



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera

División de Estudios de Posgrado de Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera

Obtención de Manool a partir de duramen de *Enterolobium cyclocarpum*  
(Jacq.) Griseb. (Parota)

TESIS

Q.F.B. Luis Enrique Montes Vega

Para obtener el grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

Asesor  
Doctor en Ciencias David Raya González

Co-asesor  
Doctor en Ciencias Mauro Manuel Martínez Pacheco

Morelia, Michoacán, México, Noviembre de 2017

## Índice general

Resumen .....	5
Abstrack .....	6
1. Introducción .....	7
2. Antecedentes .....	8
3. La madera.....	8
3.1 Madera de la zona de albura y duramen.....	8
3.2 Química de la madera .....	9
3.2.1 Composición estructural de la madera.....	9
3.2.2 Composición no estructural de la madera .....	10
3.2.2.1 Biogénesis de metabolitos secundarios (Extractivos) .....	11
4. Descripción de la especie <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jaqc.) Griseb. ....	13
4.1 Sinónimos de <i>E. cyclocarpum</i> .....	13
4.2 Nombres comunes de <i>E. cyclocarpum</i> .....	13
4.3 Generalidades de <i>E. cyclocarpum</i> .....	13
4.4 Usos distintos <i>Enterolobium cyclocarpum</i> .....	14
4.5 Distribución geográfica dentro de la República Mexicana.....	15
4.6 Fitoquímica del árbol <i>E. cyclocarpum</i> .....	16
5.0 Uso de productos naturales .....	17
5.1 Compuestos terpenos y terpenoides .....	18
5.2 Diterpenos tipo labdano .....	21
5.3 Ciclación de labdanos.....	21
6.0 Labdano Manool .....	22
6.1 Características biotecnológicas del diterpeno Manool .....	24
6.1.1 Usos de la estructura hidrocarbonada de Manool .....	24
6.1.2 Alternativa biológica de Manool .....	25
6.2 Propiedades de Manool .....	25
6.2.1 Características predichas .....	25
6.3 Nombres químicos .....	26
6.3.1 Nombre de IUPAC.....	26
6.4 Mezcla epimérica .....	27

7. Justificación .....	29
8. Hipótesis .....	30
9. Objetivo general:.....	31
9.1 Objetivos particulares: .....	31
10. Estrategia experimental .....	32
11. Materiales y métodos.....	33
11.1 Localidades de colecta de la materia vegetal .....	33
11.2 Obtención de los extractos vegetales .....	34
11.2.1 Maceración sucesiva con solventes de polaridad ascendente .....	34
11.2.2 Desengrasado de extracto con metanol .....	34
11.2.2 Maceración únicamente con metanol.....	35
12. Resultados.....	36
12.1 Extractos vegetales .....	36
12.2.1 Evaluación del duramen de <i>E. cyclocarpum</i> (Ec-IG).....	37
12.2.2 Curso temporal de la maceración sucesiva de duramen de <i>E. cyclocarpum</i> .....	37
13. Discusión .....	38
14. Conclusión .....	40
15. Referencias Bibliográficas .....	41

## Índice de figuras

Figura 1. Corte transversal de un tronco .....	9
Figura 2. Rutas de biosíntesis de metabolismo en respuesta a un estrés biótico o abiótico .....	12
Figura 3. Hojas, fruto y flor de <i>E. cyclocarpum</i> .....	14
Figura 4. Distribución natural de <i>E. cyclocarpum</i> en México y América del Sur .....	15
Figura 5. Estructura de la molécula de isopreno .....	19
Figura 6. Rutas de biosíntesis de moléculas terpénicas .....	20
Figura 7. Estructura del labdano Manool (13S).....	22
Figura 8. Ciclación del labdano Manool .....	23
Figura 9. Estructura de manool (A) y 13-epi-manool (B) .....	27
Figura 10. Zonas de colecta de <i>E. cyclocarpum</i> .....	33
Figura 11. Proceso de obtención de extractos vegetales .....	34
Figura 12. Separación de ácidos grasos de un extracto apolar.....	35

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Actividad biológica de diferentes órganos de <i>E. cyclocarpum</i> .....	17
Cuadro 2. Productos naturales aislados con efecto frente a organismos de distinto nivel trófico.....	18
Cuadro 3. Clasificación de los compuestos terpenos .....	19
Cuadro 4. Propiedades de manool .....	26
Cuadro 5. Biomasa para la obtención de los extractos vegetales de <i>E. cyclocarpum</i> .....	33
Cuadro 6. Rendimiento de los modelos experimentales para la destilación con vapor de agua .....	36
Cuadro 9. Curso temporal del rendimiento de extractos de duramen (Ec-IG).....	37

## Resumen

La madera es un material orgánico, higroscópico, duradero y renovable la cual mantiene una estructura heterogénea. Estas características le confieren propiedades físicas y mecánicas para una diversidad de uso que la vinculan directamente para la construcción de casas que al conservarse adecuadamente puede durar cientos de años, pero debido a que la madera es de origen orgánico presenta la desventaja de ser susceptible a ser dañadas por agentes bióticos y abióticos. La durabilidad natural es una característica intrínseca ejercida por las especies químicas infiltradas en las cavidades del tejido de duramen para ayudar a minimizar los efectos de los ataques de insectos o microorganismos de tipo xilófago. Para ello, en ocasiones la madera se preserva con compuestos químicos que ayudan a aumentar la durabilidad y el tiempo de vida media en servicio. La durabilidad natural contra hongos e insectos es una propiedad intrínseca que incrementa el valor económico y uso de algunas especies forestales como el caso particular de *Enterolobium cyclocarpum*. De los resultados obtenidos de la madera de duramen de Guerrero se determinó que a partir de los extractos metanólicos obtenidos mediante un proceso de maceración sucesiva con solventes de polaridad diferente permite implementar la destilación con vapor de agua y obtener fracciones enriquecidas con manool libre de 13-*epi*-manool y 7-hidroxi-manool a temperatura de 95 °C y presión de vapor de 84.60 kPa.

**Palabras clave:** durabilidad natural, diastereoisómero, extracto vegetal, duramen, destilación

## Abstrack

Wood is an organic material, hygroscopic, durable and renewable which maintains a heterogeneous structure. These characteristics give it physical and mechanical properties for a range of use that link it directly to the construction of houses that, to keep properly can last hundreds of years, but since the wood is of organic origin presents the disadvantage of being susceptible to being damaged by biotic and abiotic agents. The natural durability is an intrinsic characteristic exerted by the chemical species infiltrated into the cavities of the heartwood tissue to help to minimize the effects of attacks by insects or repellent type microorganisms. To do this, occasionally the wood is preserved with chemical compounds that help increase durability and life time average service. The natural durability against fungi and insects is an intrinsic property which increase the economic value and use of some forest species such as the particular of *Enterolobium cyclocarpum*. Of the results obtained from the heartwood of warrior wood was determined from extracts methanol obtained through a process of successive maceration with solvents of different polarity allows implementing the distillation with water vapor and obtain fractions enriched with manool free 13-*epi*-manool and 7-hidroxi manool at 95 °C temperatura and vapour pressure of 84.60 kPa.

## 1. Introducción

La madera es un material orgánico, higroscópico, duradero y renovable. Estas particularidades le confieren características físicas y mecánicas para uso variado en la construcción de utensilios y casas. Además el carácter orgánico de las maderas le confiere susceptibilidad a ser dañadas por agentes bióticos y abióticos. La madera es un material que también se vincula directamente para elaboración de productos decorativos que al conservarse adecuadamente puede durar cientos de años. La madera que no es preservada está expuesta al deterioro irreversible originado por organismos xilófagos que afectan la calidad y ocasionan una merma paulatina de sus propiedades físico-mecánicas. La durabilidad de la madera seca en servicio depende de la capacidad de minimizar los efectos de los ataques de insectos o microorganismos xilófagos de forma que permite mantener intacta las construcciones terminadas. Para ello, la madera se preserva con compuestos químicos que ayudan a aumentar la durabilidad. La durabilidad natural es una característica intrínseca sustancial ejercida por las especies químicas infiltradas en las cavidades del tejido de duramen de especies forestales. Las investigaciones que permiten mantener a *E. cyclocarpum* como especie forestal de importancia son los productos naturales obtenidos de diferentes órganos para ser aplicados en áreas químicas y tecnológicas. La madera de *E. cyclocarpum* presenta una durabilidad natural por la presencia de los diterpenos tipo labdano (+)-Manool, su diastereoisómero 13-*epi*-manool y un ciclitol llamado (+)-Pinitol. El diterpeno Manool presenta actividad antitermita, herbicida y fungicida, además es un compuesto intermediario para la manufactura de perfume y ser el componente mayoritario en la resina de trementina. Los extractivos dilucidados a partir de maderas con durabilidad natural como es el caso de Manool son una alternativa natural para preservar maderas percederas sin generar un daño a la fauna silvestre del ecosistema, pero a causa de que Manool se encuentra junto con su diastereoisómero 13-*epi*-manool y 7-hidroximanool en duramen de *E. cyclocarpum* se obstaculiza la obtención de Manool puro por presentar propiedades físico-químicas similares. Por ello, el objetivo de este trabajo es establecer parámetros físicos: temperatura, presión de vapor y tiempo de destilación en un sistema de arrastre con vapor de agua para la obtención de Manool libre de su diastereoisómero y derivado.

## **2. Antecedentes**

### **3. La madera**

La madera es un material lignocelulósico natural de estructura heterogénea y renovable, forma parte de la estructura del tronco de los árboles. Esta organización es heterogénea y origina que sea un material agroindustrial atractivo y de beneficio. La madera es un producto de interés para la búsqueda de alternativas novedosas para la gestión y la utilización de los productos derivados de la actividad forestales. El origen de la madera inicia con el engrosamiento del tronco el cual ocurre paralelamente con crecimiento y desarrollo paulatino del árbol; es formado por un proceso biológico. Con la presencia y participación de células del sistema del cambium que participan conjunta y activamente en la génesis de metabolitos y polímeros para la formación de la madera (Raya, 2007). Dónde: los “Metabolitos primarios” se encuentran disponibles y organizados para un crecimiento y desarrollo del árbol, los llamados “Metabolitos secundarios” empleados como defensa química en respuesta al estrés biótico y abiótico (Valencia, 1995).

#### **3.1 Madera de la zona de albura y duramen**

La albura y el duramen son dos zonas fisiológicamente diferentes del árbol figura 1. La albura es la parte joven y fisiológicamente activa del xilema, esta región contiene células vivas y material de reserva. La albura es la región de conductos del tronco por la que circula la savia bruta desde las raíces hasta hojas a través de tejidos celulares especializados. Subsiguientemente con el crecimiento del árbol estos conductos pierden su actividad de transporte y cambian a ser depósitos inactivos de resinas, aceites, taninos, terpenos, grupos aromáticos y otros compuestos causantes de una coloración y propiedades sustanciales lo cual es un indicativo del crecimiento y desarrollo de la especie, el conjunto de depósitos inactivos se denomina “duramen”. El duramen figura 1 es biológicamente inactivo, con funciones de sostén, que ocupa la mayor porción del tronco entre la médula y la albura en maderas de especies latifoliadas, es de estructura compacta y de coloración oscura en comparación con la albura. Los compuestos son acumulados a causa de un proceso de duraminización en el cual ocurren reacciones químicas ligadas a procesos de oxidación, (Bamber, 1976; IAWA, 1989). Los cambios que se producen en las células de la madera durante la transición



de la albura a duramen es un proceso que permite mantener la cantidad de albura en un nivel óptimo (Bamber, 1976). El duramen tiene propiedades intrínsecas sustanciales que favorece su uso en la industria de países en vías de desarrollo, tiene una notable resistencia natural ante el estrés biótico y abiótico (Taylor *et al.*, 2002).

