UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

ENRIQUECIMIENTO EN MANOOL A PARTIR DE BIOMASA DE *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

TESIS presentada por:

I.Q. ANA KAREN CALDERÓN ORDAZ

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Dirigida por: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga
Co-dirigida por: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Morelia, Michoacán **Mayo 2022**

Asunto: Impresión de Tesis.

Lic. Ulises Gutiérrez Vázquez
Jefe del Departamento de Titulación de la
U.M.S.N.H.

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para notificarle, que después de haber dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "ENRIQUECIMIENTO EN MANOOL A PARTIR DE BIOMASA DE *ENTEROLOBIUM CYCLOCARPUM* (JACQ). GRISEB", después de haber revisado el manuscrito que presentó la alumna **Ana Karen Calderón Ordaz** con matrícula **1142080A** concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de su Tesis.

Por lo anterior este Comité Tutoral da el aval para su impresión final.

Asesor: Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga 07001002

Co-director: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco 94002061

Vocales:

Dr. Rafael Huirache Acuña 11000201

Dr. José Apolinar Cortés 82033374

Dr. Jaime Espino Valencia 04001940

A t e n t a m e n t e.
Morelia, Michoacán a 10 de marzo de 2022.

Dr. Luis Fernando Lira Barragán
Coordinador de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Química.

LFLB/mcpa.

ENRIQUECIMIENTO EN MANOOL A PARTIR DE BIOMASA DE *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

Presenta: Ana Karen Calderón Ordaz
Dirigida por: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga
Co-dirigida por: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco
Lugar de desarrollo: División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

RESUMEN

El manool es una molécula de interés por sus propiedades farmacológicas y biotecnológicas. El manool se obtiene por síntesis química, bioquímica o de material biológico. En plantas, esta molécula se encuentra junto con sus derivados y su enriquecimiento es un proceso difícil. Por ello, la propuesta es obtener fracciones enriquecidas en manool a partir del residuo de duramen del *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Parota) mediante un conjunto de procesos y operaciones unitarias. Los compuestos extraíbles totales del *E. cyclocarpum* (21.46 ± 0.02%) se obtuvieron por extracción sucesiva en polaridad ascendente con un equipo Soxhlet. Señales características de manool se detectaron en los extractos acetónicos (7.50 ± 1.82%) por ^{1}H-RMN. Los parámetros de extracción en Soxhlet se determinaron por un diseño factorial 2^3 ($p \leq 0.05$) donde se evaluó el tiempo de extracción, la relación masa/volumen y la temperatura, como variables control sobre el rendimiento del extracto. El tiempo (3 h) y la relación masa/volumen (1/30 g/mL) tuvieron un efecto significativo en el rendimiento de los extractos. Los extractos acetónicos se diluyeron en hexano. El manool en disolución se separó por filtración y se enriqueció por cromatografía en columna. El compuesto B (20 mg) se identificó como manool por ^{1}H-RMN, IR y CG/MS. El manool se obtuvo a partir de biomasa de duramen de *E. cyclocarpum* de tres regiones distintas. El análisis técnico-económico mostró que el proceso de enriquecimiento en manool a partir de biomasa de *E. cyclocarpum* para una escala de producción de 10 kg/d es rentable y factible como un proceso sustentable.

Palabras clave: Extracción sólido-líquido, compuestos extraíbles, duramen, productos naturales, Soxhlet.

ENRICHMENT IN MANOOL FROM BIOMASS OF *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

By: Ana Karen Calderón Ordaz
Director: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga
Co-director: Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco
Location: División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

ABSTRACT

Manool is a molecule of interest due to its pharmacological and biotechnological properties. Manool is obtained by chemical or biochemical synthesis and extraction from biological materials. In plants, this molecule is found with its derivatives and its enrichment is a difficult process. Therefore, this work proposes a methodology to obtain manool-enriched fractions from the heartwood residue of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Parota) through a series of processes and unit operations. The extractable compounds of *E. cyclocarpum* (21.46 ± 0.02%) were obtained by successive extraction in ascending polarity with a Soxhlet equipment. Characteristic manool signals were detected in the acetone extracts (7.50 ± 1.82%) by ^{1}H NMR. The Soxhlet extraction parameters were determined by a 2^3 factorial design ($p \leq 0.05$) where the extraction time, the mass/volume ratio, and the temperature were evaluated as control variables on the extract yield. The time (3 h) and the mass/volume ratio (1/30 g/mL) had a significant effect on the yield of the extracts. The acetone extracts were diluted in hexane. The manool in solution was filtered off and enriched by column chromatography. Compound B (20 mg) was identified as manool by ^{1}H NMR, IR and GC/MS. Manool was obtained from *E. cyclocarpum* heartwood from three different regions. The technical-economic analysis showed that the manool enrichment process from *E. cyclocarpum* biomass for a production scale of 10 kg/d is profitable and feasible as a sustainable process.

Keywords: Solid-liquid extraction, extractable compounds, hardwood, natural product, Soxhlet.

DEDICATORIA

A mi madre Laura Alicia Ordaz Adame, la mujer más tenaz que conozco, espero que con este logro sientas tu esfuerzo compensado.

A mi padre José Manuel Calderón Bucio, el hombre que dio su mayor esfuerzo para guiarme en mi camino.

“El carácter no puede ser desarrollado en tranquilidad y quietud. Sólo a través de pruebas y sufrimiento se puede fortalecer el alma, despejar la visión, inspirar ambición y lograr el éxito.”

- Helen Keller (1880-1968)

ÍNDICE

RESUMEN iii

ABSTRACT iv

DEDICATORIA v

LISTA DE TABLAS viii

LISTA DE FIGURAS ix

NOMENCLATURA x

GLOSARIO xii

AGRADECIMIENTO xiv

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Generalidades 1

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO 2

2.1 Metabolitos secundarios 2

2.2 Los terpenos 2

2.3 Los diterpenos 3

2.4 Diterpenos de tipo labdano 4

2.5 El manool 5

2.6 Propiedades del manool 6

2.7 Usos de manool 7

2.8 Mezcla empírica de manool 9

2.9 Métodos de obtención de manool 11

2.9.1 Síntesis química 11

2.9.2 Síntesis bioquímica 12

2.9.3 Síntesis biológica 12

2.10 El *Enterolobium cyclocarpum* para la obtención de manool 15

2.11 Extracción de metabolitos secundarios a partir de materiales vegetales 17
2.12 Técnicas analíticas en la separación de metabolitos secundarios 20
2.13 Elucidación de estructuras mediante técnicas espectroscópicas 21
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN 22
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS 23
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS 24
5.1 Objetivo general 24
5.2 Objetivos Específicos 24
CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA 25
6.1 Estrategia experimental 25
6.2 Material biológico 26
6.3 Acondicionamiento del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. 27
6.3.1 Tamaño de partícula 27
6.4. Caracterización del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. 27
6.5 Proceso de obtención de los extractos 27
6.6 Condiciones de operación 27
6.7 Determinación de los parámetros de equilibrio 29
6.8 Manool: Determinación estructural 29
6.8.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas 29
6.8.2 Espectroscopía de infrarrojo 29
6.8.3 Técnicas homonucleares ^{1}H-^{1}H: COSY (COrrelated Spectroscopy) 29
6.9 Evaluación de la cantidad de manool en el duramen de *E. cyclocarpum* de tres regiones distintas. 30
6.10 Análisis técnico-económico 30
6.11 Análisis estadístico 32

CAPÍTULO 7. RESULTADOS 33

7.1 Caracterización física del material biológico 33

7.2 Análisis fitoquímico del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. 33

7.3 Determinación de los parámetros de operación en Soxhlet 35

7.4 Diagrama de equilibrio de fases de la extracción en Soxhlet 36

7.7 Caracterización estructural del manool 39

7.8 Manool en el duramen de *E. cyclocarpum* de tres regiones distintas 40

7.9 Análisis técnico-económico 41

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 45

CAPÍTULO 9. CONCLUSIÓN 51

CAPÍTULO 10. RECOMENDACIONES 52

BIBLIOGRAFÍA 53

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Clasificación de los terpenos. 3
Tabla 2.2 Dilucidación de la estructura molecular y estereoquímica de manool. 6
Tabla 2.3 Propiedades fisicoquímicas del manool. 6
Tabla 2.4 Propuestas para el uso de manool en base a sus atributos. 8
Tabla 2.5 Extracción de manool a partir de material vegetal por diferentes métodos. 19

Tabla 6.1 Variables de estudio en el diseño factorial 2^3. 28
Tabla 6.2 Variables de estudio y matriz experimental en diseño factorial 2^3. 28
Tabla 6.3 Factores de estimación del costo total de inversión. 31

Tabla 7.1 Caracterización física del polvo de duramen de *E. cyclocarpum*. 33
Tabla 7.2 Seguimiento de los compuestos extraíbles del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. 33
Tabla 7.3 Análisis de varianza para el diseño factorial 2^3. 35
Tabla 7.4 Composición másica del extracto crudo acetónico y el residuo 38
Tabla 7.5 Rendimiento de manool del *E. cyclocarpum.* 40
Tabla 7.6 Costos de los equipos para la producción de manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum*. 42
Tabla 7.7 Costo total de inversión para la producción de manool a escala piloto. 43
Tabla 7.8 Costo de operación anual para una producción manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. 43
Tabla 7.9 Materia prima para la producción anual de manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum.* 44
Tabla 7.10 Indicadores económicos para la rentabilidad del proyecto a cinco años. 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Clasificación de diterpenos - ruta de ciclación. 4
Figura 2.2 Estructura química de manool. 5
Figura 2.3 Estructura química del manool y el 13-*epi*-manool. 9
Figura 2.4 Espectro de ^{1}H-RMN de una mezcla de manool y el 13-*epi*-manool. 10
Figura 2.5 Síntesis química para la producción de manool a partir del (-)-esclareol. 11
Figura 2.6 Síntesis bioquímica para la producción de manool a partir del GGPP. 12
Figura 2.7 Biosíntesis de terpenoides. 13
Figura 2.8 Vías biosintéticas para la producción de manool y su epímero a partir de material biológico. 14
Figura 2.9 Inspección macroscópica del *Enterolobium cyclocarpum*. 16
Figura 2.10 Diagrama de flujo del proceso de ESL de corriente directa en una etapa. 18

Figura 6.1 Estrategia experimental para el proceso de enriquecimiento de Manool a partir de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. 25
Figura 6.2 Procedencia de los especímenes de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. 26

Figura 7.1 Detección espectroscópica del manool 34
Figura 7.2 Influencia del efecto de las variables control sobre el rendimiento de los extractos acetónicos de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. por el método de Soxhlet. 36
Figura 7.3 Diagrama de ESL con contacto múltiple en corriente directa. 36
Figura 7.4 Diagrama de equilibrio de fases de la ESL con contacto múltiple directa. 37
Figura 7.5 Análisis químico del manool. 39
Figura 7.6 Diagrama de flujo para el proceso de enriquecimiento en manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum*. 41
Figura 7.7 Diagrama de pastel de costo total de inversión. 43
Figura 7.8 Representación porcentual de los costos de operación para la producción de manool. 43
Figura 7.9 Desglose de los costos anuales de materias primas para la producción de manool. 44

NOMENCLATURA

^{1}H-RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
AcCl	Cloruro de acetilo
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CG/MS	Cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masa
CoA	Coenzima A
COSY	*Correlation spectroscopy,* espectroscopía de correlación
CPP	Copalil difosfato
D	Disolvente
dd	Doble doblete
DE	Desviación estándar
diTPSs	Terpeno sintasas
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
dq	Doble quintuplete
E	Extracto o flujo superior
EC	Extracto crudo
ESL	Extracción sólido-líquido
F	Alimentación
FPP	Pirofosfato de farnesilo
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
Hz	Hercio (Hertz)
I	Inerte
ICB	Índice de rentabilidad
IPP	Pirofosfato de isopentilo
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
Me	Metilo
MHz	Megahercio
MP	Materia Prima
m/z	Relación carga-masa

n	Número de ensayos
NIST	*National Institute of Standards and Technology*
nm	Nanómetro
p	Probabilidad
P	Peso
$PhNMe_2$	N, N-dimetilanilina
ppm	Partes por millón
R	Residuo o flujo inferior
RE	Rendimiento
RT	Temperatura ambiente
s	Singulete
S	Soluto
SsSCS	Esclareol sintasa
t	Tiempo
TIR	Tasa interna de retorno
TREMA	Tasa de recuperación
UV	Ultravioleta
VPN	Valor presente neto
x	Fracción en masa
ε	Porosidad del lecho empacado
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μm	Micrómetros
ρ	Densidad

GLOSARIO

Análisis técnico-económico	Cálculo de todos los costos y beneficios asociados
Biomasa	Materia orgánica originada en un proceso biológico
Compuestos extraíbles	Compuesto químico presente en el material biológico, de forma libre y es soluble en un disolvente
Diastereoisómeros	Estereoisómeros no relacionados como imágenes especulares
Duramen	Zona anatómica del árbol con función de sostén donde se almacenan los metabolitos secundarios
Enriquecimiento	Aumentar en una mezcla la proporción de uno de sus componentes
Epímeros	Diastereoisómeros que difieren en la configuración en sólo un centro quiral, pero son iguales en todos los demás
Estereoespecífica	Que únicamente se produce en un solo estereoisómero en una reacción dada
Estereoisómero	Isómeros que tienen sus átomos conectados en el mismo orden, pero tienen arreglos tridimensionales distintos. El término estereoisómero incluye a los enantiómeros y diastereómeros
Extracto	Producto de la extracción en estado líquido (soluto + disolvente)
Extracto crudo	Extracto sin modificaciones (sin aislar alguno de sus componentes)
Fracción	Parte de una mezcla que se separó mediante un proceso unitario
Fracción másica	Masa de un componente dividido por la masa total de un volumen seleccionado
Índice de rentabilidad	Utilidad obtenida por cada peso de recursos propios invertidos

Proceso de separación	Proceso en el que dos fases fluyen en contacto para producir un gradiente de concentración entre la entrada y la salida, con el objetivo de alcanzar un cambio de concentración en uno o más componentes de la alimentación
Residuo	Producto de la extracción en estado sólido (refinado)
Regioespecífica	Que únicamente ocurre con una regioquímica específica para formar un solo producto
Regioquímica	Término que describe la orientación de una reacción que ocurre en un sustrato asimétrico
Resolución	Capacidad de una columna cromatográfica para separar los analitos de interés
Selectividad	Capacidad de un método para determinar analitos específicos en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento análogo.
Tasa interna de rendimiento	Porcentaje de beneficio o pérdida que tendrá una inversión sobre las cantidades que no se han retirado del proyecto
Valor presente neto	Criterio de inversión que actualiza los cobros y pagos de un proyecto o inversión para conocer cuánto se va a ganar o perder con esa inversión

AGRADECIMIENTO

A la Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que abrió sus puertas del conocimiento para mí, así como, las facilidades para concluir exitosamente mis estudios en el posgrado de la Facultad en Ingeniería Química, título que representaré con vocación, ética, compromiso y pasión, para el bien de mi persona y mi país.

