se observa en la tabla son diferentes. Véase ahora como es más evidente esta diferencia en la región de los disacáridos entre las 3 especies, siendo *B. campanulata* la que mayor porcentaje tiene. Entre *C. macrobulbon* y *L. speciosa* el porcentaje de los disacáridos es cercano, pero observando el cromatograma el perfil de los disacáridos es diferente en la *L. speciosa* con respecto al perfil de la *B. campanulata* y el *C. macrobulbon*. Finalmente, para la región de los trisacáridos las tres especies tienen porcentajes bajos.

Tabla 5 Porcentaje de área de las regiones de carbohidratos de las tres orquídeas.

Muestra	Monosacáridos % (s)	Disacáridos %(s)	Trisacáridos %(s)
<i>Cyrtopodium macrobulbon</i> (n=5)	92.91 (±0.07)	7.00(±0.08)	0.10(±0.01)
<i>Laelia speciosa</i> (n=5)	87.09(±1.03)	11.93(±1.32)	0.97(±0.12)
<i>Bletia campanulata</i> (n=5)	77.17(±0.22)	21.95(±0.21)	0.88(±0.01)

n= número de repeticiones s= desviación estándar

Las proporciones de los carbohidratos son un primer acercamiento para diferenciar los mucílago, esta observación indica que cada especie presenta una cantidad específica de las unidades monoméricas en la estructura del polisacárido.

En las tres especies se tienen en común los monosacáridos: arabinosa, fructosa, glucosa y galactosa. Además, en la región de tiempo de los disacáridos en *B. campanulata* y *C. macrobulbon* se detectó sacarosa, en *L. speciosa* no se observó la presencia de este

disacárido, aparecen otras señales en un tiempo de retención mayor al de la sacarosa, lo que indica que puede haber otros disacáridos o algún otro componente del mucílago.

3.6 Comparación del perfil cromatográfico de un pseudobulbo "joven" y uno "maduro"

En los testimonios de artesanos de instrumentos musicales mencionan que hay periodos en el año donde el mucílago tiene mejor desempeño como adhesivo y todo esto parece indicar que se atribuye a que se extrae de pseudobulbos jóvenes. En la tabla 6 se muestran los carbohidratos identificados para cada especie, además de mostrar para *B. campanulata* dos columnas, identificadas como "pseudobulbo joven" y "pseudobulbo maduro".

Tabla 6 Carbohidratos identificados en las 3 especies de orquídeas estudiadas

<i>Bletia campanulata</i>		<i>Laelia speciosa</i>	<i>Cyrtopodium macrobulbon</i>
Pseudobulbo "joven"	Pseudobulbo "maduro"	Pseudobulbo "joven"	Pseudobulbo "joven"
<input type="checkbox"/> Arabinosa <input type="checkbox"/> Fructosa <input type="checkbox"/> Glucosa <input type="checkbox"/> Galactosa <input type="checkbox"/> Sacarosa	<input type="checkbox"/> Arabinosa <input type="checkbox"/> Fructosa <input type="checkbox"/> Glucosa <input type="checkbox"/> Galactosa	<input type="checkbox"/> Arabinosa <input type="checkbox"/> Fructosa <input type="checkbox"/> Glucosa <input type="checkbox"/> Galactosa	<input type="checkbox"/> Arabinosa <input type="checkbox"/> Fructosa <input type="checkbox"/> Glucosa <input type="checkbox"/> Galactosa <input type="checkbox"/> Sacarosa

En el pseudobulbo maduro de *B. campanulata* se observa que no hay presencia de sacarosa. Vipul menciona que la composición química del mucílago se va modificando como lo requiere la planta, esto depende de la estación del año en la que se encuentre y según

necesite producir ciertos nutrientes (Vipul, Girish, Naresh, & Narayan, 2013).

En la figura 5.0 se muestran los cromatogramas obtenidos del pseudobulbo joven y el pseudobulbo maduro de *B. campanulata*, nótese que si hay una diferencia apreciable entre los pseudobulbos.

Es importante mencionar que no se hizo este mismo estudio en las otras 2 especies debido a que la producción de las orquídeas del invernadero es controlada conforme a la NOM-059-SEMARNAT-2010 y no estaban disponibles durante el periodo de tiempo comprendido del presente trabajo.