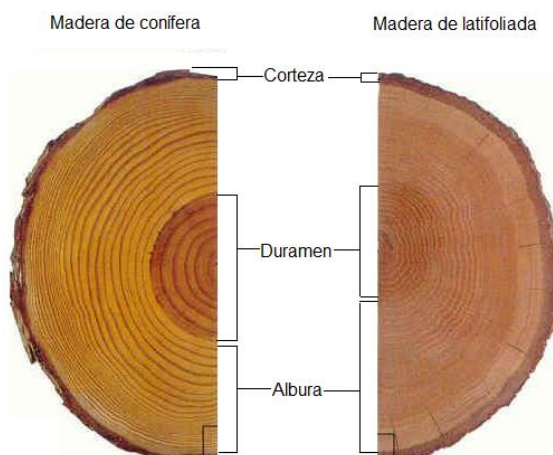


Figura 1. Corte transversal de un tronco (Bruce, 2000).

### 3.2 Química de la madera

La madera desde el contexto químico es un material heterogéneo constituido en mayor proporción y en forma decreciente por polímeros estructurales: Celulosa, Hemicelulosa y Lignina. En menor proporción componentes no estructurales llamados extractivos.

#### 3.2.1 Composición estructural de la madera

La madera está formada por componentes estructurales y no estructurales formados por enlaces covalentes e interacciones intermoleculares débiles. Los componentes estructurales son: El polisacárido lineal de celulosa que representa el 50 % en peso seco de la madera, está formada por monómeros de glucosa ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> unidos por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídico para formar cadenas de celulosa cristalina y amorfa. El segundo polímero deja de ser una molécula lineal y presenta ramificaciones, está formado por monómeros de glucosa, xilosa, galactosa, ribosa y es llamado hemicelulosa. El tercer componente de la madera es la lignina, es un polímero tridimensional que

resulta de la unión de unidades de fenilpropano: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol cumarílico (Kollman, 1959; Hillis, 1987). Los extractivos se localizan depositados en mayor proporción en la parte de la zona de transición, duramen y en la parte baja del árbol (Hillis, 1987; Ramos *et al.*, 2011; Telmo y Lousada, 2011).

### **3.2.2 Composición no estructural de la madera**

Los compuestos no estructurales son productos orgánicos denominados sustancias extraíbles de peso molecular relativamente bajo. Los extraíbles representan la menor proporción de composición química de la madera, son especies químicas infiltradas en las cavidades del lumen del duramen, en los tricomas de las hojas, corteza y en la pared celular. Estos compuestos son resultado del metabolismo secundario iniciado a partir de productos formados del metabolismo primario. Los metabolitos secundarios (MS) son producidos en respuesta a un estrés biótico y abiótico. Estas respuestas químicas de defensa en ocasiones activan también el desarrollo del tejido celular de algunas partes de la planta para la formación de estructuras contra depredadores (Sepúlveda, 2003). Estos MS son llamados de diferente forma: metabolitos secundarios, extractivos, productos naturales, analitos, alcaloides, principios activos o sustancia infiltradas que se distribuyen en todo el árbol con una abundancia del 10-20 % en peso seco de la madera. Este porcentaje tiene una desviación en maderas tropicales con un 30 % de contenido de extractivos (Telmo y Lousada, 2011). También, la cantidad de extractivos depende del genoma de cada especie, así como de factores edafoclimáticos que generan un estrés en la planta y provocan una diferente biosíntesis y proporción de los MS, por ejemplo: la zona geográfica de muestreo por temperatura, por precipitación de agua de la atmósfera (Pedraza, 2006; Ávila, 2012a,b; Taârit *et al.*, 2013).

La presencia de extraíbles en las maderas provoca cambios en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas que repercute para el aprovechamiento tecnológico y de transformación de la madera (Hillis, 1987; Fengel y Wegener, 1989; Shebani *et al.*, 2008; Telmo y Lousada, 2011). Los metabolitos secundarios son parte de los productos derivados de la actividad forestal denominados Productos Forestales No Maderables o Beneficios Forestales No Madereros (Tapia y Reyes, 2008).

Los extraíbles son un grupo heterogéneo de especies químicas que son extraídos de la madera con solventes orgánicos polares y no polares, esto en función de la estructura, del número y tipo de los grupos funcionales del compuesto. Los diferentes tipos de extractivos localizados en duramen, corteza, hojas, raíz y frutos son: Terpeno, Ceras, Ácidos resínicos, Estilbenoídes, Ác. grasos, Pectinas, Complejos fenólicos, Proteínas, simples fenilos, Saponinas, Lignanos, Aceites esenciales, Flavonoides, Glicosidos y Gomas, integrados en tres categorías: Acidos grasos, Alcaloides Fenilpropanoides y Terpenos a 2 (Hillis, 1987; Fengel y Wegener, 1989). Los extraíbles condicionan el comportamiento de la madera lo cual es reflejado en la calidad de la misma, proporcionan propiedades diferentes dependiendo del tipo y cantidad de especie química: aumento del poder calorífico (Shebani *et al.*, 2008; Telmo y Lousada, 2011; White, 1986), durabilidad natural (Juacida y Villanuevas 1996; Taylor *et al.*, 2002), color (Gierlinger *et al.*, 2004). Estas propiedades son aprovechadas para darles un valor agregado en áreas farmacéutica, industria textil, e industria cosmetológica y esto solo por mencionar algunas. Por ello, la búsqueda de metabolitos secundarios con el fin de encontrar usos novedosos y relevantes que sirvan en áreas tecnológicas (Kolmann, 1959; Hillis 1987; Fengel y Wegener, 1989; Valencia, 1995; Raya, 2007; Ávila, 2012a; Ávila Calderón, 2012b).

### **3.2.2.1 Biogénesis de metabolitos secundarios (Extractivos)**

La naturaleza es una fábrica perfecta de diversas moléculas orgánicas. Las plantas vasculares (aquellas que tienen raíz, tallo, hojas y vasos de conducción de savia) son esenciales en la vida del hombre y de algunos animales debido a la capacidad de convertir materia inorgánica (CO<sub>2</sub>) en materia orgánica a partir de la radiación electromagnética por un proceso de fotosíntesis. En este proceso la energía se transforma en energía química, siendo el NADPH (Nicotín Adenín Dinucleótido Fosfato Reducido) y el ATP (Adenosín Trifosfato) las primeras moléculas formadas para posteriormente disponer de esta energía química almacenada. Esta energía se utiliza para el anabolismo de distintos compuestos químicos por rutas biosintéticas donde están involucradas enzimas específicas en reacciones metabólicas (Hillis, 1987; Valencia, 1995; Ávila, 2012a).

La biosíntesis de productos secundarios responsables de la defensa de las plantas se lleva a cabo al disponer de productos derivados del metabolismo primario: Acetil-Coa, aminoácidos, fosfoenolpiruvato, eritrosa-4-P, piruvato y 3-fosfoglicerato son algunos descritos en la literatura, estos precursores dan origen a todo un perfil de múltiples compuestos químicos en una determinada especie forestal figura 2.

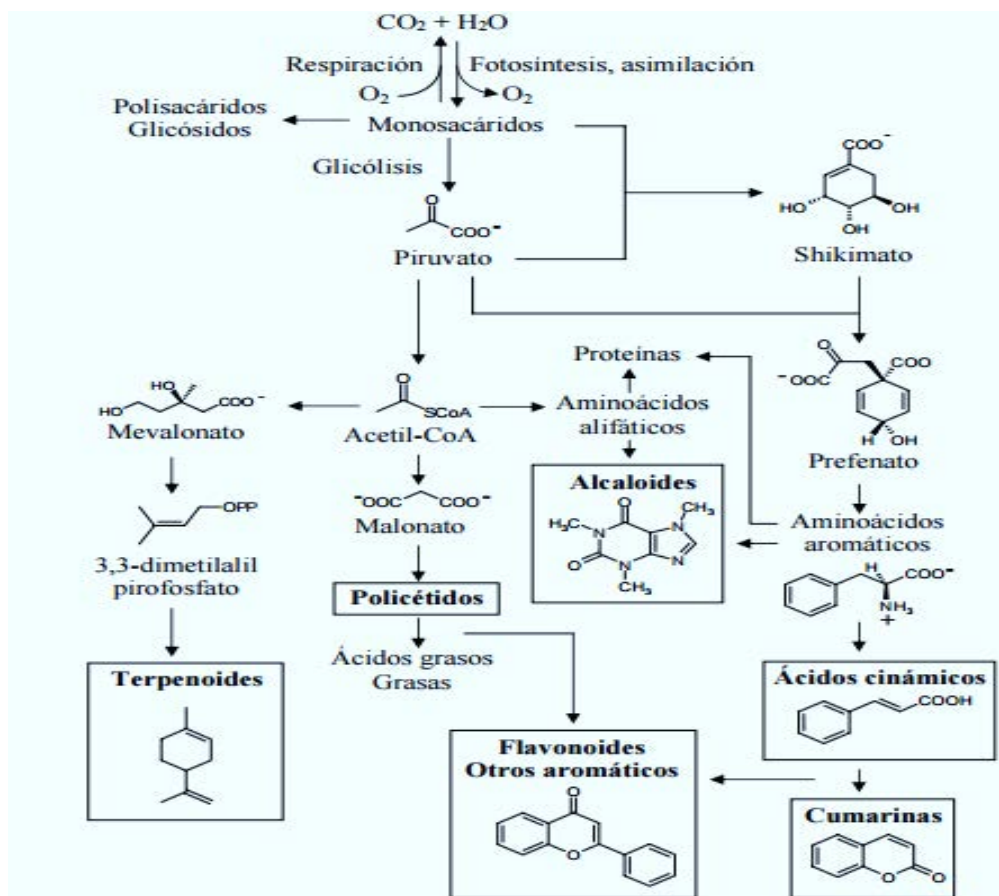


Figura 2. Rutas de biosíntesis de metabolismo en respuesta a un estrés biótico o abiótico (Valencia, 1995).

#### **4. Descripción de la especie *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.**

##### **4.1 Sinónimos de *E. cyclocarpum***

El árbol de *E. cyclocarpum* presenta una variedad de nombres con los cuales se identifica en distintas zonas geográficas: *Albizia longipes* Britton y Killip; *Feuilleea cyclocarpa* (Jacq.) Kuntze; *cyclocarpa Inga* (Jacq.) Willd; *Mimosa cyclocarpa* (Jacq); *Mimosa parota* Sesse y Moc; *cyclocarpum Pithecellobium* (Jacq) Mart; *Prosopis dubia* Kunth (Martínez Pacheco *et al.*, 2012).

##### **4.2 Nombres comunes de *E. cyclocarpum***

El árbol de *E. cyclocarpum* presenta una variedad de sinónimos por distintas zonas de la República Mexicana; parota, guanacastle, necastle, ya-chibe, orejon, picho, nacascuahuitl, (Pennington *et al.*, 2005; Thirunavoukkarasu *et al.*, 2008; Ramos Pantaleón *et al.*, 2011) orejon, corotú, carocaró (Ojeda *et al.*, 2013).