Al Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química, en cuyas instalaciones recibí la instrucción, cultura y formación, así como, a sus profesores que transmitieron en mí su disciplina, sabiduría y conocimiento.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicos quien me acogió en sus instalaciones donde llevé a cabo el trabajo de investigación para el planteamiento y defensa de esta tesis.

Al CONACYT por el apoyo a la ciencia en nuestro país y la beca otorgada.

A mis padres y a mis hermanos por su apoyo incondicional; quienes siempre me han acompañado en mi formación personal, académica y han sido mi motivación para culminar con éxito este logro profesional.

A la D.C. Ma. del Carmen Chávez Parga y al D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco quienes depositaron en mí su confianza y conocimiento para ser partícipe en este proyecto de investigación que me hizo crecer personal y profesionalmente.

A los miembros del comité sinodal, D.C. Jaime Espino Valencia, D.C. José Apolinar Cortes y D.C. Rafael Huirache Acuña, quienes dispusieron de su experiencia y conocimiento, para la mejora continua de este proyecto de investigación.

A mis familiares y amigos, a quienes les he brindado mi afecto, confianza y me han acompañado a lo largo de la vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular quienes compartieron conmigo su amistad y conocimiento a lo largo de este proyecto, en especial al M.C. Alberto Flores García quien me instruyó para lograr este triunfo.

A TODOS, ¡MUCHAS GRACIAS!

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La extracción de productos naturales se remonta a los 3 500 a.C., donde la producción de perfumes, aceites y ceras con activos farmacológicos eran un negocio importante para las culturas egipcias y mesopotámicas (Levey, 1959). Actualmente, las plantas proporcionan una abundante reserva de metabolitos secundarios con interés en la industria alimenticia y farmacéutica (Shirsath *et al*., 2012; Vinatoru, 2001). La extracción sólido-líquido es un proceso de separación útil para la obtención de productos naturales a partir de material vegetal. El método de extracción, así como, las condiciones de procesamiento influyen en las características del producto final, por lo tanto, el estudio de las etapas involucradas en la obtención de los extractos es requisito básico para obtener metabolitos secundarios con la eficacia deseada (Bott *et al*., 2010). El manool es el producto de interés en este trabajo, el cual, tiene una demanda en la industria cosmética y del perfume, ya que es material de partida para la síntesis de numerosas sustancias, como el Ambrox®. El manool, tiene un valor comercial de 800 dólares por gramo, en el año 2022, para una pureza mayor al 98%. El manool se obtiene por síntesis química, bioquímica y biológica, a partir de material vegetal rico en esté compuesto. Sin embargo, la configuración electrónica del manool genera mezclas de manool, 13-*epi*-manool y sus derivados en casi todos los procesos de obtención. La disposición estereoespecífica de este compuesto es de importancia en el desarrollo de nuevas tecnologías que proponen el uso de manool como principio activo por sus propiedades biotecnológicas. Para ello, es necesario implementar métodos eficientes que permitan enriquecer al manool de su epímero. La intención principal de esta investigación es establecer un método de obtención de manool libre de sus derivados a partir de biomasa de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. mediante un conjunto de procesos y operaciones unitarias, el cual tendrá ventajas sobre los métodos de producción químicos y bioquímicos, entre ellas, un método de obtención accesible a un bajo costo de producción.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios, también conocidos como productos naturales o compuestos extraíbles, son compuestos químicos derivados del metabolismo primario (metabolitos básicos para la supervivencia de un microorganismo). En plantas, la síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo y sus niveles constitutivos incrementan como respuesta al estrés abiótico o biótico, ya que existen factores que predisponen la producción de dichos compuestos, como la polinización (atracción de insectos), los mecanismos de defensa (ataque de herbívoros, microbios y/o virus) o la alelopatía (Taiz y Zeiger, 2002; Azcón-Bieto y Talón, 2003; Sepúlveda *et al*., 2007). El hombre utiliza a los metabolitos secundarios con diversos propósitos, ya que tienen un valor medicinal y económico.

2.2 Los terpenos

Los terpenos o terpenoides son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por un conjunto de unidades de cinco átomos de carbono (isopreno) mediante enlaces cabeza-cola (Stoessl *et al*., 1976; Steele *et al*., 1998; Yang *et al*., 2020). Su clasificación es de acuerdo con el número de moléculas de isopreno que conforman su estructura molecular (ver tabla 2.1). Es un familia molecular numerosa y diversa de productos naturales que se aíslan de plantas con un fin biotecnológico (Trapp y Croteau, 2001; Keeling y Bohlmann, 2006; Gershenzon y Dudareva, 2007; Tholl, 2015; Yazaki *et al*., 2017; Bisht *et al*., 2021). Hasta el año 2020 se caracterizaron más de 70 000 compuestos de esta categoría. Los terpenos son de utilidad en las industrias alimenticias, cosméticas y farmacéuticas, por sus propiedades medicinales (Dewick, 2002; Sun *et al*., 2017; Tang *et al*., 2017; Geiselman *et al*., 2020). En su mayoría son compuestos de estructura alifática, algunos cíclicos que presentan un sistema deslocalizado de electrones.

Tabla 2.1 Clasificación de los terpenos (Valencia, 1995).

Nombre	Número de:		Compuestos que contienen estos terpenos
	isoprenos	carbonos	
Monoterpenos	2	10	Aceites esenciales
Sesquiterpenos	3	15	Aceites esenciales
Diterpenos	4	20	Resinas
Sesterpenos	5	25	Agentes antitumorales
Triterpenos	6	30	Saponinas
Tetraterpenos o carotenoides	8	40	Pigmentos
Politerpenos	> 8	> 40	Hule

2.3 Los diterpenos

Los diterpenos son una de las familias más grandes de metabolitos secundarios con más de 18 000 compuestos derivados del geranilgeranil pirofosfato (GGPP) y 126 esqueletos distintos (Roncero *et al*., 2018). Sus diversas actividades biológicas, como su actividad antimicrobiana, han promovido la identificación de nuevos compuestos antibióticos a partir de esta familia (Pasdaran & Hamedi, 2017). Se estima que la quinta parte de todos los terpenos pertenecen a este grupo (Rubin, 2020). Su estructura es compleja, debido a su esqueleto de carbón único (Prieto y Silveira, 2019), la cual se clasifica en función a las rutas de ciclación del GGPP. La ciclación se genera por: el ion pirofosfato, para la clase I y la protonación de los carbonos catorce y quince, para la clase II, como se muestra en la figura 2.1 (Vickers y Sabri, 2015; Xu *et al*., 2021).

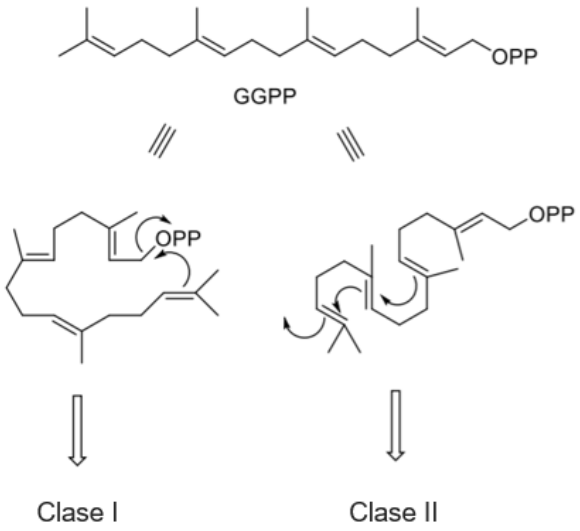


Figura 2.1 Clasificación de diterpenos - ruta de ciclación.

2.4 Diterpenos de tipo labdano

Los labdanos son diterpenos que se caracterizan por su estructura bicíclica y enlaces exocíclicos, se conforman por más de 7 000 compuestos conocidos (Peters, 2010; Ignea *et al*., 2015). Estos agregados expresan actividades biológicas relevantes (antimicrobianas, antivirales, citotóxicas, captadoras de radicales, antihipertensivas, hepatoprotectoras y antiinflamatorias). Los labdanos se reportaron en hongos (*Penicillium oxalicum* TW01-1), insectos, organismos marinos, aceites esenciales, resinas y familias vegetales como: Asteraceae, Lamiaceae, Acanthaceae, Cistaceae, Labiatae, Pinaceae, Verbenaceae, y Zingiberaceae, (Demetzos y Dimas, 2001; Chinou, 2005; Bian *et al*., 2015; Pal *et al*., 2016).

2.5 El manool

El manool es un diterpeno labdano de veinte carbonos con dos grupos metilo en posición de C-4 y un tercer metilo en C-10, una ramificación lateral en la posición C-9 de cinco carbonos, un enlace de grupo hidroxilo junto con un grupo metilo en la posición C-13 (*13S*), dos enlaces vinilo, uno entre las posiciones C-14 y C-15 y un segundo en el C-8 y C-17, (ver figura 2.2) (Salazar y Villamizar, 2013b).

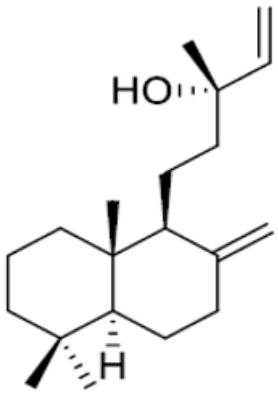


Figura 2.2 *Estructura química de manool.*

El manool se extrajo por primera vez en 1935 por Hosking y Brandt a partir de la resina de madera de *Halocarpus biforme* (pino rosa), una conífera endémica de Nueva Zelanda (Hosking y Brandt, 1935). Su estructura molecular y estereoquímica conocida (tabla 2.2) hace del manool un compuesto de interés como material de partida para la síntesis de varios productos naturales como drimano, hidroquinona y sesquiterpenos de quinona, y anillo C aromático, otros labdanos y diterpenos tricarbocíclicos (Salazar y Villamizar, 2013a).

Tabla 2.2 Dilucidación de la estructura molecular y estereoquímica de manool.

Aportación	Referencia
El manool es un diterpeno bicíclico, de fórmula molecular C20H34O, tiene dos dobles enlaces, tres grupos metilo cuaternarios en las posiciones 4 y 10 consistentes con la regla del isopreno, una cadena lateral en la posición 9, que tenía un grupo hidroxilo terciario en la posición 13 y un doble enlace entre las posiciones 14 y 15	Hosking y Brandt, 1935
El segundo doble enlace del manool, estaba entre la posición 8 y 17	Hosking, 1936
La presencia del grupo metilo cuaternario de la posición 10 se confirmó	Ruzicka *et al.*, 1947
La configuración en la posición 13 del manool es 13(S)	Bigley *et al*., 1962

2.6 Propiedades del manool

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. El manool ((3R)-3-metil-5-[(1S,4aS,8aS)-5,5,8a-trimetil-2-metilendecahidro-1-naftalinil]-1-penten-3-ol) es un alcohol terciario con cuatro centros quirales, sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Propiedades fisicoquímicas del manool (BocSciences).

Propiedad	Parámetro
Fórmula	$C_{20}H_{34}O$
Peso molecular	290.5 g / mol
Punto de fusión	49-52 °C
Punto de ebullición	367-368 °C a 1 atm
Área superficial polar	20.2 Å

2.7 Usos de manool

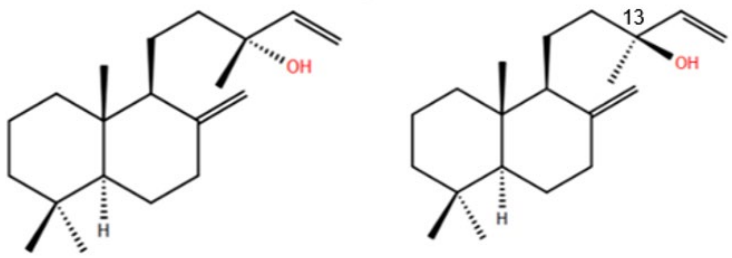
El manool es un producto natural que tiene un mercado mundial en crecimiento (Pino *et al*., 1997). Su interés comercial comenzó en 1964 cuando se utilizó por primera vez como intermediario en la síntesis de ambreinolida, uno de los principales productos de oxidación del ámbar gris. El precio de introducción del manool al mercado fue de 16 dólares por libra (Brooker *et al*., 1989), para el año 2022, el valor comercial de este producto fue de 800 dólares por gramo, para una pureza mayor al 98%. Tiene propiedades deseables en la industria: farmacéutica, maderera, alimenticia y del perfume. El uso de manool tiene un potencial de aplicación en la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías por sus propiedades terapéuticas y antimicrobianas como se muestra en la tabla 2.4.

Tabla 2.4 Propuestas para el uso de manool en base a sus atributos.

Uso	Actividad reportada	Referencia
Industria química	Síntesis de sesquiterpenos y diterpenos	Salazar y Villamizar, 2013a Nóvoa *et al.*, 2014
Microbicida	*Staphylococcus aureus* *Proteus mirabilis*	Ulubelen *et al*., 1994
	Candida albicans	Veličković *et al*., 2003
	Streptococcus mutans entre otras bacterias asociadas con las caries dentales	Moreira *et al.*, 2013 Mendes-Ferreira *et al.*, 2020
Preservador de madera	Antifúngico contra especies causantes de la pudrición de madera	Rhafouri *et al.*, 2014
	Larvicida	Sheng-Yang *et al*., 2005
	Confiere durabilidad a maderas perecederas	Raya-gonzalez, 2007
	Antitermita	Scheffrahn et al., 1988 Pamatz-Bolaños, 2008 Espinoza-Madrigal, 2008
	Actividad contra fitopatógenos de la madera	Olate *et al*., 2015
Cosmética	Aclarador de la piel	Meyer, *et al.,* 2013
	Cuidado facial	Oshandhi, 2016
Farmacéutico	Genotóxico en líneas celulares V79 y HepG2	Nicolella *et al*., 2014
	Citotóxico contra líneas celulares cancerígenas	de Oliveira *et al.*, 2016
	Antiinflamatorio	Chen-Lung *et al.*, 2020
	Antihipertensivo	Neves-Monteiro *et al*., 2020
	Supresor del estrés oxidativo causante de la degeneración en la retina	Ravera *et al*., 2021

2.8 Mezcla empírica de manool

Los epímeros son diastereoisómeros que difieren en la configuración de uno de sus centros quirales, mientras que los demás permanecen iguales. La configuración del C-13 del manool y el 13-*epi*-manool (ver figura 2.3) han sido un problema por algunos años, ya que son epímeros difíciles de distinguir debido a sus propiedades espectrales y cromatográficas similares, cada ocasión que se presenta la mezcla epimérica se presenta obstaculiza la separación de manool debido a las variaciones entre la actividad óptica de la mezcla y del manool puro (Villamizar *et al*., 2011). La espectroscopia de RMN junto con agentes de centros quirales surgió como método para la diferenciación de manool y el 13-*epi*-manool (Adams, 2007; Sansom *et al*., 2013). La figura 2.4 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de una mezcla de manool y su epímero obtenidos a partir de los extractos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. donde se destaca el traslape de las señales de ambos compuestos (López-Hernández, 2010). La mezcla epimérica de este diterpeno se reporta en los productos obtenidos por extracción a partir de material vegetal de *Picea ajanensis* Shmidt *et al.*, 1964, resina de *Pinus* spp (Conner y Rowe, 1976), *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Pamatz-Bolaños, 2010) y *Abies Balsamea* (Sekine *et al*., 2013). Así como, síntesis química con esclareol como materia prima Rogachev *et al.,* 2012. Las tecnologías emergentes que proponen el uso de manool como principio activo por sus propiedades biotecnológicas, necesitan de la disposición estereoespecífica de dicho compuesto, por consiguiente, se necesitan métodos eficientes que permitan separar al manool de su epímero.



manool 13-*epi*-manool

Figura 2.3 Estructura química del manool y el 13-*epi*-manool.