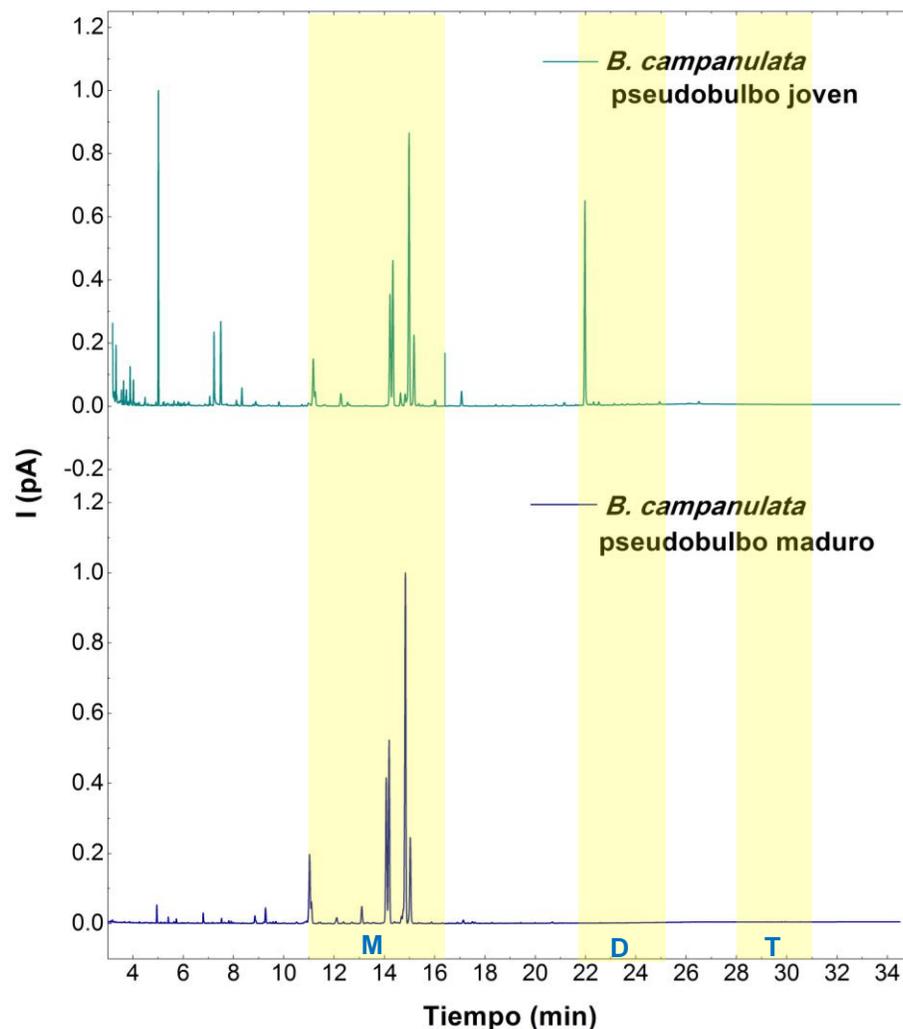


Figura 5.0 Comparación de los perfiles cromatográficos de pseudobulbos de la especie *B. campanulata*

3.7 Muestras de patrimonio cultural

Laúd de la colección "Gran Nayar"

En la sección 2.10.4, la muestra de patrimonio presentaba una superficie blanca, que se identificó como la superficie con el adhesivo natural. Para descartar las señales de los carbohidratos que provengan de la madera, también se analizó un trozo de madera sin recubrimiento. Después de la hidrólisis y extracción se observó que la mayor parte de la madera que se había colocado seguía íntegra, al neutralizar se observó nuevamente una coloración amarilla "paja".

En la figura 5.1 se presentan los perfiles de las muestras. El cromatograma superior muestra el perfil de la madera sin adhesivo y en la parte inferior se muestra el cromatograma de la superficie recubierta con el adhesivo, el cromatograma de la madera ya presenta una cantidad considerable de monosacáridos. Se ha reportado que la composición química en diferentes maderas presenta compuestos similares en diferentes porcentajes, como son lignina (18-35%), celulosa (40-50%) y hemicelulosa (25-35%) (Pettersen, 1984). La hidrólisis realizada puede que esté degradando la celulosa a moléculas de glucosa, obteniendo las señales en la región de los monosacáridos.

En la región de los monosacáridos, se observa un aumento de las señales en comparación con el análisis de la madera sin adhesivo, pero en la zona de los disacáridos y trisacáridos, no hay un cambio apreciable.

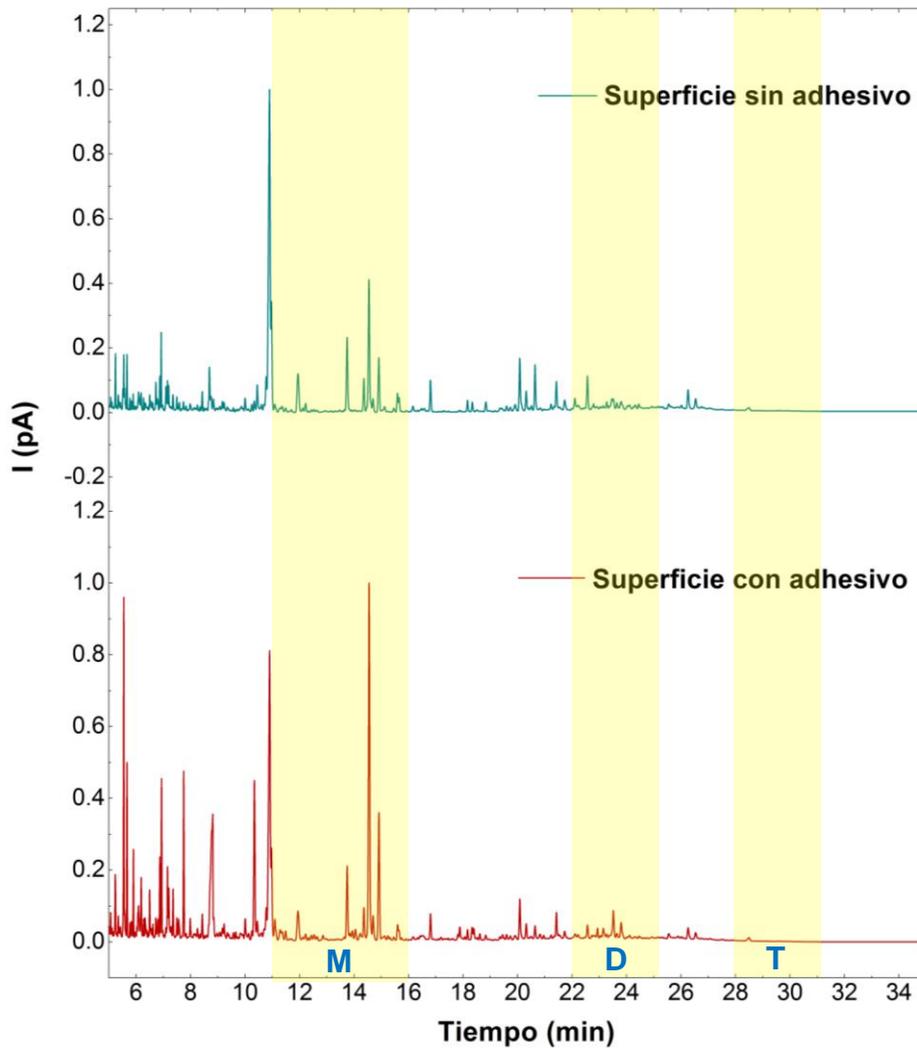


Figura 5.1 Comparación de perfiles cromatográficos para las dos regiones de análisis de la muestra de laúd Gran Nayar.