##### **4.3 Generalidades de *E. cyclocarpum***

La especie arbórea *E. cyclocarpum* es integrante de la familia Fabaceae, subfamilia Mimosoideae, género *Enterolobium* y especie *cyclocarpum* en la figura 3 se muestra parte de los órganos del árbol. Es un árbol que alcanza una altura de 20-30 m, fue descrita y nombrada por primera vez como *Mimosa cyclocarpa* en 1809 a 1887 en la Nueva España. Es una de las dos especies con mayor relevancia del género de *Enterolobium* al tener en cuenta que se reportan 22 especies que se localizan en el Continente Americano. Estudios sobre su anatomía y su ecología dieron pauta para conocer parcialmente su fitoquímica, actividad biocida y características agroforestales. La madera presenta entre la albura y duramen diferencia de color: la albura de color blanco a castaño-marrón con un parénquima axial vasicéntrico, además, presenta elementos de vaso de una longitud corta, y el duramen de color marrón claro (Martínez Pacheco *et al.*, 2012).

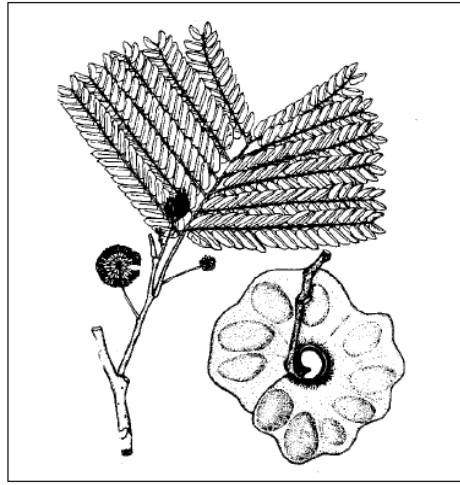


Figura 3. Hojas, fruto y flor de *E. cyclocarpum* (Francis y Loe, 2000).

#### 4.4 Usos distintos *Enterolobium cyclocarpum*

La especie *E. cyclocarpum* es un árbol tropical de interés en el área agroforestal. La madera de parota llamada así en zonas de Michoacán es usada con frecuencia como árbol de sombra debido a su abundante follaje, son parte de cercas vivas en áreas de ganadería o agrícolas. Es un árbol usado con frecuencia en programas con fines de reforestación, para la regeneración de suelos y de alimento por su aporte proteico. La durabilidad natural que presenta ocasiona que aumente el valor económico para su uso en la obtención de tablas, polines y vigas para la decoración de viviendas, elaboración de utensilios de cocina, en la fabricación de chapa para vistas en madera contrachapada o triplay. Los productos obtenidos de hojas, frutos y tronco son usados en industria textil, farmacológica, cosmetológica y culinaria. En cuanto a la trabajabilidad para la transformación de la madera, es de escasa resistencia al aserrío (Martínez Pacheco *et al.*, 2012; Ávila, 2012b; Tenorio *et al.*, 2016).

El árbol de parota es de interés como objeto de estudio por la comunidad científica debido a la resistencia del ataque de organismos xilófagos, la diversidad de compuestos químicos que alberga en la zona de duramen son una alternativa tecnológica para la protección de maderas con un potencial de degradación mayor como es la madera de pino.

#### 4.5 Distribución geográfica dentro de la República Mexicana

*E. cyclocarpum* está distribuido geográficamente por una amplia parte de la superficie del territorio mexicano, localizada en la vertiente del Golfo desde el Sur de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán, de igual forma se encuentra en parte de la vertiente del Pacífico desde Sinaloa hasta el Estado de Chiapas. La altitud a la cual se encuentra es; 0 a 800 m distribuyéndose por los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Ramos Pantaleón *et al.* 2011; Martínez Pacheco *et al.*, 2012; Ojeda *et al.* 2013) como se muestra en la figura 4. Esta especie se relaciona con las especies de *Ficus mexicana*, *Bursera simaruba*, *Ceiba pentandra*, *Cedrela odorata*, *Dalbergia* spp. y *Sweetia panamensis* por localizarse comúnmente en zonas con algún tipo de perturbación (Pennington *et al.*, 2005). Algunas de las especies encontradas a su alrededor influyen en el desarrollo de las propiedades otorgadas por las composición química (Obando y Moya, 2013).



Figura 4. Distribución natural de *E. cyclocarpum* en México y América del Sur (Francis y Lowe, 2000).

#### 4.6 Fitoquímica del árbol *E. cyclocarpum*

Es un árbol comúnmente conocido con el nombre de Parota, es un árbol con gran capacidad para fijar nitrógeno. La zona de duramen se distingue de la zona de albura. El duramen de parota es resistente al ataque de termitas de madera seca. El estudio químico para dilucidar los componentes químicos y su actividad biológica de la especie *E. cyclocarpum* permite realizar avances en áreas tecnológicas.

Este árbol en la medicina tradicional se utiliza en el tratamiento de tumores inflamatorios, para el tratamiento de resfriados y para la bronquitis (Thirunavoukkarasu, 2007; Raya, 2007; Sowemimo *et al.*, 2015). Es un árbol apto para la agroforestería (Oni, 2008), su contenido de proteína en las semillas sin testa es 35 g/kg con una predominancia de amilopectina 734 g/kg (Jiménez *et al.*, 2011). Para el consumo humano es indicado ya que ni la variación química astringente afecta en su utilización (Ojeda, 2013).

Colin *et al.*, (2015) registraron la durabilidad y la resistencia de madera de duramen expuesta al desgaste natural en ensayos de campo, afectando el color por la exposición directamente a suelos y lluvia, esto la clasifica en madera moderadamente durable. Desde hace 22 años se incursiona con la determinación de la actividad biológica *in vitro* de los extractos vegetales obtenidos de *E. cyclocarpum*. Rutiaga *et al.*, (1995) determinaron que el extracto etanólico de corteza ejercía un efecto fungistático contra *Trametes versicolor*, *Coniophora puteana*, *Chaetomium globosum* y *Trichoderma viride*. Las maderas de pino tratadas con los extractos acuosos de duramen de *E. cyclocarpum* obtenidos por Raya, (2007) presentaron una resistencia ante el biodeterioro y al ataque de termita de la madera seca *Insicitermis marginipennis* (LATREILLE). Los extractos acuosos obtenidos se analizaron para determinar la toxicidad y estimar los valores de  $CI_{50}/CL_{50}$  en organismos de diferentes niveles tróficos (Raya *et al.*, 2008a; Martínez *et al.*, 2009). Raya *et al.*, (2008b) determinaron que el componente mayoritario del extracto acuoso es un ciclitol llamado D-(+)-pinitol que presenta actividad antigluceante, antiinflamatorio y es un suplemento en pacientes con diabetes mellitus tipo II, además exhibe efectos antiviral y larvicida. Asimismo, el extracto metanólico contiene compuestos con actividad antiproliferativa (citotóxico) contra dos líneas celulares: cervicales (Hela) y de mama (MCF7) (Sowemimo *et al.*, 2014).



En diferentes trabajos del árbol de *E. cyclocarpum* se determina su comportamiento en cuanto a su variabilidad química estructural al realizar modificaciones químicas y formar enlaces covalentes entre los grupos reactivos (OH) de los polímeros dependiendo con la finalidad de mejorar las propiedades físicas y mecánicas (Blanco y Alfaro, 2014). El cuadro 1 se muestra un resumen de los trabajos evaluados *in vitro* a partir de extractos vegetales con actividad biológica.

Cuadro 1. Actividad biológica de diferentes órganos de *E. cyclocarpum*

Órgano	Extracto vegetal/Metabolito	Efecto biológico	Referencia
<b>Duramen</b>	Aceites esenciales, fenólicosterpenos, acetofenonas	Antialimentario, Bactericida	Raya <i>et al.</i> , 2012
<b>Duramen</b>	Manool, 13- <i>epi</i> -manool y Pinitol	Antitermita	Raya, 2007; Raya <i>et al.</i> , 2008b
<b>Duramen</b>	Extracto acuoso	Antitermita	Raya <i>et al.</i> , 2008a
<b>Duramen</b>	Extracto acuoso y hexánico	Antitermita	Patmaz, 2008
<b>Duramen</b>	Extracto metanólico	Efecto alelopático	Ramírez, 2008
<b>Corteza</b>	Extracto ciclohexánico y etanólico	Fungitóxico	Rutiaga Quiñones, 1995
<b>Vaina madera</b>	Hierro, Calcio, Fósforo, Ác. ascórbico	Alimentario	Espejel, 1979
<b>Pulpa y cascara</b>	Saponinas triterpénicas	Ictiotóxicas y bactericidas	Domínguez, 1979

## 5.0 Uso de productos naturales

Los productos forestales son participes en el desarrollo de la industria química. Las plantas leñosas proporcionan diversos productos que se usan en la manufactura de productos de la industria farmacológica, textil, cosmetológica y culinaria. Un ejemplo son los productos obtenidos de la especie de *Enterolobium cyclocarpum*, se elaboran artículos torneados, adhesivos y además el exudado de *E. cyclocarpum* contiene propiedades parecidas a la goma arábiga, asimismo se utiliza la parte aérea para suplemento alimenticio por su contenido del 36 % aproximado de proteína contenida en la semilla

(Martínez Pacheco *et al.*, 2012). El fármaco taxol fue aislado y caracterizado de la conífera *Taxus brevifolia* con actividad antitumoral (Strobel *et al.*, 1993). La cera candelilla se obtiene del arbusto *Euphorbia antisyphilitica* nativo de Norte de México la cual es un producto natural de calidad y competitivo en la industria cosmética (Tapia y Reyes, 2008). Así como estos también se demostró la actividad de productos naturales empleados para detener, eliminar o estimular la actividad de organismos de diferente nivel trófico como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Productos naturales aislados con efecto frente a organismos de distinto nivel trófico

<b>Especie arbórea</b>	<b>Compuesto natural</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencia</b>
<i>Thujopsis dolabrata</i>	Thujopseno	Antitermita	Yoshida <i>et al.</i> , 1998
<i>Heliotropium filifolium</i>	Filifolinol	Antiviral	Torres <i>et al.</i> , 2002
<i>Miconia coronata</i>	$\beta$ -Sitostero	Ictiotóxico	Isaza <i>et al.</i> , 2005
<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	Cinamaldehído	Antifúngica	Sheng <i>et al.</i> , 2005
<i>Taxodium distichum</i>	Manool y Ferruginol	Antitermita	Verma <i>et al.</i> , 2009
<i>Azadirachta indica</i>	Azadiractina	Insecticida	Dayan <i>et al.</i> , 2009
<i>Leucophyllum frutescens</i>	Extracto metanólico	Antibacteriano	Vega <i>et al.</i> , 2013

### 5.1 Compuestos terpenos y terpenoides

La importancia de los productos naturales en la agricultura e industria estimulan los estudios sobre la síntesis, la biosíntesis y las actividades biológicas de estas sustancias. Los terpenos son la familia de especies químicas más numerosa y estructuralmente diversa de productos naturales, son aislados de plantas inferiores y superiores con un fin biotecnológico (Trapp y Croteau, 2001; Gershenzon y Dudareva, 2007). Estos terpenos en su mayoría son compuestos de estructura alifática, algunos cíclicos que presentan un sistema deslocalizado de electrones. Una de las características que comparten en común los terpenos son las unidades de isopreno condensadas con enlaces de cabeza-cola o cola-cabeza figura 5 (Valencia, 1995; Sepúlveda, 2003).



Figura 5. Estructura de la molécula de isopreno (Valencia, 1995)

Los compuestos terpenicos se clasifican de acuerdo al número de moléculas de isopreno que formen la estructura cuadro 3. La utilidad que le dan el hombre es extensa y diversa: Los aceites esenciales son útiles para la manufactura de perfume, insecticidas, antimicrobianos, anticancerígenos como el caso del diterpeno taxol (Strobel *et al.*, 1993; Sepúlveda, 2003).