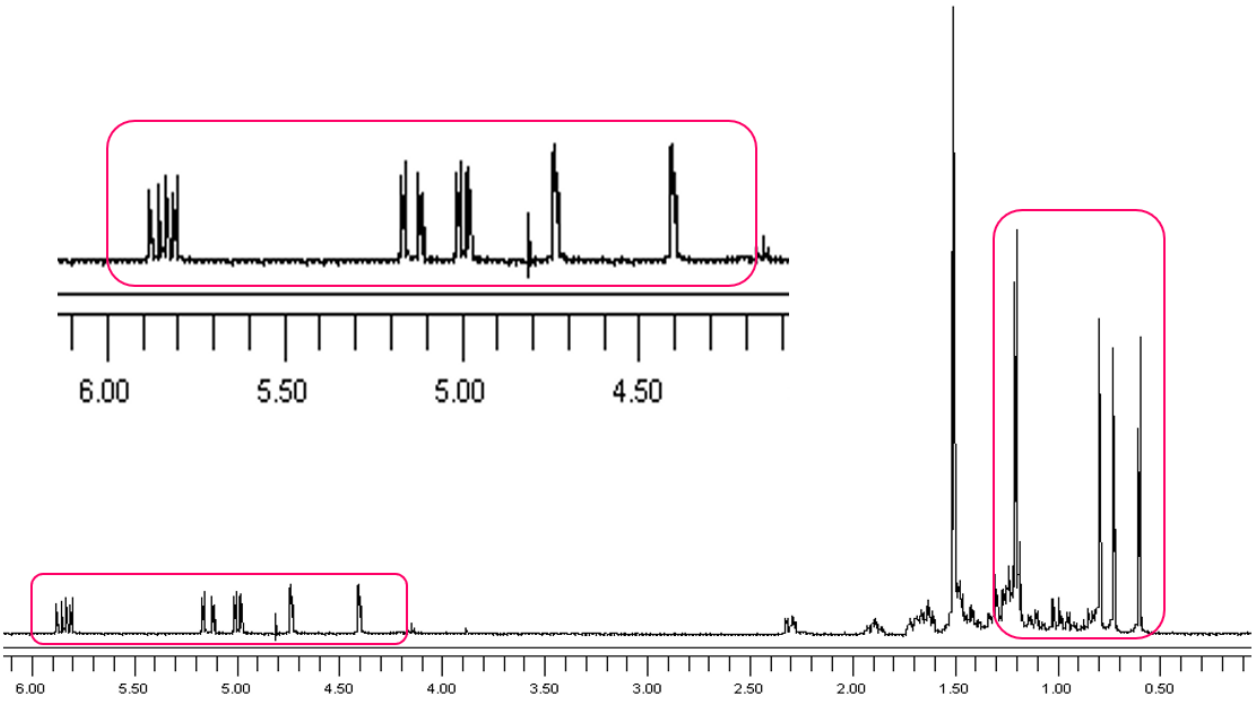


Figura 2.4 Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^{1}H-RMN) a 400 MHz en CDCl3 de una mezcla de manool y el 13-*epi*-manool que se obtuvo a partir de extractos de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (López-Hernández, 2010).

2.9 Métodos de obtención de manool

2.9.1 Síntesis química

El manool se obtiene mediante procesos químico, bioquímicos o a partir de material biológico. La síntesis química de manool se realiza a partir del (-)-esclareol por una hidrólisis quimio-selectiva para la obtención de su diacetato, seguido de una eliminación regio-selectiva para producir manool como principal producto y 13-*epi*-manool (figura 2.5) (Rogachev et al., 2012).

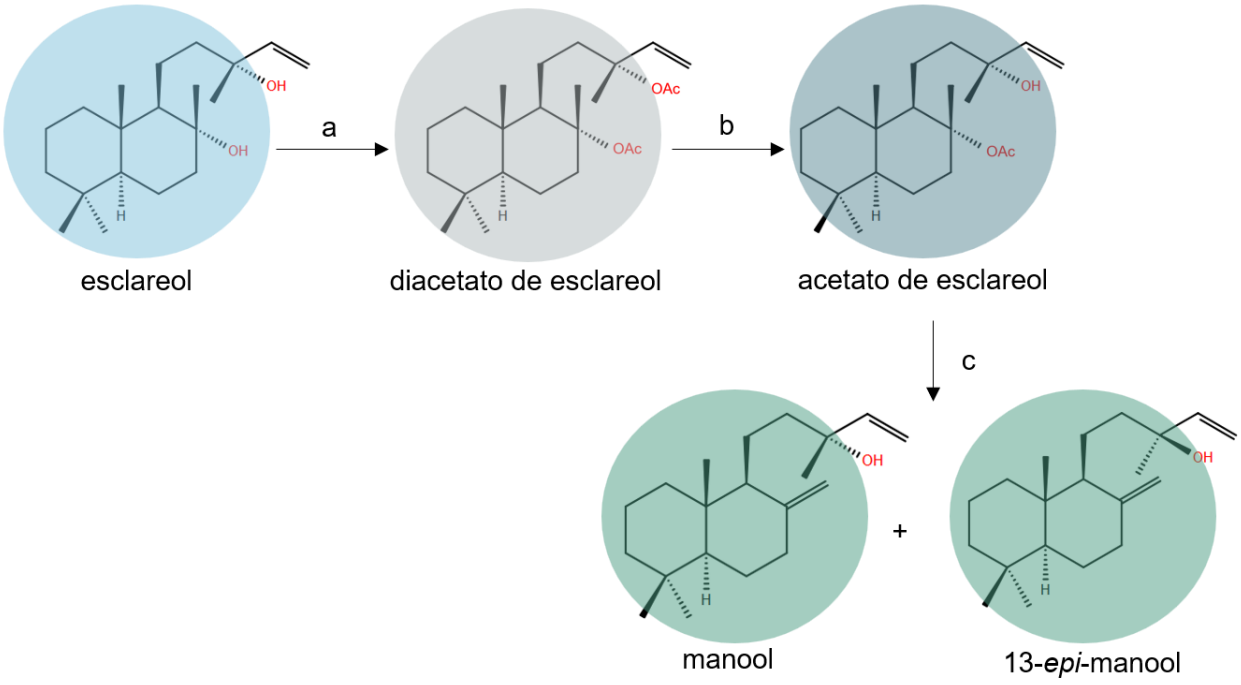


Figura 2.5 Síntesis química para la producción de manool a partir del (-)-esclareol. (a) AcCl, $PhNMe_2$, CH_2Cl_2, RT, 26 h, 96%; (b) KOH, H_2O, EtOH, RT, 48 h, 60%; (c) $NaHCO_3$, DMSO, 150 °C, 6 h, 90% (77% mayor producción de manool) (Modificado de Rogachev *et al*., 2012).

2.9.2 Síntesis bioquímica

La síntesis bioquímica del manool se genera al reaccionar geranilgeranil pirofosfato (GGPP) con una sintasa del copalil difosfato (CPP) para formar al (9S,10S)-copalil difosfato, para posteriormente poner en contacto al (9S,10S)-copalil difosfato con la esclareol sintasa, que produce una pureza mayor al 98%, como se muestra en la figura 2.6 (Schalk & Rocci, 2019).

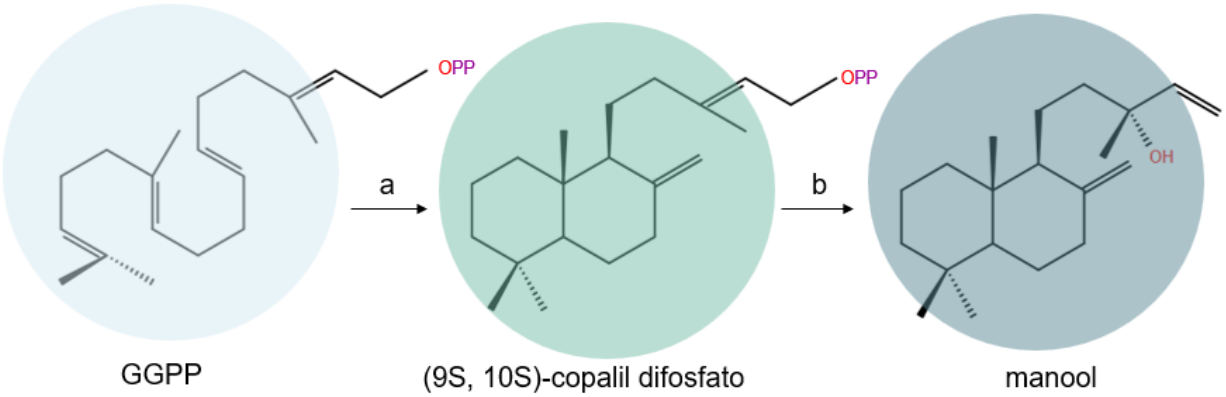


Figura 2.6 Síntesis bioquímica para la producción de manool a partir del geranilgeranil difosfato. (a) copalil difosfato sintasa; (b) esclareol sintasa (Modificado de Schalk y Rocci, 2019). GGPP: geranilgeranil pirofosfato.

2.9.3 Síntesis biológica

Las plantas proporcionan la principal fuente de estos productos químicos y presentan una rica reserva de productos farmacéuticos potencialmente nuevos (Andersen-Ranberg et al., 2016). El descubrimiento de la coenzima A (CoA), impulsó la investigación sobre el metabolismo de las plantas (Lipmann y Tuttle, 1945). La biosíntesis de los terpenoides comienza con tres unidades de acetil-CoA que forman el ácido mevalónico, precursor del pirofosfato de isopentilo (IPP) y su isómero de doble enlace el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Estos componentes básicos se denominan “isoprenos activos”. El DMAPP se condensa con IPP al geranil pirofosfato (GPP), que después de la reacción con otro DMAPP forma pirofosfato de farnesilo (FPP). La vía biosintética continúa sucesivamente hasta obtener la ciclación de los tetraterpenoides y finalmente los politerpenos como se muestra en la figura 2.7 (Jaeger y Cuny, 2016).

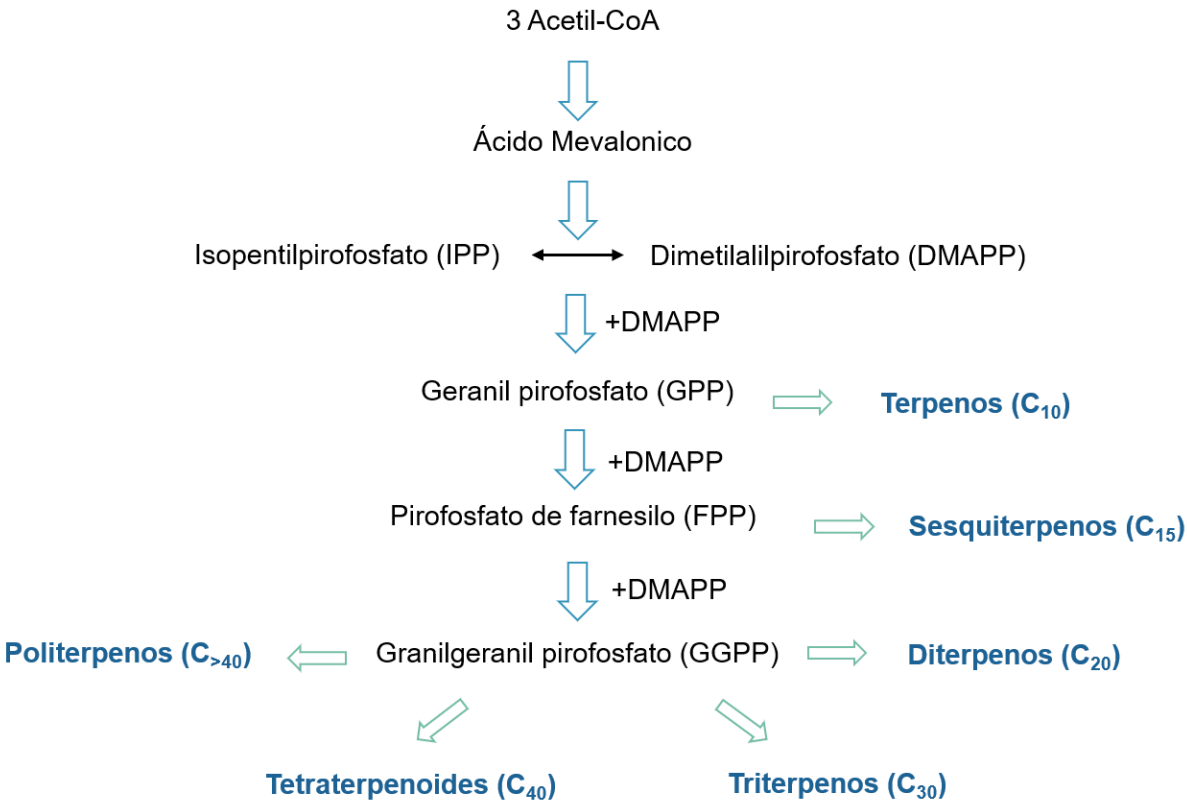


Figura 2.7 Biosíntesis de terpenoides (Jaeger y Cuny, 2016).