Los perfiles de las 3 orquídeas estudiadas y la muestra de laúd se presentan en la figura 5.2, tienen en común la presencia de monosacáridos y difieren en su abundancia. Probablemente el adhesivo proviene de alguna orquídea, sin embargo, no podemos especificar aún que orquídea fue utilizada.

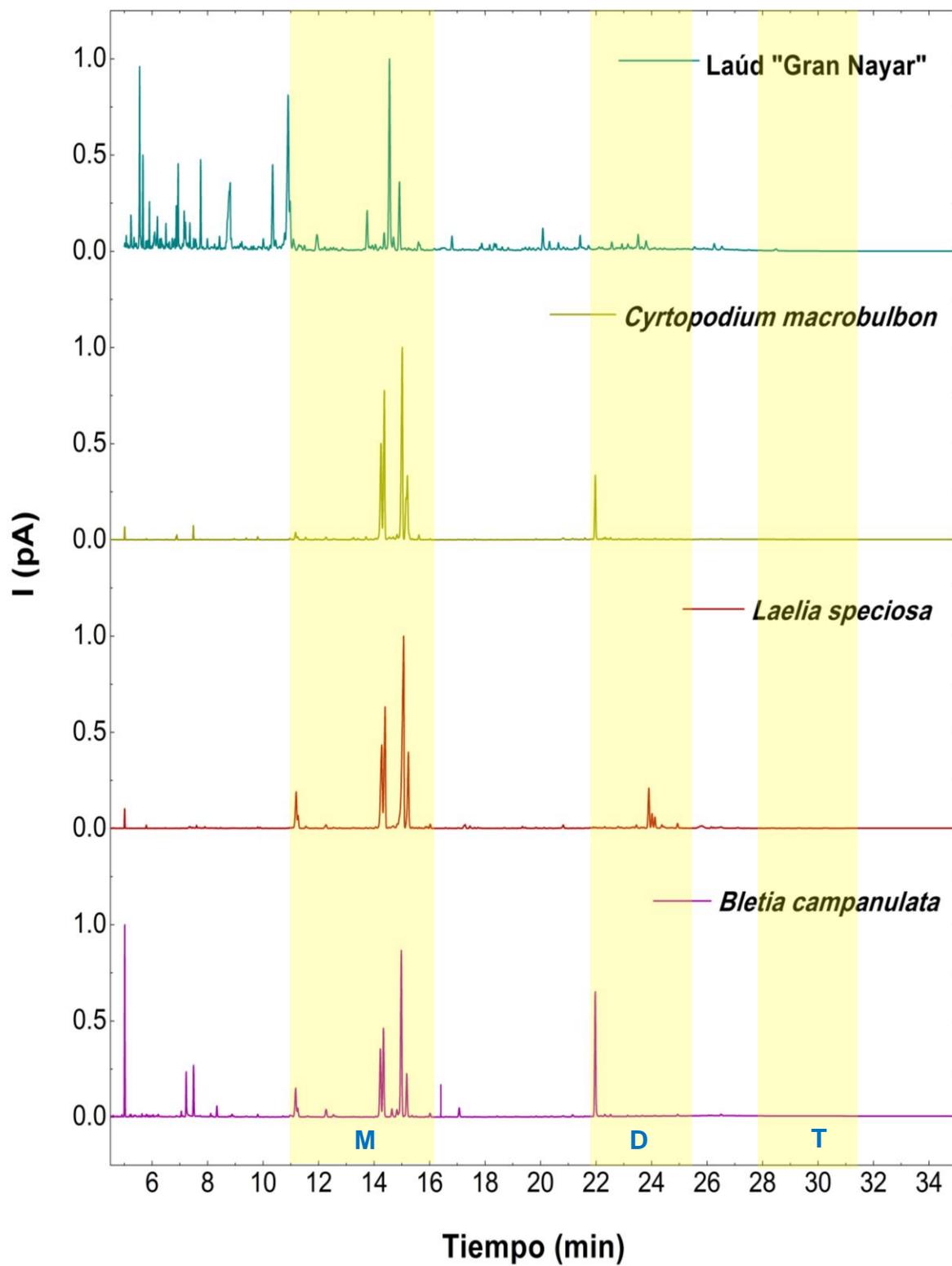


Figura 5.2 Comparación de perfiles de orquídeas con la muestra de laúd Gran Nayar.

Laúd huichol de madera de pino “Kanari Wixarika”

En la sección 2.10.4, se describió que la cantidad de muestra de patrimonio era muy poca, por lo cual solo se realizó el análisis de la muestra de madera con adhesivo.

Se hizo el análisis de toda la muestra con la que se disponía. Al realizar la hidrólisis y extracción la madera no mostró un cambio notable, al neutralizar se observó una coloración amarilla “paja” y se obtuvo un polvo fino de color blanco después de secar la fase acuosa. En la figura 5.3 aparecen los perfiles cromatográficos del mucílago de las orquídeas y de la muestra. En el perfil de la muestra se observa que las señales de los monosacáridos son pequeñas en comparación con la señal intensa en la región de los disacáridos, esta muestra tiene un alto contenido de sacarosa.

Es importante mencionar que este laúd presenta mayor similitud con al menos dos perfiles de orquídeas, *Bletia campanulata* y *Cyrtopodium macrobulbon* por lo que, es muy probable que el adhesivo que se utilizó para ensamblar la muestra sea de origen natural y proveniente de alguna orquídea. Es difícil establecer esta comparación, puesto que, no se tuvo un blanco para discriminar señales, y aun así se observó la similitud de los perfiles.