Cuadro 3. Clasificación de los compuestos terpenos (Valencia, 1995)

Nombre	# Carbonos	# de isoprenos	Ejemplo de su localización
Monoterpenos	10	2	Aceites volátiles
Sesquiterpenos	15	3	Aceites volátiles
Diterpenos	20	4	Resinas
Sesterpenos	25	5	Agentes antitumorales
Triterpenos	30	6	Saponinas
Tetraterpenos o carotenoides	40	8	Pigmentos
Politerpenos	> 40	> 8	Hule

La biosíntesis de terpenos ocurren cuando en el sistema se encuentran moléculas de isopreno activadas: Isopentilpiroforfato (IPP) y su isómero Dimetilpirifosfato (DMAPP) en los cloroplastos los cuales se derivan de dos rutas de anabolismo diferentes: Ruta del ácido mevalónico y ruta del metileritritol fosfato. La primera ruta se deriva del ácido mevalónico (AMV) unidad de cinco carbonos formado de la condensación de tres moléculas de acetato activadas (acetil-CoA) catalizada por una tiolasa y hidroximetilglutaril-CoA sintetasa para formar al producto 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) el cual se reduce en presencia de la coenzima NADPH-H. El segundo deriva de

metileritritol fosfato originado de la condensación de productos del proceso de glicólisis: gliceraldehído-3-fosfato y piruvato, esta se lleva a cabo en cloroplastos de plantas. Consecutivamente se condensan moléculas de isopreno activadas catalizadas por una transferasa, la sucesiva condensación cabeza-cola de otras unidades IPP producen a geranil pirofosfato (GPF) de 10 carbonos, farnesil pirofosfato (FPP) de 15 carbonos, geranilgeranil pirofosfato (GGPP) de 20 carbonos que dará origen al perfil de terpenos como se muestra en el cuadro 2 y figura 6 (Knoss *et al.*, 1997; Paul, 1999; Sallaud *et al.*, 2012).

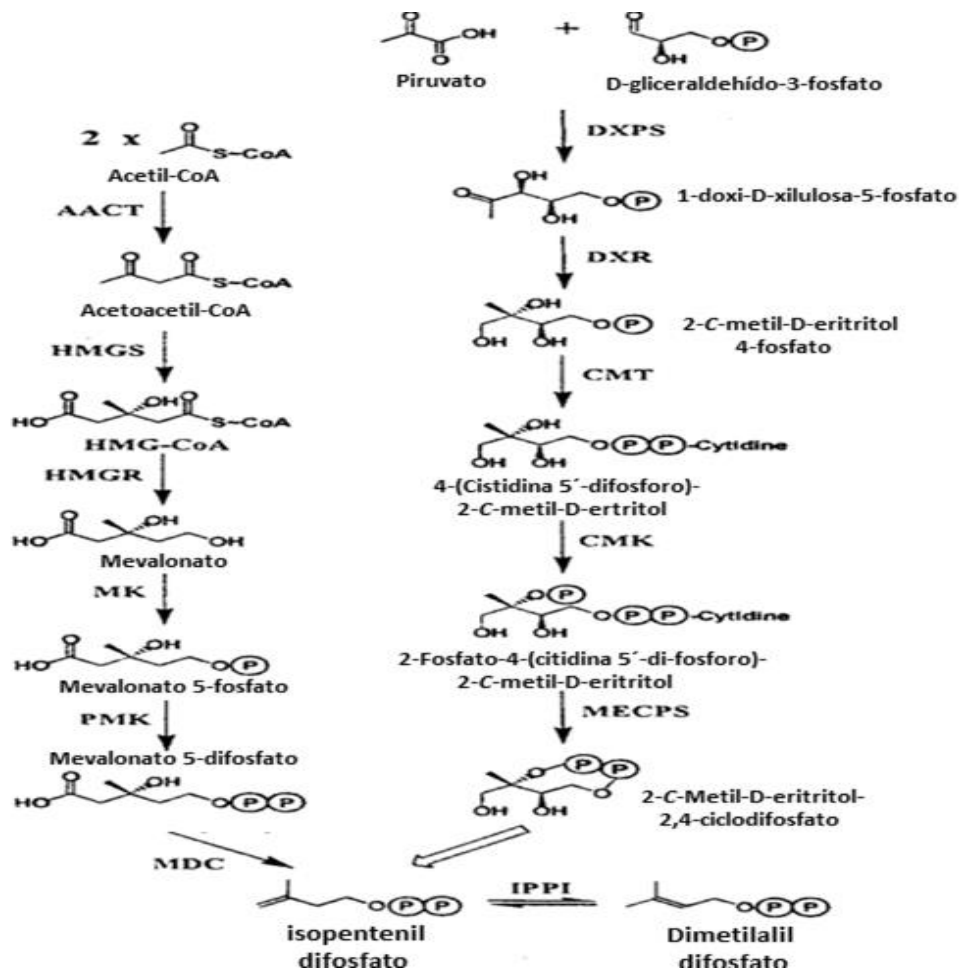


Figura 6. Rutas de biosíntesis de moléculas terpénicas (Lange *et al.*, 2000)

## 5.2 Diterpenos tipo labdano

Los compuestos tipo labdano pertenecen a la familia de los diterpenos y comprenden 5 000 productos naturales aproximadamente aislados con una configuración absoluta determinada. El esqueleto labdano se caracteriza por una estructura bicíclica y enlaces exocíclicos. Los labdanos expresan actividades biológicas relevantes en organismos de diferente nivel trófico: La fitohormona giberelina es un diterpeno labdano necesaria para el crecimiento y el desarrollo en plantas superiores, otros compuestos tienen reporte que presentan actividad antitermita (Scheffran *et al.*, 1988) antimicrobiana, alguicida, citotóxica, antifúngica, antituberculosa, antiinflamatoria (Pal *et al.*, 2016). Los labdanos se han aislado de familias de plantas: Acanthaceae, Cistaceae, Labiatae, Pinaceae, Verbenaceae, y Zingiberaceae. También de microorganismos se han aislado, como es del hongo *Penicillium oxalicum* TW01-1 (Bian *et al.*, 2015), de tejidos de insectos, organismos marinos, aceites esenciales y resinas (Salazar y Villamizar, 2013b). Otro ejemplo es el labdano Manool el cual es de interés para este proyecto y presenta actividad repelente de termitas (Scheffrahn *et al.*, 1988), mosquitos (Ali *et al.*, 2015) y efecto herbicida (Amri *et al.*, 2014).

## 5.3 Ciclación de labdanos

El esqueleto labdano deriva de un proceso de biosíntesis inusual de ciclación directa de la cadena alifática de *trans,trans*-geranilgeranilpirofosfato (GGPP) para dar origen al diterpeno bicíclico tipo labdano mediante reacciones catalizadas por la diterpeno sintasa clase I y clase II específicas para la ciclación (Cyr *et al.*, 2007; Sallaud *et al.*, 2012). Esta estructura bicíclica se reordena con reacciones iniciadas por ionización de difosfato.

En los procesos de ciclación es frecuente encontrar compuestos con esqueletos pertenecientes a series estereoisoméricas (enantiómeros o diastereoisómeros), esto significa que en todo el genoma de las especies vegetales existen genes capaces de expresar enzimas con capacidad para intervenir en procesos de biosíntesis y producir compuestos ópticamente activos con propiedades físico-químicas similares a su molécula especular si es que existe, esto coloca en un reto al investigador al momento de realizar la caracterización y separación. Los compuestos estereoisoméricos poseen idéntica configuración relativa e igual *r<sub>f</sub>* (factor de retención). La diferencia entre ellos la encontramos en el valor de rotación óptica denotada por  $[\alpha]_D$ . En tiempos recientes el realizar la comparación de los

espectros teóricos y el obtenido de la parte experimental por espectroscopía de dicroísmo circular vibratorio (VCD) permite determinar la configuración absoluta de moléculas quirales (Muñoz *et al.*, 2006; Cerda García Rojas *et al.*, 2007; García Sánchez *et al.*, 2013).

## 6.0 Labdano Manool

Hosking y Brandt en 1935 identificaron por primera vez mediante técnicas espectroscópicas al diterpeno Manool extraído de la resina obtenida de la madera de *Dacrydium biforme* (*Halocarpus boformis*) la cual es una conífera endémica en Nueva Zelanda y conocida comúnmente como pino amarillo o rosa. El diterpeno (+)-Manool ([8(17),14-labdien-13-ol]) figura 7 es un compuesto de tipo labdano ópticamente activo y obtenido a partir de la resina de pino amarillo, se utiliza como material principal para la elaboración de diferentes productos químicos.

En el año que se aisló el manool Hosking y Brandt desconocían su estructura molecular, sólo determinaron que era un terpeno bicíclico con un enlace doble, dos grupos metilo en posición de C-4 y un tercer grupo metilo en C-10, una ramificación lateral en la posición C-9 de cinco carbonos. Además, determinaron un grupo hidroxilo junto con un grupo metilo en posición C-13 y un enlace doble entre las posiciones C-14 y C-15. Un año más tarde se confirma la estructura propuesta y se determina un segundo enlace vinílico del C-8 a C-17 y en 1962 se establece la configuración absoluta del grupo hidroxilo del C-13 de Manool (13S) (Conner y Rowe, 1976; Salazar y Villamizar, 2013a y 2013b).

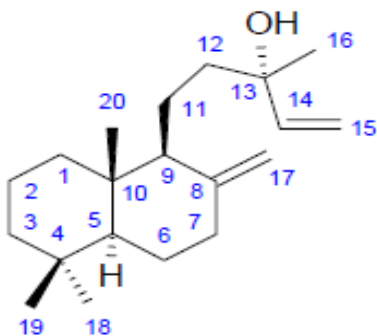


Figura 7. Estructura del labdano Manool (13S)

La biosíntesis de terpeno Manool se realiza por el proceso de ciclación catiónica directa de la molécula de GGPF acompañado de un reacomodo de los grupos metilo dan origen a una molécula bicíclica con un carbocatión en C-8 como se muestra en la figura 8.

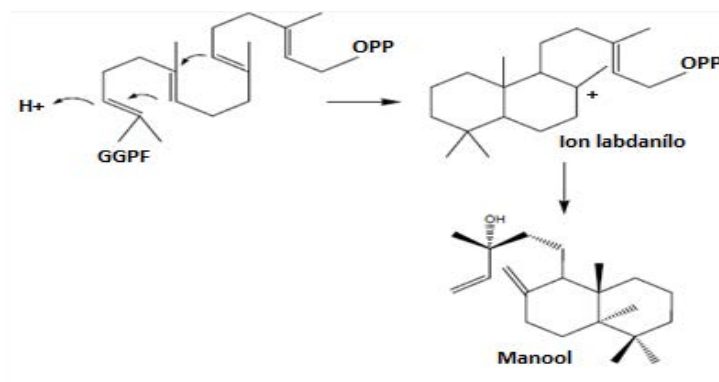


Figura 8. Ciclación del labdano Manool (Kulcički et al., 2006).