Los terpenos se sintetizan por enzimas clave, a estas se denominan terpeno sintasas (diTPSs), las cuales transforman las unidades básicas en una amplia variedad de terpenoides (Degenhardt et al., 2009). El manool se sintetiza de forma natural en algunas plantas a partir geranilgeranil pirofosfato (GGPP) con la esclareol sintasa (SsSCS); esta enzima genera una reacción regioespecífica que forma un grupo hidroxilo en el C-13 y al mismo tiempo conserva los centros quirales C-9 y C-10, (Caniard et al., 2012). Sin embargo, la formación estereoselectiva del manool y el 13-*epi*-manool depende de las diTPSs de clase II (CfTPS1, TwTPS21 y EpTPS7), que en contacto con el GGPP forman los estereoisómeros del CPP [(+)-CPP), labda-13-en-8-ol difosfato (*ent*-8-LPP) y *ent*-CPP], estos isómeros determinarán la configuración absoluta del producto final, como se muestra en la figura 2.8 (Van Wyk *et al.*, 2007; Andersen-Ranberg *et al.*, 2016).

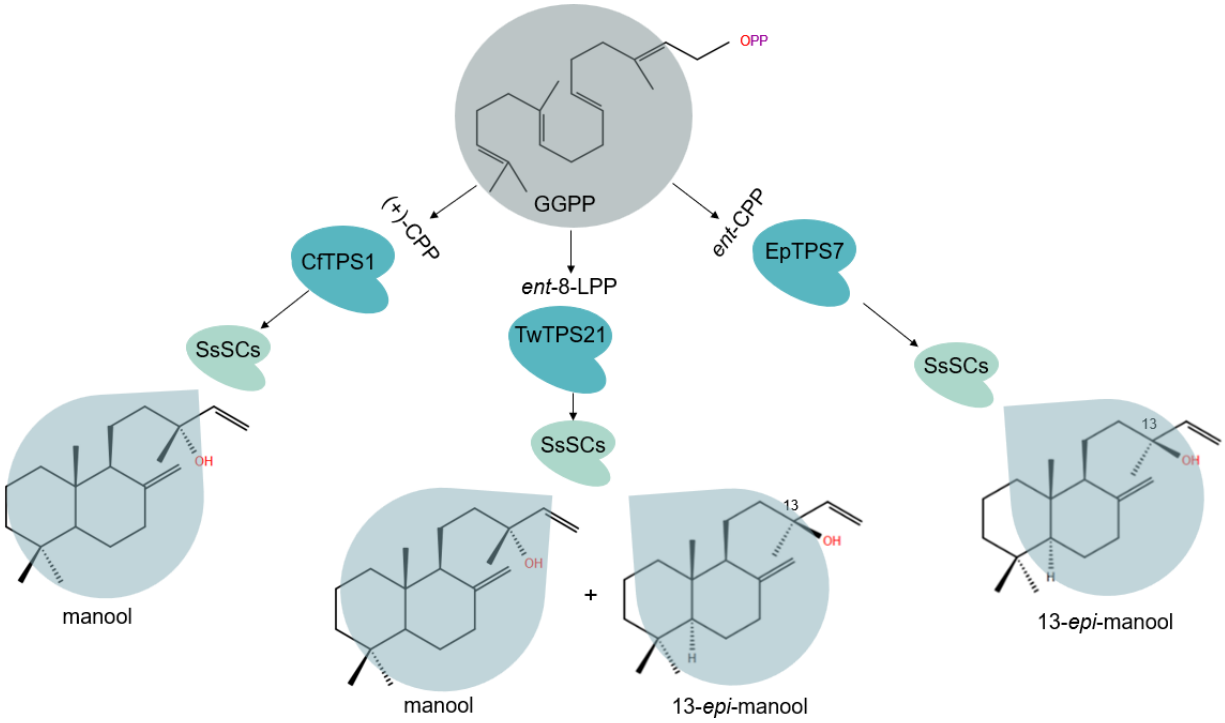


Figura 2.8 Vías biosintéticas para la producción de manool y su epímero a partir de material biológico (Modificado de Andersen-Ranberg et al., 2016). CCP*:* copalil difosfato*,* CfTPS1: diterpeno sintasas, *Coleus forskohlii*, ent-8-LPP: (5R,8S,9S,10S)-labda-13-en-8-ol difosfato, EpTPS7: terpeno sintasas, *Euphorbia peplus*, SsSCs: esclareol sintasa, *Salvia sclarea*, TwTPS21: terpeno sintasas, *Tripterygium wilfordii.*

2.10 El *Enterolobium cyclocarpum* para la obtención de manool

El *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. también conocido como Guanacaste o Parota es una especie arbolea perteneciente a la familia de las Fabaceae, subfamilia Mimosoideae del género *Enterolobium*, que se caracteriza por su altura prominente entre los 20 - 30 metros, copa hemisférica de abundante follaje, hojas bipinnadas y brevideciduas, flores pequeñas de color blanco, frutos de 7 a 12 cm de diámetro de forma característica (figura 2.9), nativo de México, Centroamérica y Norte de Sudamérica (Francis y Lowe, 2000, CONAFOR, 2018; Martinez Pacheco *et al*., 2012). El índice de valor de importancia (IVI) de esta especie en México es de 15.58, este valor indica que su abundancia absoluta es baja. No obstante, la Organización Internacional de las Maderas estima que México tiene un potencial para la producción de *E. cyclocarpum* y se estima que para el 2050 la demanda de esté incrementará a nivel mundial (CONAFOR, 2018). Hasta el año 2022, la demanda nacional de muebles de madera de *E. cyclocarpum* genera ingresos económicos a Michoacán, el cual tiene una producción anual de 52.7 m^3r. Sin embargo, en el procesamiento de muebles y herramientas se desecha más del 50% de la madera. Estos desechos tienen un tamaño de partícula que no es aprovechable en otros procesos (Raya-Gonzáles *et al*., 2007). El aprovechamiento de los residuos sólidos que se generan en la industria maderera es un área de oportunidad para la obtención de productos de valor agregado, con esta justificación Raya-González en el 2007 inició una línea de investigación que tenía por propósito preservar las maderas secas de encino y pino del daño que causa *Lyctus* spp. e *Incisitermes marginipennis* (Latreille) con extractos vegetales acuosos. En la cual, ellos encontraron que los extractos acuosos de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, tuvieron el mejor efecto contra *Lyctus* spp. e *Incisitermes marginipennis* (Latreille). Esto llevó a que Pamatz-Bolaños en el 2008, en su proceso de determinar el efecto biológico del componente mayoritario del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb, reportará por primera vez la presencia de manool entre los compuestos extraíbles de esta especie. Para el 2010, López-Hernández, en su investigación para establecer un nuevo método de separación de manool, encontró la presencia del 7-hidroximanool y el 13-*epi*-manool. Con el objetivo de separar al diterpeno manool de sus derivados presentes en la madera de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Montes-Vega, en el 2017 estableció los parámetros de operación de un destilador

de vapor para la recuperación de manool libre de sus derivados, sin embargo, no tuvo los resultados que se esperaban. Actualmente se sigue en la búsqueda de un método que permita obtener manool libre de su epímero a partir de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

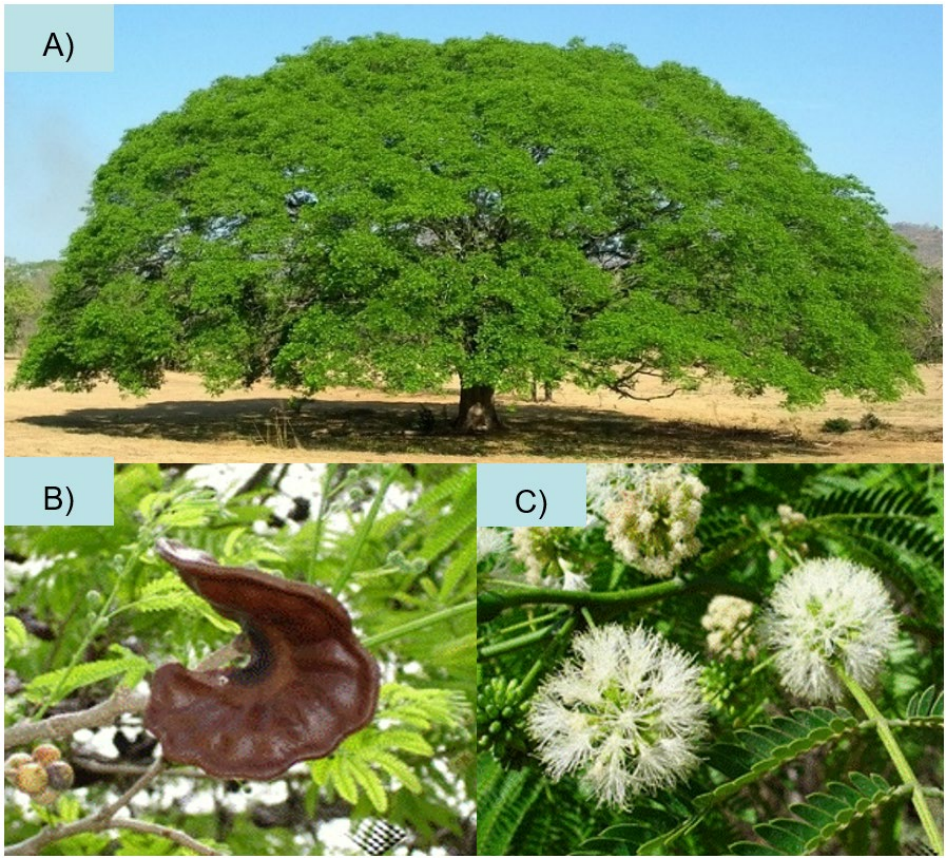


Figura 2.9 Inspección macroscópica del *Enterolobium cyclocarpum* donde A) muestra la vista general del árbol, B) el fruto, C) flores y hojas (Rojas-Rodríguez y Torres Córdoba, 2020).

2.11 Extracción de metabolitos secundarios a partir de materiales vegetales

Los productos naturales se encuentran en matrices complejas, generalmente en estado sólido. Las técnicas para la extracción de metabolitos secundarios a partir de material biológico se caracterizan por una serie de etapas individuales y diferentes, a los que se les denomina operaciones unitarias y/o procesos de separación. Las cuales, tienen principios básicos que se fundamentan en los fenómenos de transporte y son comunes en todos los términos. Por ejemplo, la extracción sólido-líquido es un proceso que permite separar un soluto de interés de una fase sólida; este proceso se basa en la transferencia de masa y consiste en poner en contacto una fase sólida y una fase líquida. El soluto presente en la fase sólida se difunde desde el sólido hasta la fase líquida. La velocidad de transferencia del disolvente de la solución general hasta la superficie del sólido es bastante rápida y la velocidad hacia el interior del sólido puede ser rápida o lenta. La disolución del soluto en el disolvente puede ser un simple proceso físico de disolución o una reacción química que libera al soluto para la disolución. Desde el punto de vista fenomenológico, la ley de Fick establece que la fuerza impulsora para la disolución es un gradiente de concentración (actividad química), por el cual, la migración neta de moléculas de soluto se produce de una región de alta concentración hacia una de menor concentración. Sin embargo, los materiales biológicos generalmente tienen sus constituyentes solubles dentro su estructura celular, lo cual, constituyen una resistencia adicional a la difusión, esto disminuye la velocidad de transferencia, ya que el proceso no sigue una ley de difusión simple (difusividad efectiva constante) (Geankoplis, 2006). Los métodos para la extracción sólido-líquido son varios y se pueden realizar tanto de manera continua como discontinua. Una etapa o unidad de extracción (ver figura 2.10) se constituye por dos partes: La disolución del soluto de la alimentación (F) con el disolvente (D) y la separación de la disolución del resto del sólido. La solución separada se denomina extracto (E) y los sólidos sobrantes, residuo (R) o residuo.

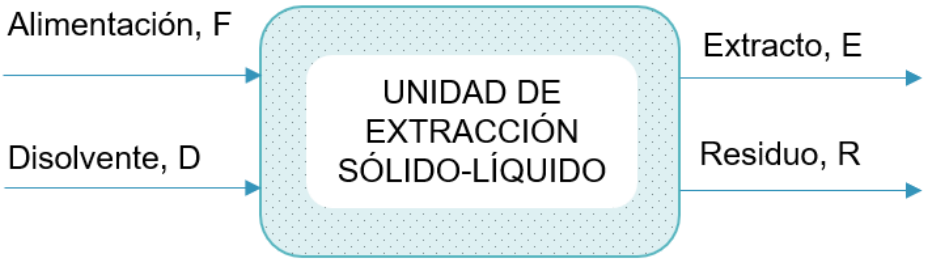


Figura 2.10 Diagrama de flujo del proceso de extracción sólido-líquido de corriente directa en una sola etapa.

Las técnicas de extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales son varias. Con el fin de disminuir el tiempo de extracción, la cantidad de muestra, el consumo de disolvente, mejorar la calidad de los extractos y aumentar el rendimiento (Wang y Weller, 2006). Estos métodos se dividen en convencionales (maceración y extracción en Soxhlet) y no convencionales (extracción con fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas y ultrasonidos), estos últimos tienen por objetivo aumentar el rendimiento a menor costo (Azwanida, 2015). La eficiencia de los métodos convencionales y no convencionales dependen principalmente de las variables de operación del proceso, la comprensión de la naturaleza fisicoquímica del material vegetal y del compuesto extraíble de interés (Azmir *et al*., 2013). La tabla 2.5 muestra los diferentes métodos que se utilizan para la extracción de manool a partir de algunas plantas y distintas especies forestales, como el pino rosa (*Halocarpus biformis*), el cual, es la especie vegetal con mayor cantidad de manool (6 – 8% en peso seco) *(Brooker et al*., 1989). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se realizaron como análisis fitoquímicos y/o ensayos biológicos, sin tener en cuenta la transferencia de masa y la eficiencia de la extracción.

Tabla 2.5 Extracción de manool a partir de material vegetal por diferentes métodos.

Especie	Parte de la planta	Método	Rendimiento	Referencia
Halocarpus biforme	Aserrín	Extracción con solventes, destilación con glicerol	-	Merz y Ritchie, 1970
	Flor	Extracción sólido-líquido con etanol (96% volumen)	3.5*	Veličković *et al*., 2003
	Hoja		3.1*	
	Tallo		1.2*	
Salvia officinalis	Hoja	Extracción sólido-líquido continúa con etanol-agua (9:1)	0.020	Nicolella *et al.,* 2014
		Hidrodestilación (45 min)	0.034	
Salvia desoleana	Hojas y flor	Extracción asistida por microondas con agua (20 minutos)	0.006	Binello *et al.*, 2014
		Extracción con dióxido de carbono supercrítico	0.024	
Mentha spicata subsp. insularis	Hojas	Arrastre de vapor e hidrodestilación	0.012	Marongiu *et al.*, 2001
		Hidrodestilación	0.090	Pamatz-Bolaños, 2008
E. cyclocarpum (Jacq.) Griseb.	Duramen	Arrastre de vapor	0.025^	López-Hernández, 2010
		Maceración sucesiva con:		
		- Hexano	1.160*	Montes-Vega, 2017
		- Diclorometano	0.100*	
		- Metanol	1.740*	

*Extracto con manool ^Mezcla empírica.