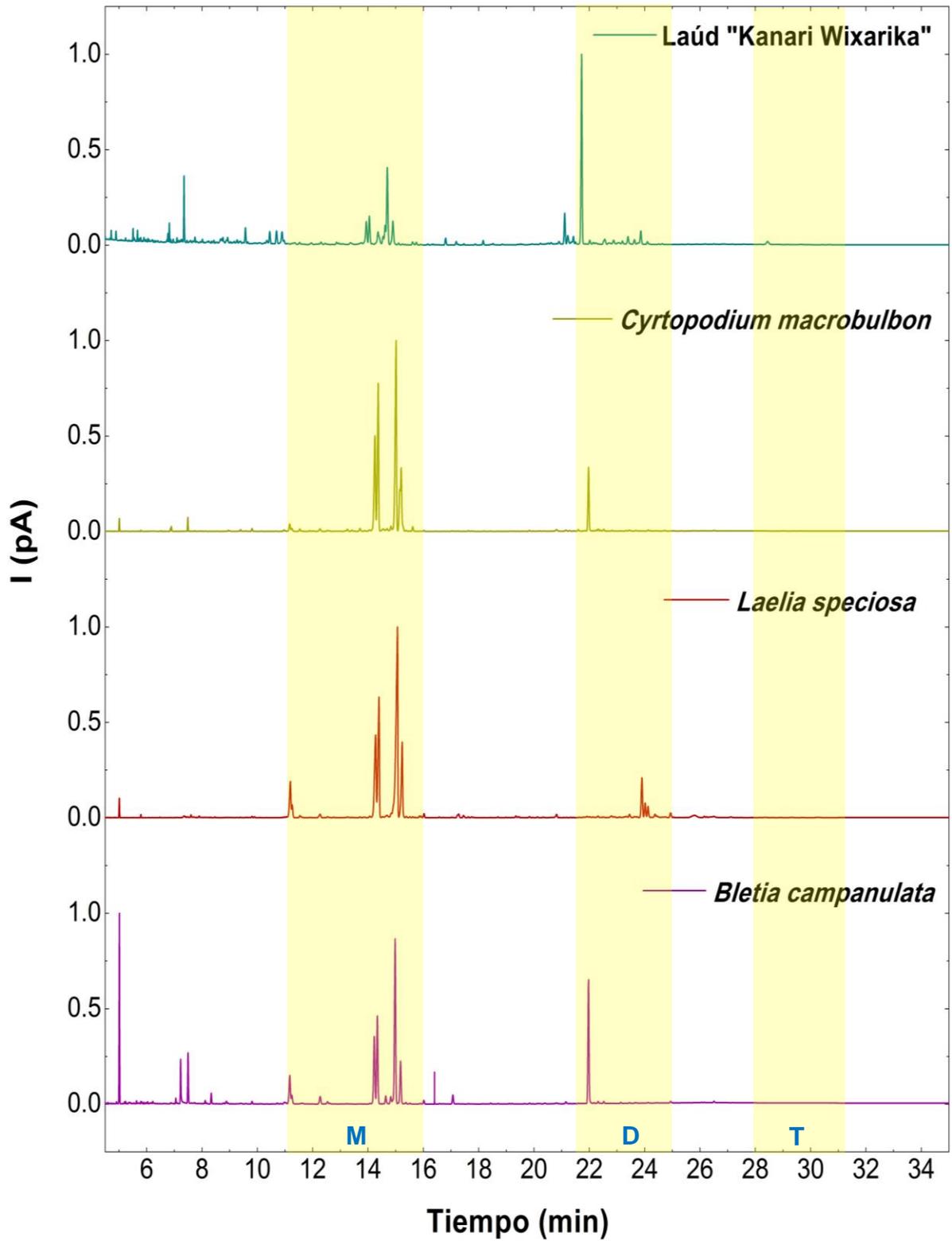


Figura 5.3 Comparación de los cromatogramas de orquídeas con la muestra de laúd Kanari Wixarika.

En la figura 5.4 se presentan los dos perfiles de las muestras de patrimonio cultural, los perfiles son muy diferentes entre sí. Las diferencias se pueden atribuir a diversos factores como: la especie de pino, de donde se obtuvo la madera con la que fueron construidos, la especie de orquídea utilizada y la preparación del adhesivo.

Las comparaciones de las muestras de patrimonio cultural con los perfiles cromatográficos de las orquídeas analizadas no coinciden en su totalidad, pero es comprensible porque solo se analizaron 3 especies, dentro de orquídeas reportadas como productoras de *tzauhtli*.