El establecimiento de una relación producto-industria originó un interés en el diterpeno Manool y aunque existen diferentes fuentes de obtención la región de Nueva Zelanda tiene como especie endémica y nativa a *Halocarpus biformis* la cual está reportada con un contenido de Manool de 6-8 % en peso seco de la madera y un 70 % en peso seco del extracto hexánico. Esto inspira para realizar la búsqueda de algunos productos derivados de la estructura hidrocarbonada mediante transformaciones química (Carman y Duffield 1993; Salazar y Villamizar, 2013b). En 1989 se determinó costo/producción de Manool a partir de materia vegetal del pino rosa y se estimó que el precio de Manool fue de \$16/lb. Esta producción de Manool reportó un aumento del interés por parte de empresas comerciales de Europa y América del Norte para intentar exportar a Manool. En el mismo año se realizó una encuesta la cual mostró que el pino rosa creció principalmente en la costa Oeste de la Isla Sur de Nueva Zelanda lo que representaba 10 200 toneladas de madera seca estimando un suministro de 20 t de Manool crudo por año durante un período de 25 años (Brooker *et al.*, 1989), esto abre un nuevo potencial para el desarrollo e implementación de nuevos métodos para la generación y obtención de Manool de origen natural.

## 6.1 Características biotecnológicas del diterpeno Manool

### 6.1.1 Usos de la estructura hidrocarbonada de Manool

La síntesis es uno de los procesos básicos en el área química, se utilizan en algunos casos estructuras moléculas de origen orgánico que contengan una porción de su estructura para la síntesis de otra moléculas. Manool es materia prima de partida para la síntesis química con reacciones de oxidación, ozonólisis reductora, deshidratación y con procesos fotoquímicos para eliminar la cadena lateral y utilizar la estructura bicíclica quiral para la síntesis efectiva de sesquiterpenos tipo drimano (Villamizar *et al.*, 2011; Salazar y Villamizar, 2013a) y diterpenoides tipo labdano y podocarpano (Salazar y Villamizar, 2013b). En procesos que implica retirar o retener la cadena lateral para reducir el número de pasos en la ruta de síntesis de un producto en particular y disminuir la probabilidad de la formación de productos secundarios o contaminantes que disminuyen el rendimiento final del producto deseado. Estos compuestos incluyen diterpenos aromáticos, labdanos, purinas y diterpenos tricarbocíclicos. Los compuestos derivados por síntesis química a partir de la estructura de Manool presentan propiedades similares a Manool: larvicidas, antifúngicas antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, citotóxicas y hepatoprotector, se determinó incluso actividad inhibitoria contra la enzima aldosa reductasa (AR), aldehído ciclasa,  $\beta$ -glucosidasa y fofolipasa A<sub>2</sub> (Salazar y Villamizar, 2013a; 2013b). Utenova y Gundersen, (2004) llevaron a cabo la síntesis de la agelasina-D a partir de Manool, ésta molécula pertenece al grupo de las sales de agelasinas (agelasina-A, Agelasina-B, agelasina-C y agelasina-D) aisladas de esponjas marinas y a las cuales se les atribuye el efecto antimicrobiano, citotóxico e inhibitorio de la Na,K-ATPasa. Por otra parte, el terpeno Manool está presente en cantidades menores en algunos destilados de ginebras comerciales, un ejemplo es “Drink London Gin”, Manool otorga propiedades de olor y sabor junto con otros diterpenos de tipo totarano, pimarano y abietano (Vichi *et al.*, 2008). En 1991 Aranda *et al.* determinaron que era posible utilizar la maquinaria bioquímica de la cepa ATCC 4740 de *Mucor plumbeus* para obtener derivados hidroxilados de Manool.



## 6.1.2 Alternativa biológica de Manool

La diversa composición química del metabolismo vegetal confiere propiedades diferentes a las plantas contra aquellos enemigos naturales o depredadores. Los productos naturales son una alternativa para controlar sin perjudicar la flora y fauna local. Manool presenta actividades biológicas diferentes: Rhafouri *et al.*, en 2004 determinaron actividad antifúngica contra tres hongos causantes de la pudrición de madera: *Gloeophyllumtrabeum*, *Poria placenta* y *Coriolus versicolor*. También, la actividad antimicrobiana se determinó en contra de flora microbiana asociada con caries (Moreira *et al.*, 2013), genotoxicidad (Nicolella *et al.*, 2014), citotoxicidad contra líneas celulares cancerígenas (Oliveira *et al.*, 2016). Hanari *et al.*, (2001) determinaron que la infección por cancro en la especie de *Chamaecyparis obtusa* estimula la biosíntesis de diterpenos tipo labdano y en particular de Manool para contrarrestar el ataque de algunos microorganismos. Dos años después (Hanari *et al.*, 2003) vuelve a determinar que la infección por cancro en *Thujopsis dolabrata* var. *Hondae* aumenta la biosíntesis de molécula terpénicas de Manool y disminuye la biosíntesis de otros extractivos.

Al diterpeno Manool lo encontramos en la resina natural Sandáracas obtenida de plantas pertenecientes a la familia de Cupresaceae (*Tetraclinis articulata*). Es una resina que se utilizó a lo largo de la historia para fines artísticos como parte de barnices protectores, en técnicas de dorado, en aditivos para modular la rigidez de las capas pictóricas y fijadores para el dibujo artístico (Romero *et al.*, 2014).

## 6.2 Propiedades de Manool

### 6.2.1 Características predichas

Los compuestos químicos se caracterizan por poseer propiedades físicas o químicas, estas propiedades son una herramienta para identificar al tipo de compuestos mediante reacciones que se realicen con ellos. La geometría estructural que presenta cada compuesto dilucidado genera diferentes propiedades físico-químicas, dado que la química computacional es útil en la comprensión de sistemas químicos, se usa de herramienta para predecir propiedades moleculares útiles para el respaldo en investigaciones experimentales. Para el caso de Manool se realizó una predicción de

características físicas y químicas con la ayuda de un ordenador y el software [Calculated using Advanced Chemistry Development \(ACD/Labs\) Software V11.02](#) en la base de datos de SciFinder y [ACD/Labs Percepta Platform-PhysChem Module](#) de la base de datos ChemSpider mostrados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Propiedades de manool

<b>Características físicas y químicas</b>	
Fórmula	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O
Densidad	0.9 ± 0.1 g/cm <sup>3</sup> a 20 °C
Entalpia de vaporización	71.14 ± 6.0 KJ/mol
Punto de fusión	53 °C
Peso molecular	290.491 g/mol
Punto de ebullición	368 °C a 760 mmHg
Punto de inflamación	118.2 ± 15.6 °C
pKa	14.47 ± 0.29 a 25 °C
Superficie polar	20.2 Å <sup>2</sup>
Vapor de presión	6.45x10 <sup>-7</sup> Torr a 25 °C
Volumen molar	310.2 ± 5.0 cm <sup>3</sup> /mol a 20 °C
[α] <sub>D</sub>	+ 33°
H donados	1
H aceptados	1

El extracto crudo de *H. biformis* o resina es un 70 % de manool, el cual puede ser aislado por cromatografía junto con un sistema de solventes de hexano/éter 95:5 (Carman y Duffield 1993; Salazar y Villamizar, 2013b). López en (2010) realizó una simulación por medios computacionales para determinar los valores de mínima energía para la molécula de Manool mediante el software [Hiperchem](#) el cual genera aproximaciones químicas de acuerdo a la estructura de la molécula: Energía total de formación: -76 932 Kcal/mol, una energía de enlace de -5 247 Kcal/mol y energía electrónica de -71 684 Kcal/mol

## 6.3 Nombres químicos

### 6.3.1 Nombre de IUPAC

(3R)-3-metil-5-[(1S,4aS,8aS)-5,5,8a-trimetil-2-metilendecahidro-1-naftalinil]-1-penten-3-ol  
5-(5,5,8a-trimetil-2-metilideno-3,4,4a,6,7,8-hexahidro-1H-naftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-3-ol

### 6.3.2 Sinónimos

(13R)-Labda-8(20),14-dien-13-ol

(13R)-manool

1- Naftalenopropanol

Labda-8(17),14-dien-13(R)-ol

### 6.4 Mezcla epimérica

Las plantas son una fuente principal de productos químicos con potencial en la industria química. La explotación de esta diversidad de compuestos químicos está rigidamente limitada por las dificultades en la extracción de compuestos puros a partir de fuentes naturales. El diterpeno manool y el epímero 13-*epi*-manool son moléculas diastereoisoméricas figura 9, son dos tipos de terpenos que tienen múltiples centros estereogénicos pero difieren en la configuración en solo uno de ellos. La disposición de los átomos en el espacio afecta una propiedad física en cada molécula denominada actividad óptica  $[\alpha]_D$  la cual se determina con mayor certeza cuando los compuestos están puros (Carey, 2006). Sin embargo, hasta el momento en cada ocasión que se presenta la mezcla estereoisomérica se obstaculiza la separación de Manool obteniendo diferentes valores esto se confirma con la  $[\alpha]_D$  comparada con la  $[\alpha]_D$  de Manool puro (Sayama y Kyogoku, 1971; Ribo *et al.*, 1974; Villamizar *et al.*, 2011).

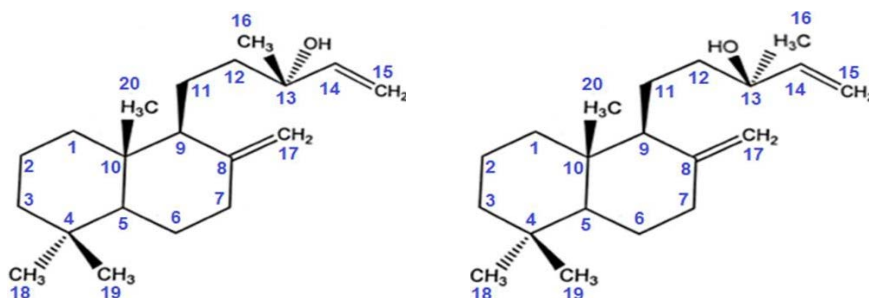


Figura 9. Estructura de manool (A) y 13-*epi*-manool (B)

Estos dos compuestos presentan propiedades físicas y cromatográficas similares, esto ocasiona que sean difíciles de distinguir uno de otro (Conner y Rowe, 1976).

Estos diterpenos son detectados en mezcla en extractos de duramen de *E. cyclocarpum* (Pamatz, 2008). López en 2010 caracterizó a un derivado de la serie de Manool: 7-hidroximanool que mediante el programa de simulación computacional determinó la semejanza en las energías de formación de las moléculas de Manool, 13-*epi*-manool y el compuesto caracterizado 7-hidroximanool.

## 7. Justificación

El diterpeno Manool se utiliza para la elaboración de productos preservantes en áreas tecnológicas. El Manool está presente junto con su diastereoisómero 13-*epi*-manool y el derivado 7-hidroximanol en duramen de *Enterolobium cyclocarpum* lo cual obstaculiza su separación. Por ello, es necesario el establecer parámetros físicos en un sistema de destilación con vapor de agua para la separación a partir de madera de duramen.