2.12 Técnicas analíticas en la separación de metabolitos secundarios

El aislamiento de los metabolitos secundarios se realiza mediante técnicas cromatográficas (Mtewa *et al*., 2018). La cromatografía es un método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Esta técnica consiste en hacer pasar un fluido al que se le denomina fase móvil, a través de una columna con fase fija inmiscible o una superficie sólida, a esta se le llama fase estacionaria (Batool y Menaa, 2020). Los métodos cromatográficos se dividen en aquellos que son de plano y de columna. La cromatografía en capa delgada (CCD), es el método de cromatografía en plano más rápido, con mejor resolución y más sensible. La cual, se constituye por placas de vidrio o metal revestidas con una capa delgada y adherente de partículas finamente divididas como fase estacionaria. La fase móvil se desplaza por capilaridad sobre la placa. Los componentes de mayor afinidad se difunden por la placa con mayor rapidez. Las distintas velocidades de migración de los componentes de la muestra se separan en distintas zonas a lo largo de la fase estacionaria, las cuales se pueden analizar en forma cuantitativa. Por otra parte, la cromatografía en columna se compone por un tubo angosto en posición vertical relleno con un sólido o fluido inerte finamente dividido como fase estacionaria. La fase móvil ocupa los espacios abiertos entre las partículas del material de empaque. La mezcla para fraccionar se introduce en la parte superior de la columna mientras que la fase móvil se incorpora de igual manera. Los componentes presentes en la mezcla se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria con respecto al tiempo. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la mezcla se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes con mayor afinidad a la fase estacionaria se fraccionan con lentitud, mientras que los compuestos de menor afinidad fluyen con mayor rapidez. Las distintas velocidades de migración de los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa (Lee *et al*., 2000; Skoog *et al.*, 2008; Jothy *et al*., 2011).

2.13 Elucidación de estructuras mediante técnicas espectroscópicas

La elucidación estructural de los compuestos requiere el uso de técnicas espectroscópicas para la caracterización de los constituyentes químicos de las muestras (Jothy *et al.,* 2011). Las estructuras se identifican por la interpretación de espectros y la comparación de estos con bases de datos confiables. Las técnicas más utilizadas son la resonancia magnética nuclear, infrarrojo y espectroscopia de masas.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

El manool es una molécula de interés para la industria, la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías. Esto genera la búsqueda de nuevas fuentes y métodos de obtención. En el duramen del *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. se reportó la presencia de manool con algunos de sus derivados. Por ello, el aprovechamiento de los residuos sólidos que genera la industria maderera y mueblera del *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. para la obtención de una fracción enriquecida en manool es una propuesta de interés académico e industrial.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

El manool presente en el duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. se enriquece mediante un proceso de extracción sólido-líquido.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener una fracción enriquecida en manool a partir del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

5.2 Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones para la obtención de extractos que contengan manool a partir de la biomasa de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.
- Enriquecer en manool a los extractos mediante técnicas cromatográficas.
- Realizar un análisis técnico-económico del proceso para el enriquecimiento de manool.

CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA

6.1 Estrategia experimental

La Figura 6.1 muestra el diagrama de flujo de la estrategia experimental para el proceso de enriquecimiento de Manool a partir del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

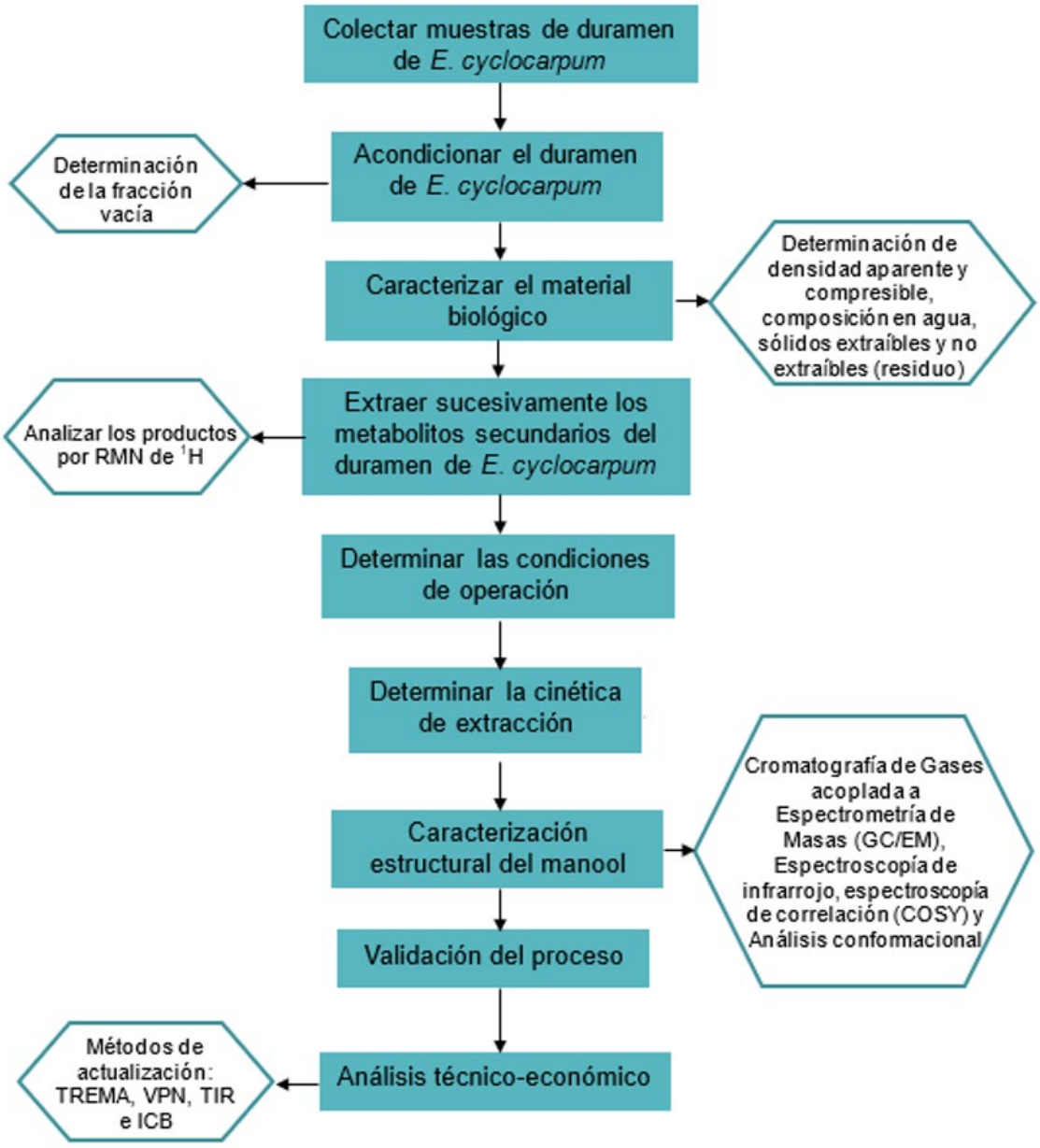


Figura 6.1 Estrategia experimental para el proceso de enriquecimiento de Manool a partir de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

6.2 Material biológico

El duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (nombre común regional: Parota) lo donó la Facultad de Tecnología de la Madera de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El material biológico se certificó y acreditó por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Los especímenes proceden de tres regiones (ver figura 6.2): Ixtapa, Guerrero (17° 39′ latitud Norte y 101° 35′ longitud Oeste), Tuzantla, Michoacán (19° 12′ latitud Norte y 100° 34′ longitud Oeste) y Veracruz, Veracruz (19º 12′ latitud Norte y 96º 08′ longitud Oeste).

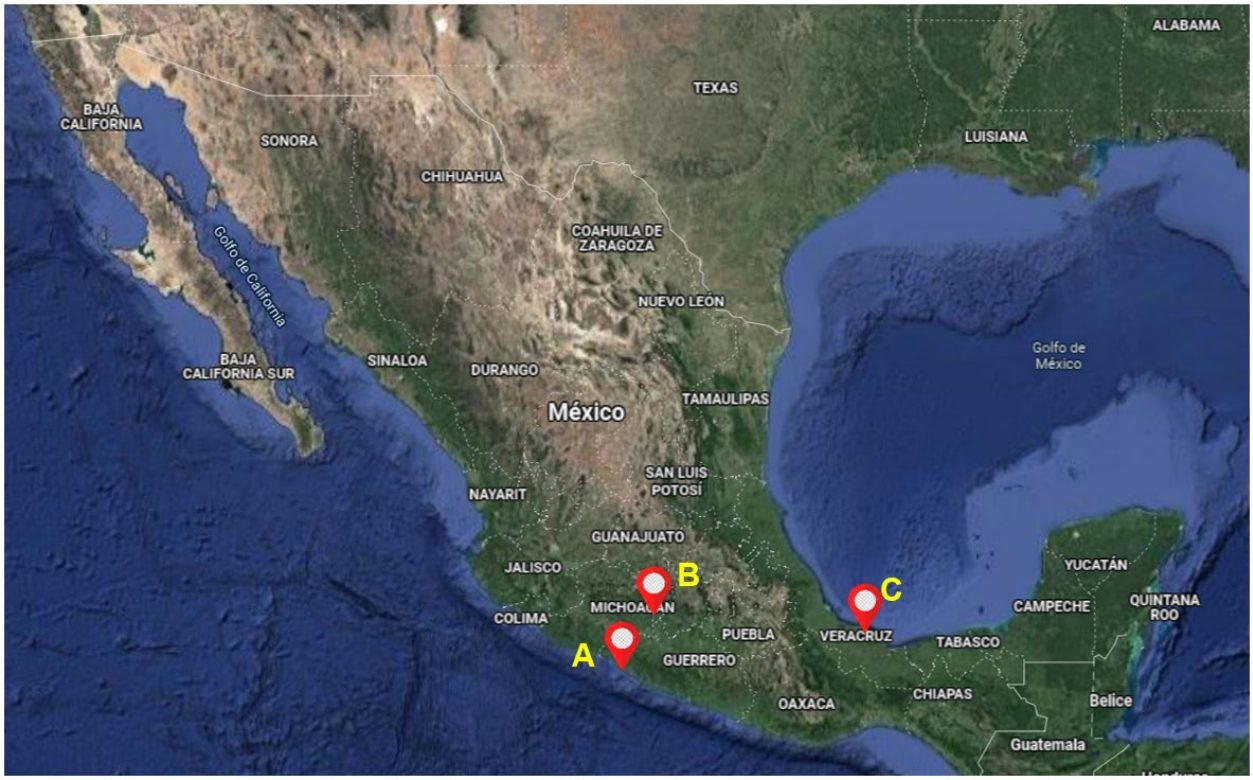


Figura 6.2 Procedencia de los especímenes de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Donde se muestran las locaciones de Ixtapa, Guerrero (A), Tuzantla, Michoacán (B) y Veracruz, Veracruz (C).

6.3 Acondicionamiento del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

6.3.1 Tamaño de partícula

El duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. se redujo a aserrín de 0.42 mm de diámetro (malla No. 40) con un molino (Moon giantg®). La porosidad del lecho empacado (ε) se calculó con base a la relación del diámetro del cartucho y el diámetro de las partículas de duramen.

6.4. Caracterización del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

La compresibilidad del duramen se evaluó con el índice de Carr, con base a la relación de la densidad aparente y la densidad compactada. La densidad se determinó por la relación peso volumen. La fluidez del polvo de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb se expresó con base al índice de Carr

6.5 Proceso de obtención de los extractos

La extracción sólido-líquido se realizó sucesivamente en un equipo Soxhlet (Kimax®) con tres disolventes de distintas polaridades: hexano, acetona y metanol. Los disolventes de los extractos se recuperaron en un evaporador rotatorio Büchi® R-215 a presión reducida hasta obtener una masa sólida a la que se le denominó extracto en crudo (EC). Los EC se colectaron en frascos de vidrio y se dejaron a condiciones ambiente hasta llegar a peso constante. El rendimiento de la extracción se expresó en porcentaje: relación de producto con respecto a la entrada. Los extractos se analizaron por ^{1}H-RMN para identificar la presencia de señales características del diterpeno de interés. La concentración de manool en el extracto se aumentó mediante una segunda extracción sólido-líquido. El producto de la segunda extracción se denominó “extracto de contenido en manool” (EM). Los EM se analizaron por ^{1}H-RMN para identificar la presencia del diterpeno manool.

6.6 Condiciones de operación

Las condiciones de operación se establecieron por un diseño factorial 2^3 con una réplica. Los niveles de cada factor se eligieron conforme a la metodología de Velásquez *et al*., (2019) para la obtención de los sólidos extraíbles del duramen de la Parota. Los factores que se van a evaluar se muestran en la tabla 6.1. El diseño factorial 2^3 tuvo ocho

combinaciones o corridas con siete grados de libertad. Tres se asocian a los efectos principales (*a, b* y *c*) y cuatro con las interacciones de estos (*ab, ac, bc* y *abc*). La matriz experimental y sus variables de estudio se muestran en la tabla 6.2. El orden de los experimentos se asignó al azar para evitar sesgos en los resultados.

Tabla 6.1 Variables de estudio en el diseño factorial 2^3.

Variables control	**Unidades**	
***a*:** Tiempo	Horas	
***b*:** Relación masa/volumen	g/mL	
***c*:** Temperatura	°C	
Variable respuesta	**Unidad**	**Intervalo**
RE: Rendimiento del extracto	%	0 - 100

Tabla 6.2 Variables de estudio y matriz experimental en diseño factorial 2^3.

Orden del ensayo	Etiqueta	Matriz de experimentos		
		a	*b*	*c*
7	*(1)*	-	-	-
8	*a*	+	-	-
6	*b*	-	+	-
3	*ab*	+	+	-
1	*c*	-	-	+
2	*ac*	+	-	+
5	*bc*	-	+	+
4	*abc*	+	+	+

6.7 Determinación de los parámetros de equilibrio

La extracción en Soxhlet se realizó a las mejores condiciones de operación. El tiempo de extracción se cuantificó a partir del primer reflujo, dos mililitros de extracto (EC) se colectó a los 10, 20, 30, 60, 120 y 180 min de extracción, las muestras se evaluaron en un espectrofotómetro UV-VIS ThermoScientific™, EVOLUTION. El residuo (R) se pesó en húmedo y se dejó secar en una estufa. Los parámetros de equilibrio se estimaron en base al diagrama de equilibrio de fases del triángulo rectángulo.