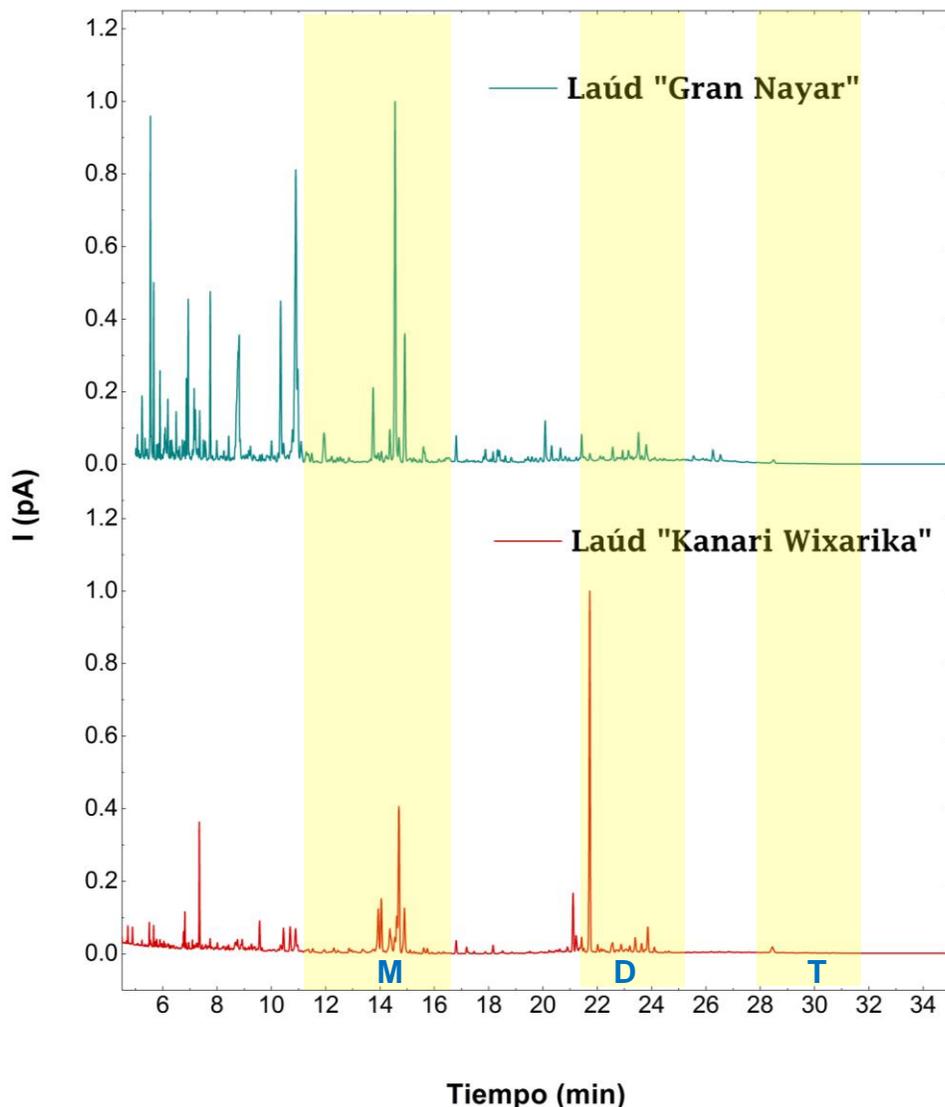


Figura 5.4 Comparación de los perfiles cromatográficos de las muestras de laudes.

3.8 Análisis de gomas

En el trabajo de Peña y colaboradores se menciona que el análisis por CG-DIF de carbohidratos de los mucílagos, obtenidos después de la hidrólisis parcial, permite la caracterización e identificación de diferentes gomas y mucílagos. En su trabajo analiza goma arábica, goma de tragacanto y el mucílago de nopal en las mismas condiciones que el mucílago de orquídea *Bletia campanulata*. De esas gomas y mucílago obtiene los perfiles cromatográficos y se observan perfiles diferentes al del mucílago de la orquídea.

En este trabajo se hizo el análisis de dos gomas con propiedades adhesivas, la goma Sandarak de la marca comercial Kremer (resina de coníferas de los cipreses) y la goma de nopal proveniente de "El llanito", Guanajuato. La intención es comparar los perfiles con el obtenido para las orquídeas y ver si existe diferencia.

En la figura 5.5 se puede observar la serie de cromatogramas que comparan los perfiles de ambas gomas. Puede notarse que, la goma Sandarak presenta señales abundantes en una región donde ninguna de las orquídeas presenta señales. Por otra parte, la goma de nopal presenta una señal intensa que no corresponde a la región de los monosacáridos del mucílago de las orquídeas, en la región de los disacáridos no se puede observar una señal representativa.

Los perfiles de ambas gomas son diferentes a los perfiles de los mucílagos de las orquídeas. Con los resultados obtenidos de este trabajo es posible diferenciar, de manera cualitativa, si un adhesivo natural proviene de orquídeas, nopales o resinas.