## 8. Hipótesis

El diterpeno Manool es separado de sus derivados presentes en madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* mediante un sistema de destilación con vapor de agua

## **9. Objetivo general:**

Separar al diterpeno Manool de sus derivados presentes en madera de duramen de *Enterolobium cyclocarpum*

### **9.1 Objetivos particulares:**

- 1.- Seleccionar los extractos de duramen de *E. cyclocarpum* con la mezcla de manool y sus derivados
- 2.- Determinar la variabilidad de los extraíbles de duramen en *E. cyclocarpum*
- 3.- Establecer los parámetros físicos es un destilador con vapor de agua para la recuperación de manool libre de sus derivados

## 10. Estrategia experimental



**1**

Colecta legar de la biomasa de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* de tres regiones diferentes

**2**

Obtener los extractos vegetales con solventes de polaridad ascendente a partir de duramen de *E. cyclocarpum*

**3**

Analizar mediante Resonancia Magnética Nuclear-<sup>1</sup>H los extractos vegetales y las fracciones obtenidas por destilación

**4**

Determinar los parametros físicos en un sistema de destilación con vapor de agua para la seracion de Manool de sus derivados



## 11. Materiales y métodos

### 11.1 Localidades de colecta de la materia vegetal

El material vegetal es polvo de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. procedentes de distintas regiones que permiten la colecta legalmente para seleccionar el sitio de muestreo figura 10. La primera se colectó de Veracruz, Veracruz (19° 12' latitud Norte y 96° 08' longitud Oeste), la segunda colecta de Aguililla, Michoacán (18° 44' latitud Norte y 102° 00' 47" longitud Oeste) y la tercera de Ixtapa, Guerrero (17° 38' 12" latitud Norte 101° 33' 05" longitud Oeste). La cantidad de la materia vegetal se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Biomasa para la obtención de los extractos vegetales de *E. cyclocarpum*

Localidad de muestreo	Materia prima (Kg)
Aguililla, Michoacán	0.625
Veracruz, Veracruz	2.380
Ixtapa, Guerrero	5.235



Figura 10. Zonas de colecta de *E. cyclocarpum*. Azul: Aguililla, Michoacán. Gris: Ixtapa, Guerrero. Verde; Veracruz, Veracruz

## 11.2 Obtención de los extractos vegetales

### 11.2.1 Maceración sucesiva con solventes de polaridad ascendente

El polvo de duramen de *E. cyclocarpum* de las tres diferentes localidades se obtuvo con ayuda de un molino (THOMAS CIENTIFICO®) para reducir la longitud de partícula y tamizarlo con malla No. 40 (0.5 mm<sup>2</sup>). La obtención de los extractos se realizó por maceraciones sucesivas con solventes de polaridad ascendente hasta agotar componentes. El volumen de los solventes: hexano (Baker 9309-03), cloruro de metileno (Baker 9324-03) y metanol (Baker 9070-03) fue de 2-5 L aproximados. Después de haber transcurrido el tiempo de maceración, se filtraron y concentraron los extractos con un evaporador rotatorio Buchi (rotavapor R-114 y un baño de agua B-480).



Figura 11. Proceso de obtención de extractos vegetales

### 11.2.2 Desengrasado de extracto con metanol

Los ácidos grasos presente en los extracto hexánicos y metilénicos interfieren en el proceso de destilación y la caracterización espectroscopia de las señales de manool por análisis de resonancia magnética nuclear. Por esta razón, fue una prioridad la eliminación cualitativa de las grasas presentes

en el extracto para la caracterización de manool. Una vez que los extractos se mantuvieron a peso constante se volvió a disolver con metanol absoluto y expuesto a temperaturas de  $-0^{\circ}\text{C}$  durante 24 h para que los ácidos grasos precipitaran y así retirarlos mediante filtración.

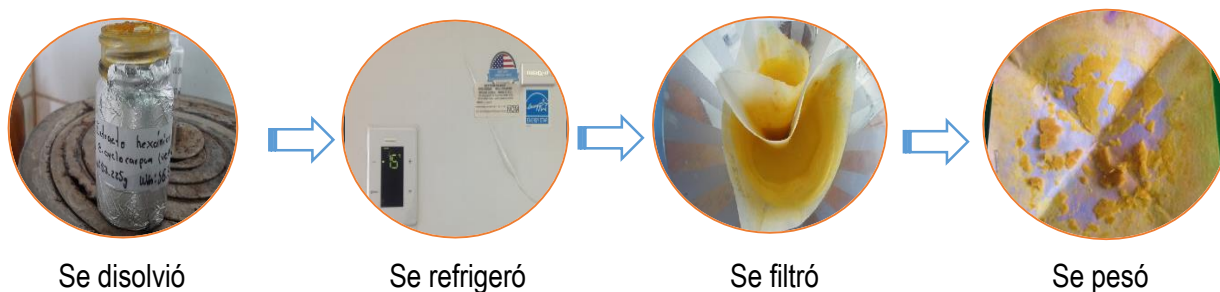


Figura 12. Separación de ácidos grasos de un extracto apolar

La biomasa de Ixtapa, Guerrero fue la seleccionada por la cantidad disponible para iniciar la experimentación y establecer las variables convenientes para obtener a Manool de los extractos vegetales. La obtención de los extractivos se realizó semanalmente durante 1 mes y además se realizó una sola extracción a las 4 semanas de maceración a partir de la biomasa distinta a la que se utilizó en las extracciones sucesivas semanalmente.

### 11.2.2 Maceración únicamente con metanol

La obtención del extracto metanólico se realizó por maceración con alcohol metílico grado HPLC (Baker 9093-02) hasta agotar componentes (a partir de biomasa sin ningún tipo de extracción con solventes). Después de haber transcurrido los tiempos de maceración, se filtró y concentró los extractos con un evaporador rotatorio Buchi (rotavapor R-114 y un baño de agua B-480).

## 12. Resultados

### 12.1 Extractos vegetales

Los extractos de duramen de *E. cyclocarpum* se obtuvieron mediante maceración matanólica o maceración sucesiva. Las maceraciones sucesivas con solventes de polaridad ascendente permiten separar compuestos de diferente polaridad. Los extractos obtenidos son del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* de las localidades: Aguililla Michoacán, Ixtapa Guerrero y Veracruz Veracruz, para la identificación de la biomasa de las diferentes localidades se utilizaron códigos: Ec-AM, Ec-IG y Ec-VV, respectivamente. Los extractos obtenidos de la localidad de Ec-IG sobresalieron en rendimiento en comparación con los extractos de Ec-AM y Ec-VV, ver el cuadro 6, por lo cual la madera de duramen de Ec-IG fue el candidato para iniciar la parte experimental. En el mismo cuadro se muestra el rendimiento de la maceración únicamente con metanol a partir de Ec-VV y Ec-IG. En el caso del polvo de duramen de Ec-AM no fue posible la maceración únicamente con metanol por la escasa disposición de la biomasa.

Cuadro 6. Rendimiento de los modelos experimentales para la destilación con vapor de agua

Duramen de <i>E. cyclocarpum</i>	Maceración								Polvo de duramen	
	Sucesiva						Metanólica			
	Hexano		Diclorometano		Metanol				SM	CM
	P	R	P	R	P	R	P	R		
<b>Ec-AM</b>	0.42	0.07	3.03	0.49	27	4.15	SD	SD	0	0
<b>Ec-VV</b>	0.79	0.13	3.36	0.54	70	11.2	21	3.5	0	0
<b>Ec-IG</b>	7.29	1.16	6.16	0.99	73	12.0	65	14.7	0	0

P: pesos seco (g). R: rendimiento (%). SD: sin determinar. SM: sin maceración. CM: con maceración

### 12.2.1 Evaluación del duramen de *E. cyclocarpum* (Ec-IG)

### 12.2.2 Curso temporal de la maceración sucesiva de duramen de *E. cyclocarpum*

La evaluación de se inició por maceración sucesiva de biomasa de Ec-IG. El análisis del curso temporal de la maceración sucesiva se realizó con duramen de Ec-IG por la cantidad disponible de duramen para el análisis de este. La extracción fue hasta agotar componentes para la obtención de los diterpenos de interés. Con la finalidad de establecer si las condiciones atmosféricas son un factor que influyen para encontrar la presencia de manool y sus derivados en extractos de duramen. También para determinar si los componentes del extracto dificultaban la obtención del diterpeno Manool libre del 13-*epi*-manool y 7-hidroximanool. Los rendimientos disminuyeron por la extracción sucesiva de los componentes de duramen excepto la maceración que fue evaluada únicamente a la semana 4. En el cuadro 9 se muestran los valores de los rendimientos y se muestra que los extractos metanólicos son los que sobresalen tanto en peso como en rendimiento.

Cuadro 7. Curso temporal del rendimiento de extractos de duramen (Ec-IG)

Origen	Biomasa (Kg)	Tiempo de maceración (semanas)	Peso seco del extracto (P = g; R = %)					
			Hexánico		Metilénico		Metanólico	
			P	R	P	R	P	R
Ec-IG	2.55	1	17.16	0.67	10.32	0.40	20.00	0.78
		2	7.47	0.29	4.66	0.18	13.46	0.54
		3	3.13	0.12	7.37	0.28	6.00	0.24
		4	2.00	0.08	2.50	0.1	5.00	0.20

P: peso, R: rendimiento.

### 13. Discusión

La madera como material de origen orgánico está formada fundamentalmente por los polisacáridos: celulosa y hemicelulosa. La madera tiene la desventaja de ser degradada por agentes biológicos que incluyen hongos, bacterias e insectos. Así mismo la madera es base de carbono por los polisacáridos presentes los cuales originan que sea un material para generar combustible (Raya, 2007; Ávila, 2012a). Los insectos barrenadores de madera son la principal causa que afectan áreas forestales y productos maderables (SEMARNAT, 2016).

Hoy en día existe una diversidad de compuestos formados por síntesis química, generados para mitigar o contrarrestar el ataque por un depredador. Todos estos compuestos no son del todo inocuos, llegan al medio ambiente con relativa facilidad modificando la composición natural del agua, suelos, aire e incluso los alimentos, que los convierte en contaminantes químicos ambientales. Los productos sintéticos destinados a controlar plagas y enfermedades en los vegetales son los responsables de la resistencia a insecticidas y la perturbación a polinizadores alterando su ciclo de vida (Wottitz y Moreno, 2011). El pentaclorofenol (PCP) y su sal sódica, el pentaclorofenato de sodio (NaPCP) son compuestos lipofílicos efectivos de amplio espectro de toxicidad, con capacidad de bioacumulación (recalcitrantes), usados para la preservación de la madera contra hongos, bacterias e insectos, pero presenta efectos colaterales que repercuten en la fauna y flora silvestre y así afectan severamente al medio ambiente, detectado con mayor frecuencia en muestras de alimentos. En seres humanos es mutágeno, causa toxicidad aguda y produce alteraciones en el sistema inmunológico y endocrino. En México está autorizado para uso forestal en el área de preservación de madera, pero el PCP está prohibido totalmente en otras 27 naciones, entre ellas Alemania, Suecia y Dinamarca (Castillo y Bárcenas, 1998; Pietsch *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2015), por lo cual es necesario la búsqueda de compuestos para proteger maderas percederas que no afecten la fauna silvestre así como al ser humano.

Los metabolitos secundarios de plantas son una alternativa de tratamiento que permiten en la actualidad minimizar el ataque en las situaciones de riesgo inminente de la madera. La durabilidad natural contra hongos e insectos es una propiedad intrínseca que incrementa el valor económico y uso de algunas especies forestales como el caso partículas de *Enterolobium cyclocarpum*. El usos de

su madera y aplicación en estructuras aumenta el tiempo de vida media en servicio y esto se puede observar en el ahorro de costos adicionales de instalación en la sustitución de maderas degradadas (Colín *et al.*, 2015). En el caso particular de *E. cyclocarpum* Raya en (2007) describió que en el extracto acuoso obtenido de duramen está presente el diterpeno Manool el cual es un compuesto con uso para la preservación de maderas percederas, además exhibe una diversidad de usos tecnológicos por la estructura molecular que presenta. En este trabajo fue de interés la recuperación de manool a partir de madera de duramen de *E. cyclocarpum*.