6.8 Manool: Determinación estructural

6.8.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

Los análisis químicos de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de los EAM de *E. cyclocarpum* se realizaron en un Cromatógrafo de Gases ThermoScientific™, TRACE 1310, acoplado a un Espectrómetro de Masas ISQ LT, una columna TG-SQC de 15 m de largo por 250 micras de diámetro y 0.25 micras de espesor de película. La temperatura del inyector fue de 240 °C. El tiempo total de la corrida fue de 34 min con una función de inyección retardada de 1.5 mg de muestra. Los resultados se analizaron con el programa Xcalibur© (versión 2.2) y se compararon con la base de datos de espectrometría de masas del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) (versión 2.0).

6.8.2 Espectroscopía de infrarrojo

La fracción con un tiempo de retención similar a la del manool se analizó por infrarrojo con un Espectrofotómetro FT-IR ThermoScientific™, NICOLET™ iS™10. Los espectros se analizaron con el programa OMNIC© (versión 9.2.86) y se compararon con referentes bibliográficos.

6.8.3 Técnicas homonucleares ^{1}H-^{1}H: COSY (COrrelated Spectroscopy)

Las muestras se analizaron por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^{1}H-RMN) en un espectrómetro VARIAN MERCURY PLUS de 400 MHz en $CDCl_3$, como disolvente. Los espectros se analizaron con el programa MestReNova (versión 2.0). El espectro del manool se ordenó en el eje de las ordenadas y las abscisas para formar

secuencias 2D para la elucidación estructural del manool por la técnica de espectroscopía de correlación o COSY (por sus siglas en inglés).

6.9 Evaluación de la cantidad de manool en el duramen de *E. cyclocarpum* de tres regiones distintas.

El duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. de las regiones nombradas en la sección 6.2 se ensayaron con el proceso de extracción de la sección 6.5, para las mejores condiciones de operación conforme a la evaluación de la sección 6.6. El manool se identificó por ^{1}H-RMN y se cuantificó, por métodos gravimétricos.

6.10 Análisis técnico-económico

El diagrama de flujo del proceso se realizó con el programa SuperPro Designer® (versión 10). La estimación del costo de adquisición del equipo (CAE) para una escala de procesamiento de 10 kg se determinó por el método de las seis décimas (ecuación 6.1). El costo total de inversión (CTI) (ecuación 6.2) de la planta (piloto) se estimó con el método de rango de variación de costos, ver tabla 6.3. Los costos directos totales (CDT) o costos de operación fijos se determinaron en base al CAE y los costos indirectos totales (CIT) o costos de operación variables se obtuvieron en base a la capacidad de procesamiento de la planta. La rentabilidad del proyecto se estableció con los métodos de actualización: Tasa de Recuperación Actualizada (TREMA), Valor Presente Neto (VPN), Tasa Interna de Rendimiento (TIR) e Índice de rentabilidad (ICB) en una hoja de cálculo, ecuaciones de la (6.3) – (6.6).

Tabla 6.3 Factores de estimación del costo total de inversión (Harrison et al., 2015).

Costo de ítem	Rango de factores	Factor por utilizar
Costos Directos Totales (CDT)	%CAE	
Costo de adquisición del equipo (CAE)	100	100
Instalación de equipos	20 – 80	40
Tuberías (m)	30 – 60	15
Servicios (instalaciones)	20 – 30	15
Construcciones (incluye los servicios)	30 – 60	15
Sistemas eléctricos	10 – 20	12
Mejoras de terreno (m^2)	10 – 20	12
Instrumentación y control	5 – 20	6
Terreno	3 – 20	4
Costos Indirectos Totales	%CDT	
Gastos de construcción	10 – 30	12
Diseño y coste de ingeniería	10 – 30	10
Contingencias	7 – 15	7
Asistencia para la puesta en marcha	3 – 5	3
Legales	2 - 5	2

Método de las seis décimas

$$C_s = C_0\left({}^{q_s}/_{q_0}\right)^{0.6} \tag{6.1}$$

Costo Total de Inversión

$$CTI = \sum CDT + \sum CIT \tag{6.2}$$

Tasa de Recuperación Actualizada

$$TREMA = i + f + (i * f) \tag{6.3}$$

Valor Presente Neto

$$VPN = -CTI + \sum_{t=1}^{n} \frac{CF_t}{(1+i)^t} \tag{6.4}$$

Tasa Interna de Rendimiento

$$0 = -CTI + \sum_{t=1}^{n} \frac{CF_t}{(1+TIR)^t} \tag{6.5}$$

Índice de rentabilidad

$$ICB = \frac{\sum_{t=1}^{n} \frac{CF_t}{(1+r)^t}}{CTI} \tag{6.6}$$

6.11 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software estadístico Statgraphics (versión 18) y se expresan como la media ± la desviación estándar. Las condiciones de operación para el proceso de extracción se determinaron por un diseño factorial 2^3. El análisis estadístico de los datos se efectuó para un nivel de significancia del 5% mediante las pruebas de comparación de medias: Tukey ($p \leq 0.05$) y Scheffé ($p \leq 0.05$).

CAPÍTULO 7. RESULTADOS

7.1 Caracterización física del material biológico

La caracterización física del polvo de duramen de *E. cyclocarpum* consistió en cuatro variables físicas que permitieron la obtención de partículas con el tamaño adecuado para aumentar el área superficial del duramen de *E. cyclocarpum* con el disolvente de extracción (tabla 7.1).

Tabla 7.1 Caracterización física del polvo de duramen de *E. cyclocarpum*.

Variables físicas	Parámetro
Porosidad del lecho empacado	0.52 ± 0.00
Densidad aparente (g/mL)	0.20 ± 0.00
Densidad compactada (g/mL)	0.23 ± 0.00
Índice de Carr (%)	15.59 ± 0.17

Los resultados son promedio de tres mediciones ± la desviación estándar. *Fracciones másicas con respecto a la biomasa inicial (10 g).

7.2 Análisis fitoquímico del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

El análisis fitoquímico del duramen determinó que el manool está presente entre los compuestos extraíbles de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. La tabla 7.2 muestra los resultados del proceso de extracción sucesiva en Soxhlet con disolventes de polaridad ascendente y la extracción sólido-líquido por contacto en dispersión.

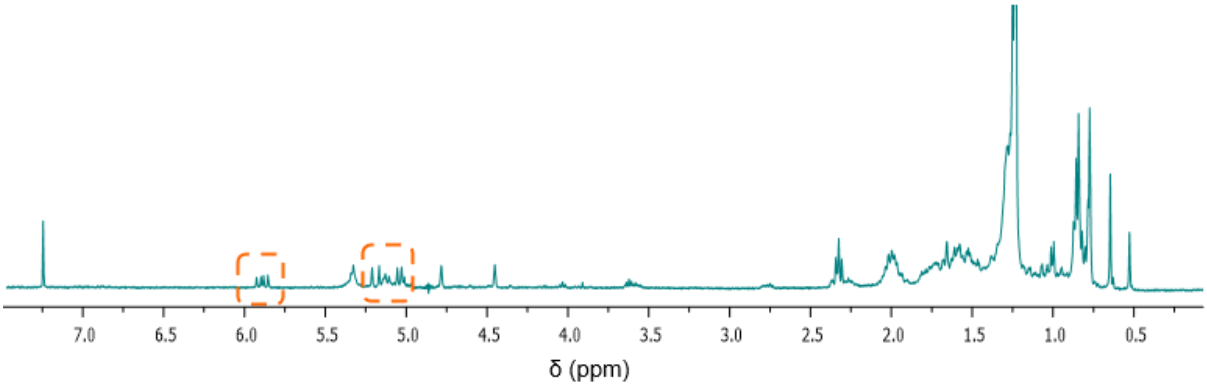
Tabla 7.2 Seguimiento de los compuestos extraíbles del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

Etapa del proceso					
Extracción Soxhlet			Extracción por contacto en dispersión		
Extracto	EC*	PM	RR*	EM*	PM
Hexánico	0.8 ± 0.10	ND	-	-	ND
Acetónico	5.6 ± 0.43	+	0.90 ± 0.03	7.50 ± 1.82	+++
Metanólico	15.1 ± 0.37	-/+	0.98 ± 0.07	0.26 ± 0.07	+

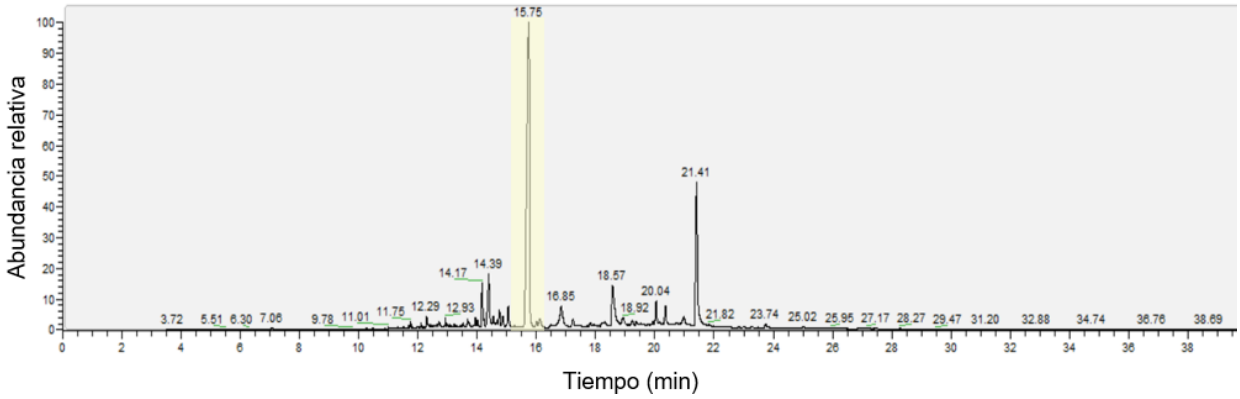
La biomasa inicial fue de 10 g. EC: extracto crudo, EM: extracto con contenido en manool, ND: no detectado y RR: residuo remanente. Los resultados son promedio de tres mediciones ± la desviación estándar. *Rendimientos en porcentaje (%). Compuestos extraíbles: 21.46 ± 0.02%.

La figura 7.1 muestra los espectros de ^{1}H-RMN, el cromatograma de gases y el espectro de masas del extracto acetónico donde se encontraron señales características de manool. Las líneas punteadas de color naranja en el espectro de ^{1}H-RMN enmarcan las señales de los protones vinílicos del manool y el rectángulo amarillo del cromatograma de gases destaca el tiempo de retención del manool.

A)



B)



C)

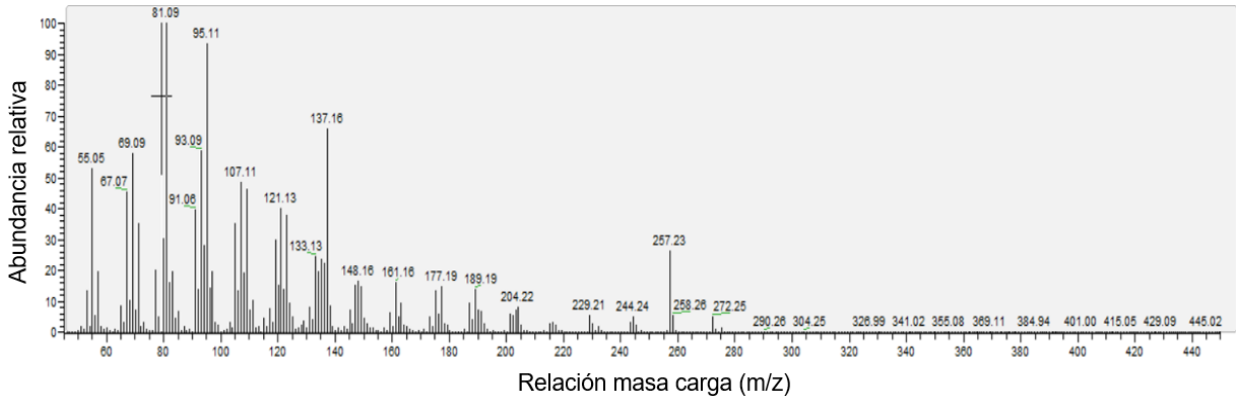


Figura 7.1 Detección espectroscópica del manool A) ^{1}H-RMN a 400 MHz en $CDCl_3$, B) cromatograma de gases y C) espectrometría de masas.

7.3 Determinación de los parámetros de operación en Soxhlet

El diseño factorial 2^3 destaca los parámetros de operación para la extracción Soxhlet del manool. La tabla 7.3 muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el diseño factorial 2^3.

Tabla 7.3 Análisis de varianza para el diseño factorial 2^3.

Fuente de variación	SC	GL	CM	*F* Calculada	Valor *p*
a: Tiempo (h)	1.39	1	1.39	28.76	0.00
b: Proporción masa/volumen (g/mL)	0.42	1	0.42	8.73	0.02
c: Temperatura (°C)	0.14	1	0.14	2.90	0.13
ab	0.03	1	0.03	0.56	0.48
ac	0.03	1	0.03	0.60	0.46
bc	0.12	1	0.11	2.39	0.16
abc	0.05	1	0.05	0.95	0.36
Error	0.39	8	0.05		
Total	2.56	15			

CM: Cuadrado medio, GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados.

El coeficiente de determinación (R^2) del modelo estadístico tuvo un valor de 0.85. Los factores dominantes en la extracción Soxhlet del manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum* son: tiempo a un nivel alto y relación masa/volumen a un nivel bajo. Las representaciones gráficas del efecto de las variables control sobre el rendimiento de los extractos acetónicos de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. por el método de Soxhlet se ilustran en la figura 7.2.