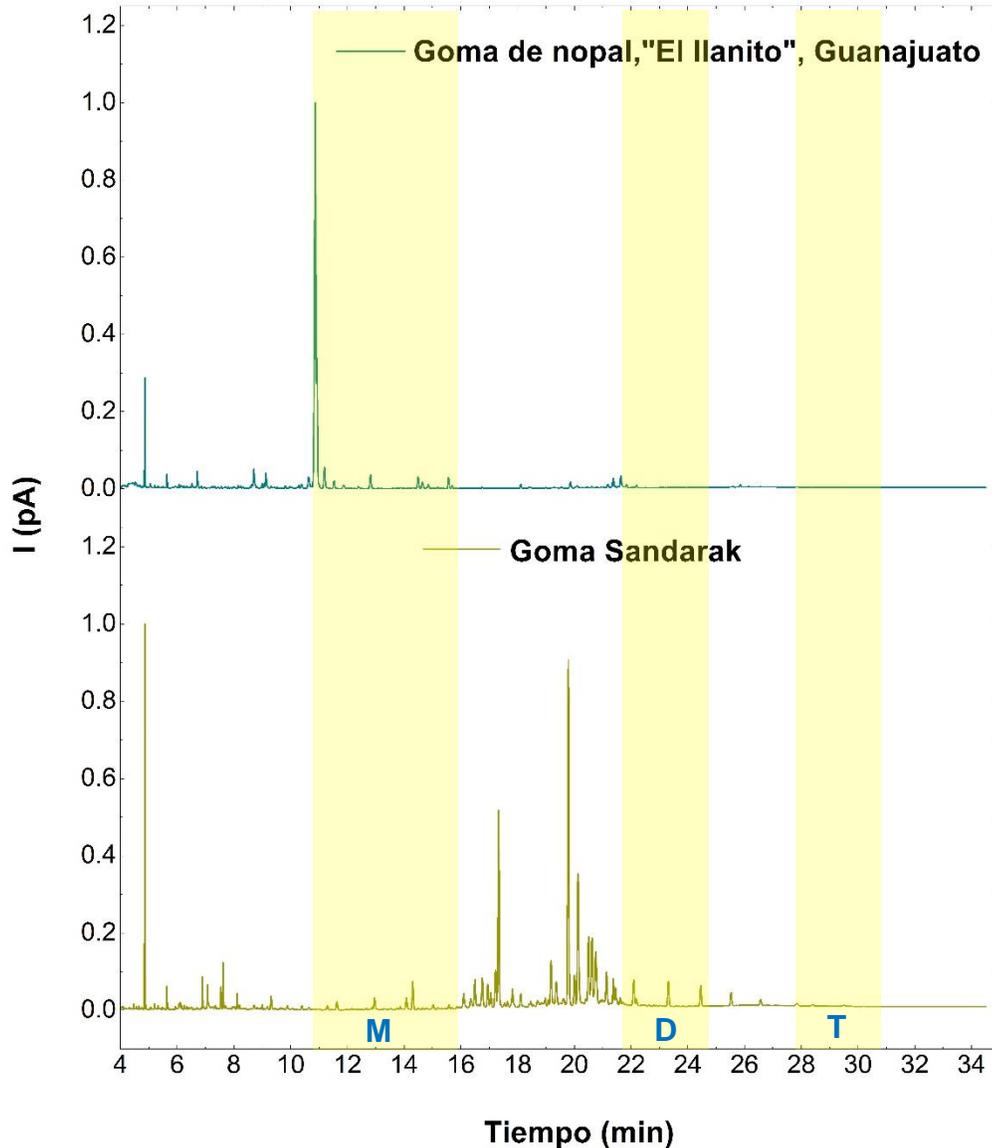


Figura 5.5 Comparación de los perfiles cromatográficos de gomas.

La identificación del *tzauhtli* en alguna pieza de patrimonio cultural, debe considerar el tipo de matriz (madera, textil, papel, etc.), la especie de orquídea que pudo ser utilizada, el tipo de pseudobulbo utilizado en la preparación del *tzauhtli* y el método de obtención. Se observaron diferencias en los perfiles cromatográficos de *Bletia campanulata* y *Laelia speciosa* obtenidos en este trabajo con los obtenidos en los trabajo de la Peña y López; las principales

diferencias se aprecian en la zona de los disacáridos y trisacáridos, en los trabajos de Peña y López, el método de obtención del mucílago se hizo sumergiendo los pedazos del pseudobulbo en agua para después secar ese extracto, molerlo y obtener un polvo blanco, procedimiento utilizado por los aztecas para realizar los mosaicos plumarios (Peña, Capella, & González, 1995). En los instrumentos de cuerda, el mucílago se obtiene de cortar los pseudobulbos de las orquídeas y se emplea este adhesivo en la construcción y reparación de los instrumentos.

Conclusiones

- I. El presente trabajo representa el primer estudio en el que se obtuvo el perfil de carbohidratos que constituyen los mucílagos de las orquídeas *Cyrtopodium macrobulbon*, *Bletia campanulata* y *Laelia speciosa* a corte directo y aplicación inmediata tratando de simular la forma en la que lo ocupan los artesanos de instrumentos musicales.
- II. Se determinaron los tiempos de retención para los derivados Ox-TMS de cada uno de los estándares. Con esto se estableció un intervalo de tiempo para identificar cada región de los monosacáridos y polisacáridos, en el método cromatográfico utilizado.
- III. Se demostró mediante una serie de perfiles cromatográficos de la especie *Cyrtopodium macrobulbon* la repetibilidad de la metodología utilizada.
- IV. Las tres especies de orquídeas presentan en común los monosacáridos: arabinosa, fructosa, glucosa y galactosa. En los mucílagos de los pseudobulbos jóvenes de las orquídeas *B. campanulata* y *C. macrobulbon* está presente la sacarosa.
- V. Existe diferencia con los porcentajes de las proporciones de área entre las tres especies, pero hay similitud entre los carbohidratos identificados en el mucílago de *B. campanulata* y *C. macrobulbon* en la región de mono y disacáridos. De lo anterior se infiere que no existe un solo perfil para el mucílago empleado como *tzauhtli*.

- VI. Se adaptó una metodología útil para diferenciar entre gomas y mucílagos. La interpretación de los resultados debe basarse conociendo detalles de la muestra (tipo de matriz, modo de elaboración del pegamento, región de donde proviene).
- VII. Se confirmó el uso del *tzauhtli* en las muestras de patrimonio cultural, por la presencia de los monosacáridos y disacáridos asociados al mucílago de las orquídeas; sin embargo, no se puede decir aún el tipo de orquídea utilizada.
- VIII. El acceso al material vivo permitió hacer estos experimentos, con ello se apoya al seguimiento de la investigación del *tzauhtli* y se sigue conservando el patrimonio biocultural representando en esta ocasión por las orquídeas.

Perspectivas

- I. Obtener el perfil de los carbohidratos de las mismas especies con las que se trabajaron, pero ahora de diferentes partes de la república. Así mismo, completar el estudio con el perfil de las mismas especies en diferentes periodos de tiempo y determinar el cambio en su composición y proporción de carbohidratos.
- II. Estudiar otras especies de orquídeas mexicanas que, con base en la literatura, se sabe que fueron o son productoras de *tzauhtli*.
- III. Analizar otros materiales en los que se tenga sospecha que se ha utilizado el adhesivo natural de *C. macrobulbon*, por ejemplo, piezas textiles.