El árbol de *E. cyclocarpum* se distribuye en las vertientes del Golfo de México y Pacífico del territorio de la república Mexicana (Francis y Loe, 2000; CONABIO, 2016) y su madera por su durabilidad natural es un recurso impulsor de trabajo en la elaboración de vigas, enseres y muebles, por ello es interesante la estimación paralela de los residuos sólidos generados en la transformación de la madera de parota. Esta generación en el proceso de aserrío de residuos sólidos es una alternativa potencial para la recuperación de manool mediante un sistema de destilación con vapor de agua por su relativa practicidad. El diterpeno manool es un componente mayoritario de los extractos obtenidos de duramen de *E. cyclocarpum*, además, se usa para proteger madera por exhibir efectos antifúngico, antitermita, e inclusive actividad herbicida y citotóxica (Rhafouri *et al.*, 2004; Villamizar *et al.*, 2013a; Nicollela *et al.*, 2014). Por ello la recuperación de Manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum* es una alternativa natural que contribuye a la protección de maderas percederas como la madera de pino.

De los resultados obtenidos de las maceraciones sucesivas indican que los extractos obtenidos de la región de EC-IG sobresalen en rendimiento en comparación con los demás extractos obtenidos de las dos regiones diferentes (Ec-AM y Ec-VV). Los extractos metanólicos son los indicados para la recuperación de manool.

## **14. Conclusión**

El sistema de destilación es adecuado para la separación de Manool, esto da pauta para la optimización el rendimiento de Manool proveniente de materia vegetal en un modelo piloto de destilación con vapor de agua



## 15. Referencias Bibliográficas

- Ali A.**, Tabanca N., Demirci B., Blythe E.K., Ali Z., Baser K.H.C. y Khan K.A. (2015). Chemical Composition and Biological Activity of Four *Salvia* Essential Oils and Individual Compounds against Two Species of Mosquitoes. *J. Agric. Food Chem.* 63: 447-456
- Aranda G.**, El Kortbi MS., Lallemand JY., Neuman A., Hammoumi A., Facon I. y Azerad R. (1991). Microbial transformation of diterpenes: hidroxylation of sclareol, manool and derivates by *Mucor plumbeus*. *Tetrahedron.* 47(39): 8339-8350
- Arango O.**, Hurtado A., Castillo P. y Santa cruz M. (2009). study of extraction conditions of "laurel de era" (*morella pubescens*) essential oil by means of steam distillation. *Facultad de Ciencias Agropecuarias.* 7(2)
- Aguilar Rivera N.** (2004). Importancia, manejo y control de extraíbles e incrustaciones (*pitch*) en la fabricación de papel. *Madera y Bosques.* 10(1): 89-99
- Amri I.**, Hanana M., Jamouss B. y Hamrouni L. (2012). Essential oils of *Pinus nigra* J.F. Arnold subsp. *laricio* Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. *Arabian Journal Chemical:* <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.026>
- Ávila Calderón L.E.** (2012a). Fundamentos de Química de la Madera. Morevalladolid S. de R.L. de C.V. pp 94-97
- Ávila Calderón L.E.** y Herrera M.A. (2012b). Effect of extractives on three physical properties in *Enterolobium cyclocarpum* from Michoacan, Mexico. *Bosque.* 33(2): 227-232
- Bamber R.K.** (1976). Heartwood, its Function and Formation. *Wood Science and Technology.* 10: 1-8
- Barrientos Ramírez L.**, Huerta Cisneros M., Vargas Radillo J.J. y López Dellamary F. (2009). Estudio de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (parota) su Importancia forestal y valor nutricional T. Primera edición. Universidad de Guadalajara Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2015. Silvicultura comunitaria (online). Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx/web/temas-forestales/silvicultura-comunitaria/>

**Bian X.**, Bai J., Hu X., Wuc X., Xue C., Han A., Sub G., Hua H. y Pei Y. (2015). Penioxalicin, a novel 3-nor-2,3-seco-labdane type diterpene from the fungus *Penicillium oxalicum* TW01-1. Tetrahedron Letters. 56: 5013–5016

[Blanco E. y Alfaro J. \(2014\). Chemical modification of \*Caloplylum brasiliense\* Cambess. and \*Enterolobium cyclocarpum\* \(Jacq.\) Griseb. wood. Colombia forestal. 17\(1\): 125-132](#)

**Caniard A.**, Zerbe P., Legrand S., Cohade A., Valot N., Magnard J.L., Bohlmann J. y Legendre L. (2012). Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. BMC Plant Biology. 12: 119

**Carman R.M.** y Duffield A.R. (1993) The biosynthesis of labdanoids. The optical purity of naturally occurring Manool y Abienol. Aust. J. Chem. 46: 1105-1114

**Camilo Durán G.D.**, Monsalve L.A. Martínez J.R. y Stashenko E. (2007). Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. Scientia et Technica. ISSN 0122-1701

**Castillo Morales I.** y Bárcenas C. (1998). Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. Madera y Bosque. 4(2): 21-37

**Cerda García Rojas C.M.**, García Gutiérrez H.A., Hernández Hernández J.D. Román Marín L.U., y Nathan P.J. (2007). Absolute Configuration of Verticillane Diterpenoids by Vibrational Circular Dichroism. J. Nat. Prod. 70: 1167-1172

**Cheng S.S.**, Chung M.J., Lin C.Y., Wang Y.N. y Chang S.T. (2012). Phytochemicals from *Cunninghamia konishii* Hayata Act as Antifungal Agents. J. Agric. Food Chem. 60: 124–128

**Conner A.H** y Rowe J.W. (1976). Differentiating manool and 13-epimanool with NMR chiral shift reagents. Phytochemistry 15:1949-1951

- Colín Urieta S.**, Carrillo Parra A., Rutiaga Quiñones J.G., González Rodríguez H., Jurado Ybarra E., Heya Maginot N. y Aguirre C.O. (2015). Natural weathering of eight important timber trade Mexican species. *International Journal of Agricultural Policy and Research*. 3(1): 29-38
- Couladis M.**, Tzakou O., Stojanovic D., Mimica-Dukic N. y Jancic R. (2001). The essential oil composition of *Salvia argentea* L. *Flavour Fragrance Journal*. 16: 227–229
- Cyr A.**, Wilderman P.R., Determan M y Peters R.J. (2007). A modular approach for facile biosynthesis of labdane-related diterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 129(21): 6684–6685
- Dávalos Sotelo R.** y Morosini Cordero F. (2000). Desarrollo sostenible, medio ambiente y economía en el sector forestal. *Madera y Bosques* 6(2): 3-12
- Dayan F.E.**, Cantrell C.L. y Duke S.O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17: 4022–4034
- Dewick P.** (1999). The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*. 16: 97–130
- Dudai N.**, Lewinsohn E., Larkov O., Katzir I., Ravid U., Chaimovitch D., Sa'adi D. y Putievsky E. (1999). Dynamics of yield components and essential oil production in a commercial hybrid sage (*Salvia officinalis* y *Salvia fruticosa* cv. *Newe Ya'ar*). *J. Agric. Food Chem.* 47: 4341-4345
- Fang Q.**, Shic X., Zhanga L, Wanga Q., Wanga X., Guoa Y. y Zhoua B. (2015). Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae. *Journal of Hazardous Materials*. 283: 897–904
- Francis J.K.** y Lowe C.A. (2000). Silvics of native and exotic trees of Puerto Rico and the Caribbean islands. Gen. Tech. Rep. IITF-15. Río Piedras, PR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry. 582 p
- Fengel D.** y Wegener G. (1989). *Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter. Berlin, Alemania. pp 81-82

**García Sánchez E.**, Ramírez López C.B., Talavera Alemán A., León Hernández A., Martínez Muñoz R.E., Martínez Pacheco M.M., Gómez Hurtado M.A. Cerda García Rojas C.M., Joseph Nathan P. y del Río R.E. (2014). Absolute configuration of (13R)- and (13S)-labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocosotepecana*. *Journal of Natural Products*. 77: 1005–1012

**Gershenson J.** y Dudareva N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*. 3(7)

**Gierlinger N.**, Jacques D., Grabner M., Wimmer R., Schwanninger M., Rozenberg P. y Pâques L.E. (2004). Colour of larch heartwood and relationships to extractives and brown-rot decay resistance. *Trees* 18(1): 102–108

**Gulevich A.V.**, Balenkova E.S. y Nenajdenko V.G. (2007). The first example of a diastereoselective thio-Ugi Reaction: A new synthetic approach to chiral Imidazole derivatives. *J. Org. Chem.* 72: 7878-7885

**Hanari N.**, Yamamoto H., Ooi T., Kusumi T. y Kuroda K. (2001). A new diterpene dimer from the bark of *Chamaecyparis obtusa*. *J Wood Sci.* 47:36-40

**Hanari N.**, Yamamoto H., Kusumi T. y Kuroda K. (2003). Distinction of resin compounds between the healthy bark and the resinous stem canker of *Thujopsis dolabrata* var. *Hondae*. *J Wood Sci.* 49:548–552

**Hillis W.E.** (1987). *Heartwood and Tree Exudates*. Springer Verlag: Germany

**Hoadley R.B.** (2000). **Understanding wood: craftman´s guide to Wood technology. The Taunton Press. United States of America. pp. 7**

**IAWA.** (1989). List of Microscopic features for hardwood identification. Committee on Nomenclature International Association of Wood Anatomists. 323-324

- Isaza J.H.**, Veloza L.A., Ramírez L.S., Calle L.M., Jiménez F.J, Ramírez J. y Gómez L.C. (2005). Actividad ictiotóxica de *Miconia coronata* (BONPL.) D.C. (MELASTOMATACEAE). *Scientia et Technica*. (28)
- Jiménez Hernández J.**, Meneses Esparza F., Rosendo Escobar J., Vivar Vera M.A., Bello Pérez L.A. y García Suarez F.J. (2011). Extraction and characterization of starch from *Enterolobium cyclocarpum* sedes. *CyTA Journal of Food*. 9(2): 89–95
- Juacida R. y Villanuevas J. (1996). Natural durability of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Bosque* 17(1): 83-90**
- Khajeh M.**, Yamini Y., Sefidkon F. y Bahramifar N. (2004). Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 86: 587–591
- Kulcički V.**, Grinco M., Vlad P.F. y Ungur N. (2006). Electrophilic cyclization of diterpenoids. *Natural Product Chemistry and Synthesis*. 1(1): 22-35
- Knoss W.**, Reuter B. y Zapp J. (1997). Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a on-mevalonate pathway. *Biochem. J*. 326: 449-454
- Kollmann, F.** (1959). Anatomía y patología de la madera: Tecnología de la madera y sus aplicaciones. Graficas Reunidas S.A: Madrid, pp. 1-8
- Lange B.M.**, Rujan T., Martin W. y Croteau R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *PNAS*. 97(24): 13172-13177
- López Hernández Y.** (2010). Nuevo método de separación de manool. Tesis para obtener el título de ingeniera bioquímica. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Martínez Muñoz R.E.**, Raya González D., Cajero Juárez M., Calderón Raya M., del Rio R.E. y Martínez Pacheco M.M. (2009). Inocuous use of aqueous extract obtained from the heartwood of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Pharmacologyonline*. 2: 1091-1096