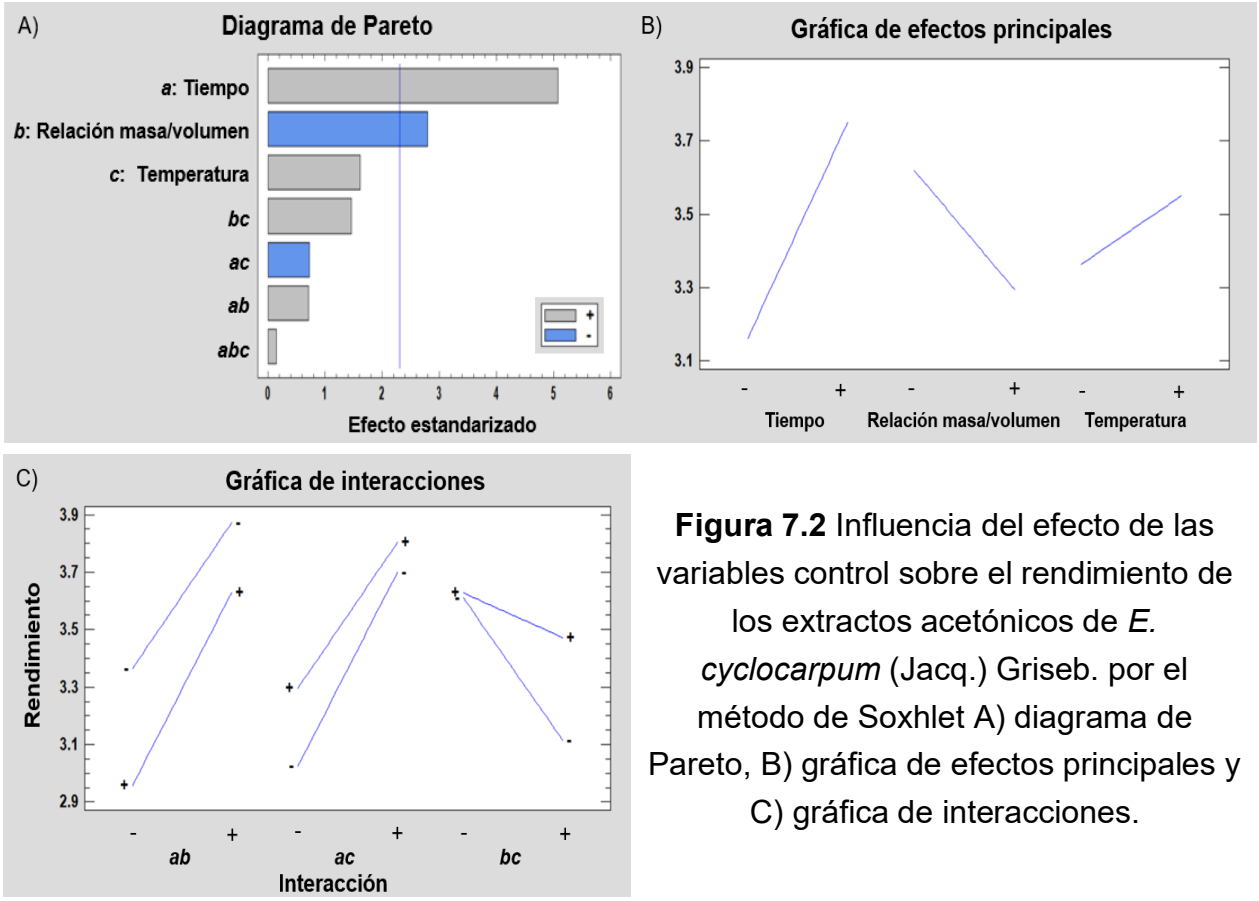


Figura 7.2 Influencia del efecto de las variables control sobre el rendimiento de los extractos acetónicos de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. por el método de Soxhlet A) diagrama de Pareto, B) gráfica de efectos principales y C) gráfica de interacciones.

7.4 Diagrama de equilibrio de fases de la extracción en Soxhlet

Los parámetros de equilibrio se determinaron con el diagrama de equilibrio de fases. La figura 7.3 representa el proceso de extracción sólido-líquido de múltiple etapa en corriente directa. La figura 7.4 muestra el diagrama del triángulo rectángulo con el cual se obtuvieron los valores de equilibrio entre las fases de la extracción. La composición del extracto y el residuo se muestra en la tabla 7.4.

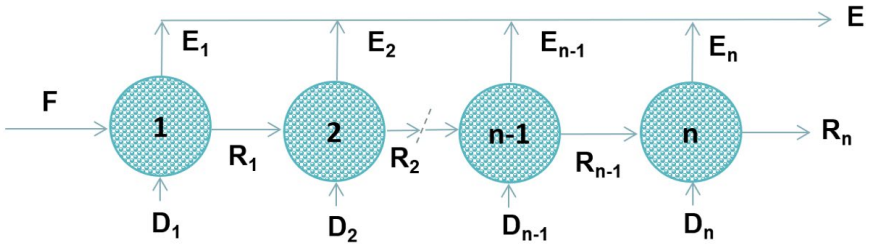
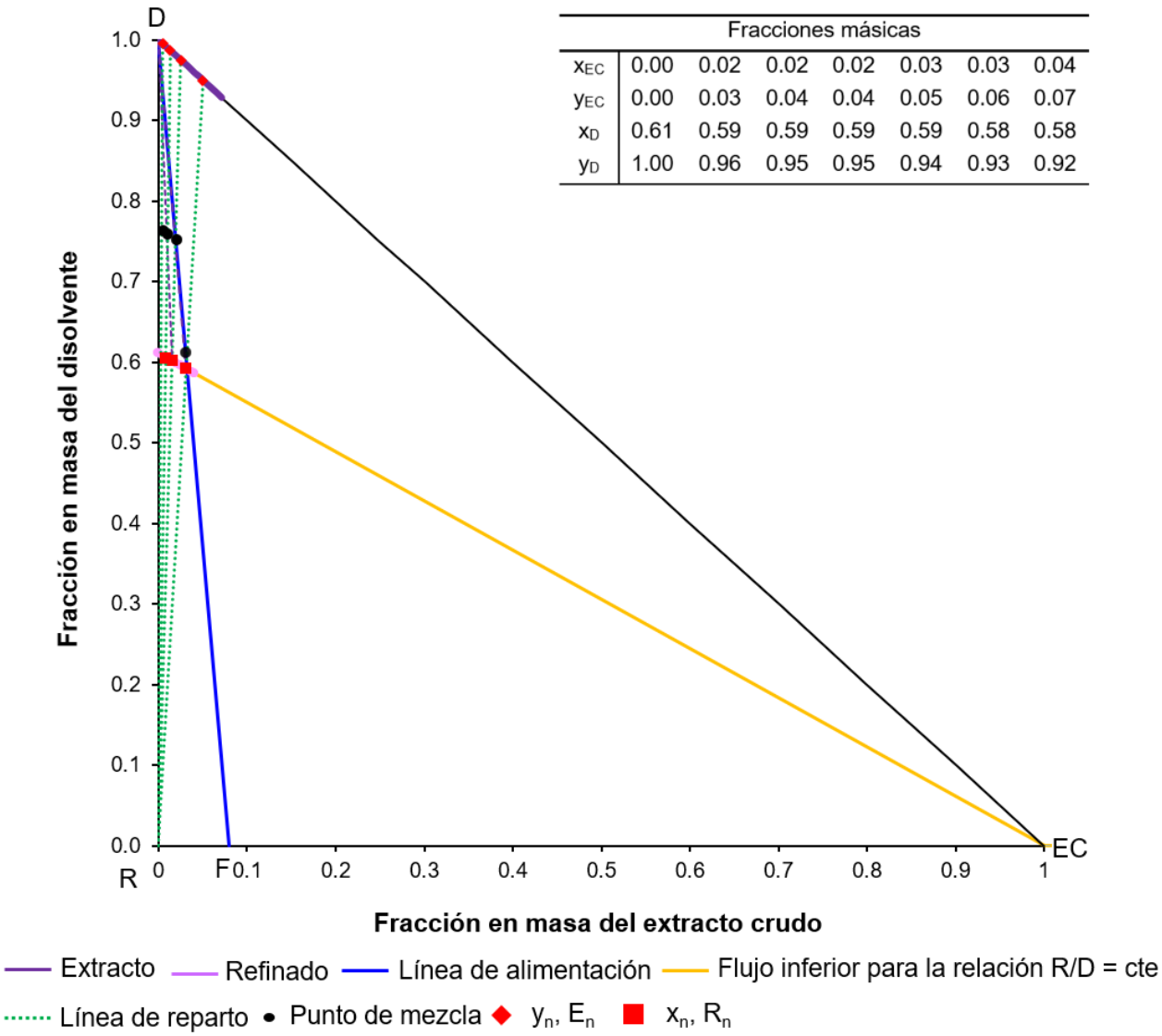


Figura 7.3 Diagrama de extracción sólido-líquido con contacto múltiple en corriente directa. F: Alimentación, D_n: Disolvente que entra a la etapa n, E_n extracto que sale de la etapa n, R_n: residuo que sale de la etapa n y n representa el número de etapa.



Fracciones másicas							
x_{EC}	0.00	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04
y_{EC}	0.00	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.07
x_D	0.61	0.59	0.59	0.59	0.59	0.58	0.58
y_D	1.00	0.96	0.95	0.95	0.94	0.93	0.92

Figura 7.4 Diagrama de equilibrio de fases de la extracción sólido-líquido con contacto múltiple a corriente directa (concurrente). D: Disolvente, EC: Extracto crudo, R: Residuo, F: Alimentación, x_D: Fracción másica del disolvente en el residuo, x_{EC}: Fracción másica del soluto en el residuo, y_D: Fracción másica del disolvente en el extracto, y_{EC}: Fracción másica del soluto en el extracto crudo, y_n, E_n: Fracción másica del extracto en la etapa n, x_n, R_n: Fracción másica del residuo en la etapa n y n: Número de etapa. **Fracciones másicas, con respecto a la biomasa inicial (10 g).**

Tabla 7.4 Composición másica del extracto crudo acetónico y el residuo

Composición en el extracto			
$\mathbf{y_D = 98.59}$		$\mathbf{y_{EC} = 1.41}$	
Masa del extracto (calculado):	$\mathbf{0.69\ g}$	$\%\ \mathbf{Error = 4.35}$	
Masa del extracto (experimental):	$\mathbf{0.66\ g}$		
Composición en el residuo			
$\mathrm{R} = 23.94\ \mathrm{g}$	$\mathbf{x_D = 61.10}$	$\mathbf{x_{EC} = 1.18}$	$\mathbf{x_R = 37.72}$
Solvente en el Residuo:	$\mathbf{14.63\ g}$		
Masa del residuo (calculado):	$\mathbf{9.32\ g}$	$\%\ \boldsymbol{Error = 2.25}$	
Masa del residuo (experimental):	$\mathbf{9.11\ g}$		

La fracción de la composición del disolvente en el extracto y el residuo se obtuvieron de la figura 7.4. y_D = Fracción másica del disolvente en el extracto, y_{EC} = Fracción másica del soluto en el extracto crudo, x_D = Fracción másica del disolvente en el residuo, x_{EC} = Fracción másica del soluto en el residuo, x_R = Fracción másica del residuo en el residuo. **Fracciones másicas (10^{-2}).**

7.7 Caracterización estructural del manool

La figura 7.5 muestra los espectros de ^{1}H-RMN a 400 MHz en $CDCl_3$, su expansión por espectroscopía de correlación, infrarrojo, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y su comparación con la base de datos del NIST (versión 2.0).

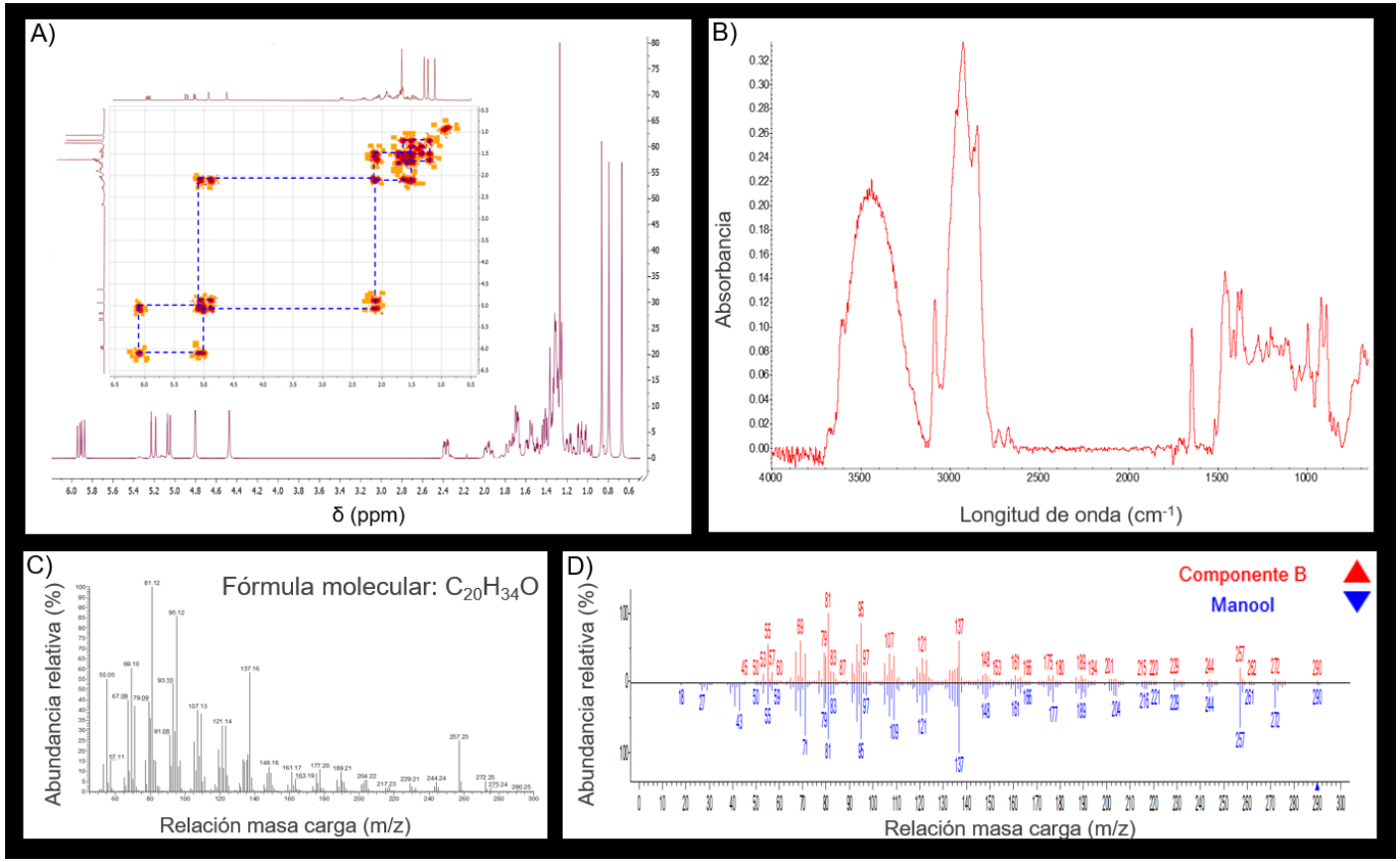


Figura 7.5 Análisis químico de manool por técnicas de A) ^{1}H-RMN a 400 MHz en $CDCl_3$ y su expansión por espectroscopía de correlación, B) Espectroscopía infrarroja, C) Espectrometría de masas y D) Comparación del espectro de masas con la base de datos del NIST, versión 2.0.

7.8 Manool en el duramen de *E. cyclocarpum* de tres regiones distintas

La tabla 7.5 muestra la variabilidad natural del *E. cyclocarpum*, de tres regiones (Tuzantla, Ixtapa y Veracruz), sobre el rendimiento en manool.