Referencias bibliográficas

Anónimo (2015, julio, 19). El ciclo del Carbono- Parte II: La lignina, el carbono recalcitrante recuperado de <http://vidaenelsuelo.blogspot.com/2015/07/el-ciclo-del-carbono-parte-ii-la.html>

Anónimo (2014, febrero, 14). Principles of GC Column Selection recuperado de <https://www.chromacademy.com/Principles-of-GC-Column-Selection.html>

Adams, M., Chen, Z., Landman, P., & Colmer, T. (1999). Simultaneous Determination by Capillary Gas Chromatography of Organic Acids, Sugars, and Sugar Alcohols in Plant Tissue Extracts as Their Trimethylsilyl Derivatives. *Analytical Biochemistry*, 266, 77-84.

Ahuja, S. (2003). *Chromatography and separation science*. Carolina, USA: ACADEMIC PRESS.

Andrews, M. (1989). Capillary gas-chromatographic analysis of monosaccharides: Improvements and comparisons using trifluoroacetylation and trimethylsilylation of sugar O-benzyl- and O-methyl-oximes. *Carbohydrate Research*, 194, 1-19.

Aparisi, J. A. (2015). *Los recursos territoriales valencianos: Bases para el desarrollo*. Universitat de València, 2015.

Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology*. USA: Wiley.

Arroyo, E. (2005). Imagen restaurada historia de la conservación y restauración de pintura de caballete novohispana en México: 1961-2004. (*Tesis de licenciatura*). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Aspinall, G. (1970). *Polysaccharides*. Michigan, USA: Pergamon Press.

Barquero, M. (2006). *Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases*. Universidad de Costa Rica.

Berdan, F., Stark, E., & Sahagún, J. (2009). Production and Use of Orchid Adhesives in Aztec Mexico; the Domestic Context.

Archeological papers of the American Anthropological Association, 19(1), 148-156.

Berger, G. (1972). Testing Adhesives for the Consolidation of Paintings. *Studies in Conservation*, 17(4), 173-194.

Bisulca, C., Odegaard, N., & Zimmt, W. (2016). Testing for Gums, Starches, and Mucilages in Artifacts with O-toluidine. *Journal of the American Institute for Conservation*, 55(4), 217-227.

Bletona, J., Mejanellea, P., Sansoulet, J., Goursaud, S., & Tchaplaa, A. (1996). Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums. *Journal of Chromatography A*, 720, 27-49.

Bodofzt. (2017). *Wikipedia*. Recuperado de https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Bletia_campanulata_flor.jpg

Braithwaite, A., & Smith, F. (1985). *Chromatographic Methods*. England: CHAPMAN & HALL.

Bruice, P. Y. (2016). *Química orgánica*. Mexico; Pearson.

Bruno, E., & Moles, A. (2011). *La química en la restauración: los materiales del arte pictórico*. NEREA.

Campo, E., & Muñoz, R. (2012). Flor de mayo (*Laelia speciosa* (Kunth) Schltr), la estrella de Belén. *Agroproductividad*, 5(3), 3-20.

Carey, F. A. (2016). *Química orgánica*. Mexico: McGraw-Hill.

Caro, H. (2019). Obtenido de <https://www.flickr.com/photos/hugocarococotle/3404896197/lightbox/>

Carranza, C., Maldonado, J., Carrillo, M., & Hernández, A. (2015). Establecimiento del cultivo in vitro de *Cyrtopodium macrobulbon* (orquidácea). *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 1-1, 29-42.

Cazes, J. (2004). *Analytical Instrumentation Handbook*. USA: CRC Press.

Chromedia analytical sciences (2019). Obtenido de <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=sbwgrDsHqnOxmOIIEcCbCoFtFgC&subNav=tmfweDsHqnOxmOIIEcCbCoFtFgChC>

Colibri orquídeas. (2019). Obtenido de https://www.colibriorquideas.com.br/cattleya_amethystoglossa/prod-6201105/

Colombini, M., & Madugno, F. (2009). *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*. Pisa, Italia: WILEY.

CONABIO. (2009). Catálogo taxonómico de especies de México. 1. *In Capital Nat. México*.

Da Silva, L., Öchsner, A., & Adams, R. (2011). *Handbook of Adhesion Technology*. Springer.

Davison, P., & Young, R. (1969). Gas chromatography of carbohydrates. The quantitative determination of the free sugars of plants as their trimethylsilyl ethers. *Journal Of Chromatography*, 41, 12-21.

Denney, R. (1976). *A dictionary of chromatography*. Wiley.

Dettmer-Wild, K., & Engewald, W. (2014). *Practical Gas Chromatography*. Springer.

Ege, S. (1998). *Química orgánica: estructura y reactividad, Volumen 2*. Reverte.

El Khadem, H. S. (2012). *Carbohydrate Chemistry Monosaccharides and Their Oligomers*. Elsevier.

Evershed, R. P. (1993). *Advances in Silylation*. Liverpool: John Wiley & Sons Ltd.

Fieser, L. F., & Fieser, M. (1981). *Química orgánica fundamental*. Reverte.

Fontana, M. (2017). Obtenido de Casa de Lily: <http://casadalily.com.br/orquideas-parte-ii/>