- Martínez Pacheco M.M.**, del Rio R.E., Flores García A, Martínez Muños R.E., Ron Echeverría O.A. y Raya González D. (2012). *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.: The biotechnological profile of a tropical tree. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11(5): 385-399
- Mejía Díaz L.A.** y Rutiaga Quiñones J.G. (2008). Chemical composition of *Schinus molle* L. Wood and kraft pulping process. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7(2): 145-14
- Moreira R.M.**, Souza A.B. Moreira M.A., Bianchi T.C., Carneiro L.J., Estrela F.T., dos Santos R.A., Januário A.H., Martins C.H.G., Ambrosio S.R. Y Veneziani R.C.S. (2013). RP-HPLC analysis of manool-rich *Salvia officinalis* extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23(13): 870-876
- Muñoz M.A.**, Muñoz O. y Nathan P.J. (2006). Absolute configuration of natural diastereoisomers of 6â-Hydroxyhyoscyamine by vibrational circular dichroism. *J. Nat. Prod.* 69: 1335-1340
- Nicolella D.H.**, de Oliveira PF., Munari C.C., Diaz GF., Moreira MR., Sola, R.C. y Tavares DC. (2014). Dfferential effect of manool – A diterpene from *Salvia officinalis* on genotoxicity induced by methyl methanesulfonate. *Food and Chemical Toxicology*. 72: 8-12
- Romero Noguera J.**, Martín Sánchez I., Doménech Carbó M.T., Osete Cortina L., López Miras M.M. y Bolívar Galiano F. (2014). Analytical characterisation of the biodeterioration of diterpenoid labdanic varnishes used in pictorial techniques: Sandarac and Manila copal. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 90: 99-105
- Obando M.F.** y Moya R. (2103). Silviculture conditions and wood properties of *Samanea saman* and *Enterolobium cyclocarpum* in 19-year-old mixed plantations. *Forest Systems*. 22(1): 58-70
- Ojeda Á.**, Obispo N., y Gil J. L. (2013). Annual variation of chemical composition and astringency of the foliage of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Avances en Investigación Agropecuarias*. 17(3):25-34

- Oni A.O.**, Onwuka C.F.I., Oduguwa O.O., Onifade O.S. y Arigbede O.M. (2008). Utilization of citrus pulp based diets and *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb foliage by West African dwarf goats. *Livestock Science*. 117:184–191
- Olate V.R.**, Usandizaga O.G. y Schmeda-Hirschmann G. (2011). Resin Diterpenes from *Austrocedrus chilensis*. *Molecules*. 16:10653-10667
- Olivares Pérez J.**, Avilés Nova F., Albarrán Portillo B., Rojas Hernández S. y Castelán Ortega O. A. (2011). Identification, uses and measurement of fodders legumes tree in south famers of the state of México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14:739 -748
- Oliveira P.F.**, Munari C.C., Nicolella H.D., Sola R.C. y Tavares D.C. Manool, a *Salvia officinalis* diterpene, induces selective cytotoxicity in cáncer cells. *Cytotechnology* DOI 10.1007/s10616-015-9927-0
- Oliveira J.D.**, Silva D.A., de Paula R.C.M., Feitosa J.P.A., y Paula H.C.B. (2001). Composition and effect of salt on rheological and gelationproperties of *Enterolobium contortisiliquum* gum exudate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 29:35–44
- Pal M.**, Mishra T., Kumar A. y Tewari .K. (2016). Biological evaluation of terrestrial and marine plant originated labdane diterpenes (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 50(8)
- Pennington, T.D.** y J. Sarukhán. 2005. Árboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. UNAM-FCE México. D.F.
- Pietsch C.**, Hollender J., Dorusch F. y Burkhardt-Holm P. (2014). Cytotoxic effects of pentachlorophenol (PCP) and its metabolite tetrachlorohydroquinone (TCHQ) on liver cells are modulated by antioxidants. *Cell Biol Toxicol*. 30:233–252
- Popova M.P.**, Graikou K., Chinou I. y Bankova V.S. (2010). GC-MS Profiling of Diterpene Compounds in Mediterranean Propolis from Greece. *J. Agric. Food Chem*. 58: 3167–3176 DOI: 10.1021/jf903841k
- Ramos Pantaleón D.**, Ávila Calderón L.E.A., Ochoa Ruíz H.G. y Rutiaga Quiñones J.G. (2011). Contenido de sustancias extraíbles en la madera de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Leguminosae). *Ciencia Nicolaita*. 53:7-19

- Raya González D.** (2007). Las maderas secas de encino (*Quercus* spp.) y pino (*Pinus* spp.) son protegidas del daño causado por *Lyctus* spp. E *Incisitermes marginipennis* (Latreille) con extractos vegetales acuosos. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas opción Biología Experimental. Morelia, Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
- Raya González D.**, Chávez Duran J., Urrutia Hernández S.E., Castro Ortiz R., Martínez Muños R.E., del Río R.E., Cajero Juárez M. y Martínez Pacheco M.M. (2008a). Estudio toxicológico del extracto acuoso obtenido del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Rev Cub Plant Med* 13: 11-17
- Raya González D.**, Pamatz Bolaños T., del Río Torres R.E., Martínez Muñoz R.E., Ron Echeverría O., Martínez Pacheco M.M. (2008b). D-(+)-pinitol a component of heartwood from *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 63C: 922 - 924
- Raya González D.**, Martínez Muños R.E., del Río R.E., Flores García A., Macías Rodríguez L.I. y Martínez Pacheco M.M. (2012). Volatiles constituents of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. with antitermite activity. *Emirates J Food Agric*
- Ramadana M.M.**, Abd-Algaderd N.N., El-kamalid H.H., Ghanemb K.Z. y Farragc A.R.H. (2013). Volatile compounds and antioxidant activity of the aromatic herb *Anethum graveolens*. *J Arab Soc Med Res*. 8:79–88
- Reyes Najár A.**, Castro Vargas H., Rodríguez Varela L., Quijano Celis C. y Parada Alfonso F. (2011). Obtención de extractos de jengibre (*Zingiber officinale*) empleando CO<sub>2</sub> supercrítico. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 35(136)
- Rhafouri R.**, Strani B., Zair T., Ghanmi M., Aafi ., Omari M.E. y Bentaye A. (2014). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the *Cedrus atlantica* (Endl.) Manettiex Carrière seeds essential oil. *Mediterranean Journal of Chemistry*. 3(5): 1034-1043
- Rutiaga Quiñones J.G.**, Windeisen E., Shumacher P. (1995). Antifungal activity of heartwoods extracts from *Dalbergia granadillo* and *Enterolobium cyclocarpum*. *Halz als Rho- und Werstoff*. 53(5): 308



- Rodríguez E.A.**, Árias A.J., Vásquez EG, Martínez J.R. y Stashenko E.E. (2012). Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico. *Revista Académica Colombiana de Ciencia*. 36(140)
- Rzedowski, J.** 1978. *Vegetación de México*. Editorial LIMUSA. México, D.F. México 432 p.
- Sallaud C.**, Giacalone., Romy Topfer R., Goepfert S., Bakaher N., Rosti R. y Tissier A. (2012). Characterization of two genes for the biosynthesis of the labdane diterpene Z-abienol in tobacco (*Nicotiana tabacum*) glandular trichomes. *The Plant Journal*. 72: 1–17
- Salazar F.J.** y Villamizar J. (2013a). Use of (+)-manool in the synthesis of natural products. Part I. Sesquiterpene. *Journal o Chemical Research*. 1-5
- Salazar F.J.** y Villamizar J. (2013b). Use of (+)-manool in the synthesis of natural products. Part II. Diterpenes and relatives. *Journal o Chemical Research*. 63-70
- Sekine N.**, Shibusaki S. y Yatagai M. (2013). Chemical composition of the terpenoids in wood and knots of *Abies species*. *Eur. J. Wood Prod*. 71:679–682
- Shebani A.N.**, Reenen A.J., Meincken M. (2008). The effect of Wood extractives on the termal stability of different Wood species. *Thermochimica*. 471: 43-50
- Sheng Yang W.**, Pin Fun C. y Shang Tzen C. (2005). Las actividades antifúngicas de los aceites esenciales y sus constituyentes de hojas de canela autóctona (*Cinnamomum osmophloeum*) contra hongos de descomposición de la madera. *Tecnología Bioambiental*. 96(7): 813-818
- Sowemimo A.**, Venables L., Odedeji M., Koekemoer T., van de Venter M. y Hongbin L. (2015). Antiproliferative mechanism of the methanolic extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.023>
- Scheffrahn R.**, Hsu R., Su N. Huffman J. y Midland S.L.. (1988). Allelochemical resistance of bald cypress, *Taxodium distichum*, Heartwood to the subterranean termite *Captotermes formosanus*. *Journal of Chemical Ecology*. 14(3)
- Strobel G.A.**, Stierle A. y Hess w.M. (1993). Taxol formation in yew- *Taxu*. *Plant Science* 92: 1-12

- Taârit Rayouf M.B.**, Msaada K., Hosni K. y Marzouk B. (2013). Essential oil constituents of *Salvia argentea* L. from Tunisia: Phenological variations. Medicinal and Aromatic Plant Science and biotechnology 7(1): 44-44
- Taverniers I.**, De Loose M. y Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends in Analytical Chemistry. 23: 8
- Tapp S.** y Croteau R. (2001). Genomic organization of plant terpene synthase and molecular evolutionary implication. Genetics. 158(2): 7516-7522
- Tapia Tapia E.** y Reyes Chilpa R. (2008). Productos forestales no maderables en México: Aspectos económicos para el desarrollo sustentable. Madera y Bosques. 14(3): 95-112
- Taylor A.M.**, Gartner B.L. y Morrell J.J. (2002). Heartwood formation and natural durability-A review. Wood and fiber science. 34(4): 587-611
- Tenorio C.**, Moya R., Salas C. y Berrocal A. (2016). Evaluation of wood properties from six native species of forest plantations in Costa Rica. Bosque. 37(1): 71-84
- Telmo J.** y Lousada J. (2011). The explained variation by lignin and extractive contents on higher heating value of wood. Biomass and Bioenergy 35: 1663-1667
- Thirunavoukkarasu M.**, Siddartha P., Prasad Rath S. y Behera A. (2008). Micropropagation of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Journal Sustainable Forestry. 23(4): 1-12
- Torres Rojo J.** (2000). Sostenibilidad del volumen de cosecha calculado con el método Mexicano de Ordenación de Montes. Madera y Bosques. 6(2): 57-72
- Valencia Ortiz C.** (1995). Constituyentes secundarios de las plantas: Fundamentos de Fitoquímica. Trillas: México pp 11-30
- Verma M.**, Sharma S. y Prasad R. (2009). Biological alternatives for termite control: A review. International Biodeterioration & Biodegradation. 63: 959-972
- Vega Menchaca M.C.**, Verde Star J., Oranday Cárdenas A., Morales Rubio M.E., Núñez González M.A., Rivera Guillén M.A., Serrano Gallardo L.B. y Rivas Morales C. (2013). Antibacterial and cytotoxic activity of *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnston from Northern Mexico against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Rev. mex. cienc. Farm. 44(2)

- Vichi S.**, Riu Aumatell M., Buxaderas S. y López Tamames E. (2008). Assessment of some diterpenoids in comercial distilled gin. *Analytica Chimica Acta*. 628: 222–229
- Vlad P.F.**, Russo A.G. y Lazur'evskii G.V. (1966). Synthesis of 13-*epi*-manool. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. 2(1): 29-32
- Utenova B.T.** y Lotte Gundersen L. (2004). Synthesis of (+)-agelasine D from (+)-manool. *Tetrahedrom letters*. 45:4233-4235
- White R.H.** (1987). Effect of lignin content and extractives on the higher heating value of wood. *Wood and fiber science* 19(4): 446-452
- Wottitz C.A.** y Moreno G.A. (2011). Chemical fixation of CCA-C preservative in wood of *Pinus elliottii*. Part 1: Influence of temperature and relative humidity. *Maderas, Cienc. Tecnol.* 13(1)
- Yoshida S.**, Morita Y., Narita K. y Okabe T. (1998). Termiticidal efficacy of neutral oil obtained from *Aomori hiba*. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*. 40, 311–315
- Zheljazkov V.D.** (2014). Essential oil yield and composition of garden sage as a function of different steam distillation Times. *Hortscience* 49(6): 785–790