- Gómez, M. (1998).** *La restauración: examen científico aplicado a la conservación de obras de arte. Cuadernos Arte Cátedra.* España: Cátedra.
- González, C. (2006).** *The tzauhtli glue, Nuevo mundo mundos nuevos, 1-13*
- Guerrero, R. (2017).** El sueño que creció, La jarana huasteca de Texquitote, San Luis Potosí. *La Manta y la Raya*, 5, 36-46.
- Handley, A., & Adlard, E. (2011).** *Gas Chromatographic Techniques and Applications* . Sheffield Academic Press.
- Harris, D. (2007).** *Análisis químico cuantitativo.* Reverte.
- Heinze, T., Liebert, T., & Koschella, A. (2006).** *Esterification of Polysaccharides.* Springer Science & Business Media.
- Hernández, F. (1942).** *Historia de las plantas de Nueva España.* México: Universitaria.
- Hernández, L., & Claudio, G. (2002).** *Introducción al Análisis Instrumental.* Barcelona: Ariel.
- Holm, T. (1999).** Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*, 221-227.
- Horie, C. (1987).** *Materials for conservation.* England: Butterworth Heinemann.
- Hornbæk, J. M. (2005).** *Organic Chemistry.* Cengage Learning.
- Kjnloch, A. (2012).** *Adhesion and adhesives; science and technology.* Springer Science & Business Media.
- laelia majalis orquídeas speciosa. (2019).** Obtenido de <https://hiveminer.com/Tags/laelia%2Cspeciosa/Timeline>
- López, A. (2009).** Identificación de carbohidratos y lípidos de pseudobulbos de orquídeas mexicanas utilizadas en el arte plumaria. (*Tesis de Maestría*). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Lüder, J. (2018).** *pro clima*. Obtenido de Why do adhesives stick?: <https://blog.proclima.com/int/files/2019/05/forces-adhesive-tape.png>
- Martínez, F. (1974).** *Pegamentos: gomas y resinas en el México prehispánico*. México: Secretaria de Educación Pública.
- Mc Nair, H., & Miller, J. (1998).** *Basic Gas Chromatography Techniques in Analytical Chemistry*. Wiley- Interscience.
- Morrison, R., & Boyd, R. (1998).** *Química orgánica*. Pearson Educación.
- Musfiqur, R., Abd, E.-A., Jeong-Heui, C., Ho-Chul, S., Sung, S., & Jae-Han, S. (2015).** Basic Overview on Gas Chromatography Columns. *Analytical Separation Science*, 3, 823-834.
- Orata, F. (2012).** Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 83-108.
- Orchid Web. (2019).** Obtenido de <https://www.orchidweb.com/cymbidium-orchid-care>
- Peña, A., Capella, S., & González, C. (1995).** Characterization and Identification of the Mucilage Extracted from Orchid Bulbs (*Bletia campanulata*) by High Temperature Capillary Gas Chromatography (HT-CGC). *Journal of High Resolution Chromatography*, 18(11), 713-717.
- Pettersen, R. (1984).** The Chemical Composition of Wood . *American Chemical Society*, 58-124.
- Poole, C. (2012).** *Gas Chromatography*. Elsevier.
- Poole, C. (2015).** Ionization-based detectors for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1421, 137-153.
- Quiroz, J., & Lavallo, G. (2019).** El conocimiento científico y tradicional en la construcción de instrumentos musicales: el caso de la Jarana veracruzana. *El Ahuehete HERBOLARIA*, 1-7.

- Robards, K., Haddad, P., & Jackson, P. (1994).** *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic Press.
- Rojas, E., Alarcón, A., Elizalde, P., & Rojo, F. (2004).** Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1027(1-2), 117-120.
- Román, R., & García-Alonso, L. (2014).** Conservación del Arte Plumario. *Publicaciones Digitales ENCRyM-INAH*, 22-45.
- Rubinson, K., & Rubinson, J. (2001).** *Análisis Instrumental*. Madrid: Prentice Hall.
- Ruíz, A., Hernández, O., Rodríguez, S., Sanz, M., & Martínez, I. (2011).** Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 879(17-18), 1226-1240.
- Salazar, G. (2004).** Orquídeas. *Diversidad biológica e inventarios*, 153-169.
- Sánchez, M., & Álvarez, E. (2011).** El papel de la Química en la restauración de monumentos. *Acta Universitaria*, 101-106.
- Semarnat**, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2000) Ley General de Vida Silvestre en "Diario Oficial de la Federación" (DOF). México. Consultado: miércoles 15 de mayo de 2019.
- Semarnat**, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2017) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 en "Diario Oficial de la Federación" (DOF). México. Consultado: miércoles 15 de mayo de 2019.
- Sierra, I., Gómez, S., Pérez, D., & Morante, S. (2009).** *Análisis Instrumental, Volumen 1*. Netbiblo.
- Stick, R. V., & Williams, S. (2010).** *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*. El sevier.
- Tajonar, P. (2007).** La importancia de los sitios arqueológicos mexicanos como una forma de atracción turística cultural internacional. (*Tesis de licenciatura*). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Téllez, M. (2011).** *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México.* Universidad Autónoma de Chapingo.
- Urbina, M. (1903).** *Notas acerca de los "tzauhtli" u orquídeas mexicanas.* México.
- Valcárcel, M., & Gómez, A. (1994).** *Técnicas analíticas de separación.* Reverte.
- Ventura, A. (2015).** Usan plantas para restaurar textiles. *El universal.*
- Vipul, D., Girish, K., Naresh, G., & Narayan, P. (2013).** Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 1685-1699.
- Vollhardt, P., & Schore, N. (2009).** *Organic Chemistry Structure and Function.* New York: W.H Freeman and Company.
- Adams, M., Chen, Z., Landman, P., & Colmer, T. (1999).** Simultaneous Determination by Capillary Gas Chromatography of Organic Acids, Sugars, and Sugar Alcohols in Plant Tissue Extracts as Their Trimethylsilyl Derivatives. *Analytical Biochemistry*, 266, 77-84.
- Valcárcel, M., & Gómez, A. (1994).** *Técnicas analíticas de separación.* Reverte.
- Ventura, A. (2015).** Usan plantas para restaurar textiles. *El universal.*
- Vipul, D., Girish, K., Naresh, G., & Narayan, P. (2013).** Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 1685-1699.
- Vollhardt, P., & Schore, N. (2009).** *Organic Chemistry Structure and Function.* New York: W.H Freeman and Company.
- Wyndham, F. (2004).** Learning ecology: ethnobotany in the sierra tarahumara, Mexico (*Tesis de doctorado*). The University of Georgia, USA.