Tabla 7.5 Rendimiento de manool del *E. cyclocarpum.*

Procedencia del *E. cyclocarpum*	Rendimiento en manool (10^{-2}, %)
Tuzantla	3.30 ± 0.14[a]
Ixtapa	1.78 ± 0.24[b]
Veracruz	1.81 ± 0.16[b]

Los resultados son promedio de tres mediciones ± la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento, Tukey ($p \leq 0.05$).

7.9 Análisis técnico-económico

La figura 7.6 muestra el diagrama de flujo para el enriquecimiento en manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum*.

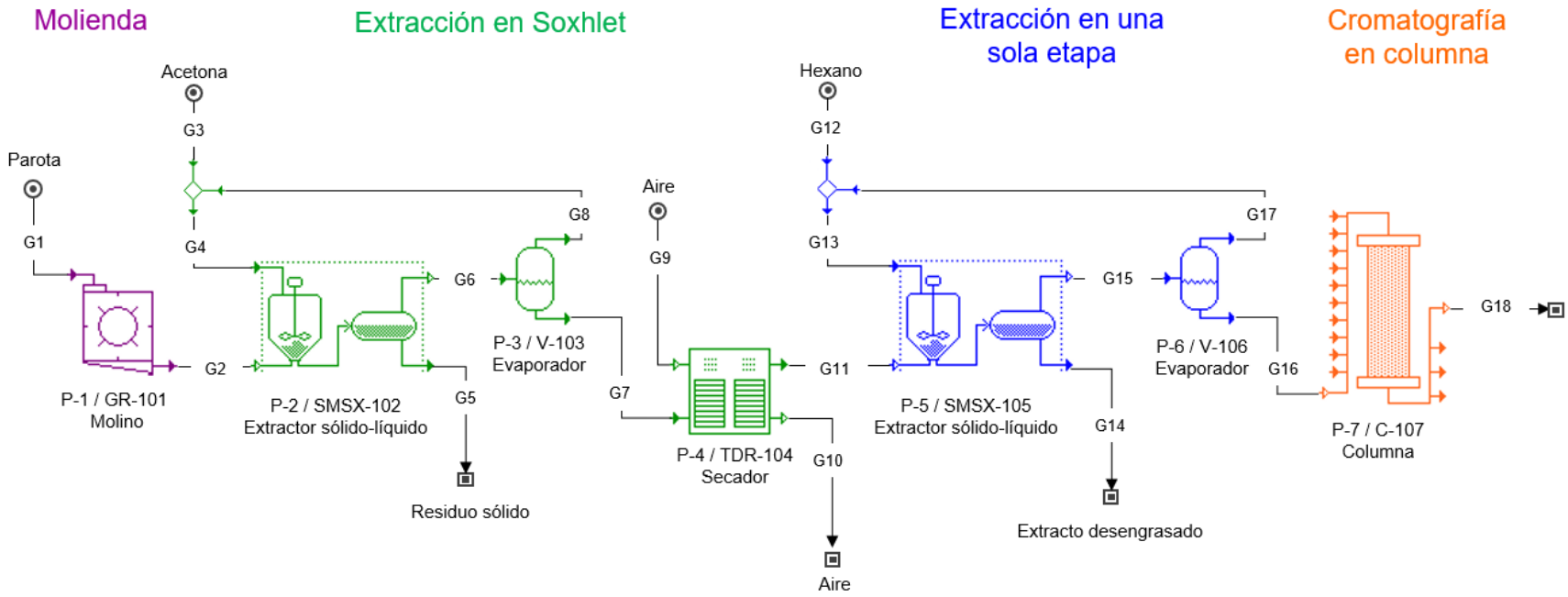


Figura 7.6 Diagrama de flujo para el proceso de enriquecimiento en manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum*.

El tamaño de la escala fue importante para determinar la rentabilidad del proceso. Una escala de 10 kg por lote fue la base para determinar la factibilidad económica del proceso. La tabla 7.6 muestra los costos totales para la inversión para la escala mencionada.

Tabla 7.6 Costos de los equipos para la producción de manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum* a una escala de procesamiento de 10 kg.

Cantidad	Nombre	Descripción	Costo	
			MXN$	**USD$**
1	GR-101 (Molino)	Potencia del motor = ½ HP	2 896.73	142.14
1	SMSX-102 (Extractor Soxhlet)	Volumen = 1 kg	30 506.29	1 187.89
1	V-103 (Rotavapor)	Volumen = 5 L	54 239.00	2 661.15
1	(Secador de charolas)	Volumen = 0.14 m^3	26 039	1 277.67
1	SMSX-105 (Extractor de una etapa)	Volumen = 5 kg	20 427.89	98.85
1	C-107 (Columna cromatográfica)	Volumen = 0.5 L	3 500.00	171.74
1	R-000 (Refrigerante)	Volumen = 6 L	22 103.27	22 103.26
	Costo total del equipo (Eq^1)		159 712.18	6 559.04
	Costo total del equipo a escalar (Eq^2)		**635 825.63**	**31 198.51**

[1] Costo del equipo con una capacidad de 1 kg, [2] costo estimado del equipo con una capacidad de 10 kg.

El costo total de inversión de la planta está en la tabla 7.7. La figura 7.7 esquematiza el diagrama de pastel con los costos de inversión directos e indirectos.

Tabla 7.7 Costo total de inversión para la producción de manool a escala piloto.

Costos directos	MXN$	USD$
Costo de adquisición del equipo (CAE)	635 825.63	31 198.51
Instalación de equipos	254 330.25	12 479.40
Tuberías	95 373.84	4 679.78
Servicios (instalaciones)	95 373.84	4 679.78
Construcciones (servicios)	76 299.08	3 743.82
Sistemas eléctricos	95 373.84	4 679.78
Mejoras de terreno	76 299.08	3 743.82
Instrumentación y control	38 149.54	1 871.91
Terreno	25 433.03	1,247.94
Costos directos totales (CDT)	1 392 458.12	68 324.74
Costos indirectos	**MXN$**	**USD$**
Gastos de construcción	167 094.97	8 198.97
Diseño y coste de ingeniería	139 245.81	6 832.47
Contingencias	97 472.07	4 782.73
Asistencia para la puesta en marcha	41 773.74	2 049.74
Legales	27 849.16	1 366.49
Costos indirectos totales (CIT)	306 340.79	15 031.44
COSTO TOTAL DE INVERSIÓN (CTI)	**1 698 798.91**	**83 356.18**

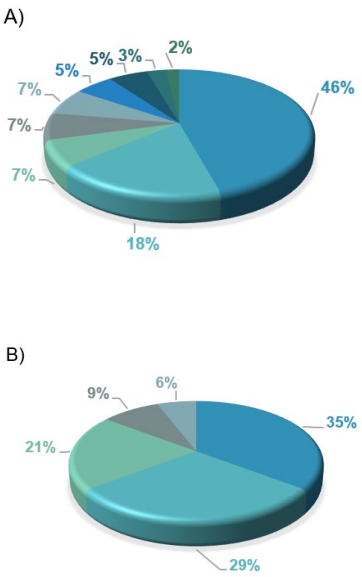


Figura 7.7 Diagrama de pastel de costo total de inversión. A) costos directos y B) costos indirectos.

Los costos de operación anual (tabla 7.8) y su desglose porcentual se muestran en la figura 7.8.

Tabla 7.8 Costo de operación anual para una producción manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

Costos de operación	MXN$/año	USD$/año
Materia prima	54 684.18	2 683.23
Mantenimiento	40 119.66	1 968.58
Servicios	32 604.80	1 599.84
Gestión y operación	11 768.43	577.45
Tratamiento/eliminación de residuos	12 709.12	623.61
Total	**151,886.20**	**7,452.71**

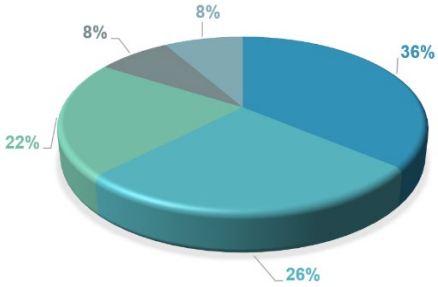


Figura 7.8 Representación porcentual de los costos de operación para la producción de manool.

El consumo de materia prima para la producción de manool está en la tabla 7.9 La figura 7.9 muestra los costos anuales de materias primas.

Tabla 7.9 Materia prima para la producción anual de manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum.*

Materia Prima (MP)	Costo de MP (MNX/kg)	Consumo de MP (kg/año)	Costo anual (MXN/año)	Costo anual (USD/año)
Acetato de etilo	64.59	313	20 248.17	993.53
Acetona	15.00	950	14 254.08	699.42
Gel de sílice	2 376.84	5	11 143.51	546.79
Hexano	17.94	325	5 838.41	286.48
Parota	1.33	2400	3 200.00	157.02
Total			**54 684.18**	**2 683.23**

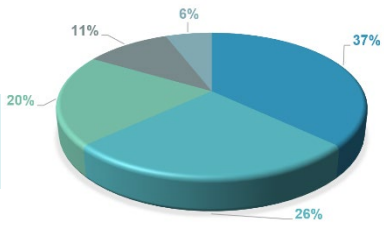


Figura 7.9 Desglose de los costos anuales de materias primas para la producción de manool.

Los resultados de los indicadores económicos para la aceptación del proyecto se muestran en la tabla 7.10.

Tabla 7.10 Indicadores económicos para la rentabilidad del proyecto a cinco años.

Rentabilidad del proyecto*	
Indicador económico	Valor
VPN	$ 4 000 515.24
ICB	3.52
TIR	94.15%
TREMA	17.33%

*Tiempo de recuperación de la inversión 5 años.

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La caracterización fisicoquímica del polvo de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. evaluó cuatro variables fisicoquímicas (tabla 7.1). Las variables físicas fueron: la porosidad del lecho empacado, densidad aparente, densidad compactada e índice de compresibilidad (índice de Carr). Es importante destacar, que el tamaño de partícula es un factor importante en la extracción sólido-líquido del duramen de *E. cyclocarpum*, un tamaño de partícula pequeña aumenta el área de contacto entre las fases, facilita la solvatación del soluto en el disolvente y por lo tanto la velocidad de la extracción aumenta. La porosidad del lecho empacado tuvo un valor de 0.52, lo cual indica una buena transferencia de masa por convección, ya que esta controla el área de contacto efectiva durante la extracción. Los lechos con una porosidad mayor a 0.50 ± 0.00 tienen un mejor rendimiento en la extracción (Comerlatto *et al.*, 2021). La densidad aparente del aserrín fue de 0.20 ± 0.00 g/mL, mientras que la densidad compactada tuvo un valor de 0.23 ± 0.00 g/mL, estas propiedades están relacionadas con el tamaño de partícula (a mayor tamaño de partícula, menor densidad aparente) y el contenido de humedad (Woodcock y Mason, 1987), sin embargo, para analizar esta información fue necesario comparar ambos valores mediante el índice de Carr, el cual fue de 15.59 ± 0.17%, el cual lo clasifica como una partícula de “fluidez adecuada” (Shah *et al.*, 2008), esto indica que el duramen aserrado tiene un tamaño lo suficientemente pequeño para favorecer la superficie de contacto, pero no muy fino para compactar el lecho y obstaculizar el libre flujo de disolvente en la cámara de extracción. La extracción sucesiva con disolventes en polaridad ascendente se utiliza en la química de productos naturales para extraer y aislar metabolitos secundarios de distintas polaridades. La realización de este ensayo, en un equipo Soxhlet se utilizó como análisis preliminar para determinar la presencia del diterpeno manool en el duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. y su afinidad por alguno de los disolventes. Los resultados de la tabla 7.2 muestran los rendimientos de los procesos de extracción sucesiva en Soxhlet con disolventes de polaridad ascendente y la extracción sólido-líquido por contacto en dispersión. Esta última extracción, aisló al manool del resto de los componentes del extracto. El total de los extractos crudos (EC) de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb., tuvo un valor de 21.46 ± 0.02% en compuestos

extraíbles, este valor coincide con lo que reportan Ramos-Pantaleón *et al*., 2011; quienes determinaron el total de sólidos extraíbles del duramen de *E. cyclocarpum*, mediante extracción sucesiva en Soxhlet con disolventes de polaridad ascendente. Cabe mencionar, que los materiales vegetales contienen sólo una pequeña cantidad de compuestos extraíbles, pero la mayoría de las veces con un alto valor agregado que justifica el desarrollo del proceso (Romdhane y Gourdon, 2002). Los extractos metanólicos tuvieron una coloración café oscuro y un rendimiento del 15.1 ± 0.37%, ya que hay una mayor cantidad de compuestos extraíbles en el duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. con afinidad a este disolvente. El metanol solubiliza de la madera taninos, colorantes, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas, carbohidratos y algunas sales inorgánicas (Fengel y Wegener, 2011; Alejandro-Martínez, 2020). Los extractos acetónicos tuvieron una coloración marrón claro con presencia de cristales a temperatura ambiente y un rendimiento del 5.6 ± 0.43%, mientras que, los extractos hexánicos tuvieron el rendimiento más bajo con un valor de 0.80 ± 0.10% y una coloración amarillenta con presencia de cristales blancos a temperatura ambiente, esto se puede deber a que hexano solubiliza los compuestos lipofílicos como grasas, ceras, aceites, alcoholes terciarios y esteroles de las sustancias extraíbles de la madera (Kurth y Tokos, 1953; Fengel y Wegener, 1984). El manool de los extractos crudos se separaron mediante una segunda extracción sólido-líquido por contacto en dispersión, con la finalidad de eliminar señales que pudieran interferir en la identificación del compuesto de interés. Todos los extractos se analizaron por ^{1}H-RMN, cromatografía de gases y espectroscopía de masa. El espectro de ^{1}H-RMN de los extractos acetónicos exhibió señales características de los protones vinílicos del manool: C-14 a 5.91 ppm y del C-17 a 4.47 y 4.81 ppm, el cromatograma mostró una señal a 15.75 min con un índice de retención de 2 016, correspondiente al manool, comparable con lo que reportan Marongiu *et al*., 2001 y Adams, 2007 y el espectro de gases masa comparó las señales con la base de datos del NIST (versión 2.0) como se ilustró en la figura 7.1. La presencia del compuesto manool en los espectros de ^{1}H-RMN y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, proponen a la acetona como disolvente para la presente investigación. El diseño factorial 2^3, tuvo como propósito, proporcionar la información requerida con los recursos mínimos para descubrir las variables clave que influyen en el

proceso de extracción en Soxhlet. Variar los niveles del tiempo, relación masa/volumen y temperatura en un mismo experimento, permitió estudiar las interacciones entre los factores de forma simultánea, en lugar de uno a la vez. Los resultados del ANOVA se expusieron en la tabla 7.3, donde se puede apreciar que el tiempo y la relación masa/volumen tuvieron un valor *p* menor al nivel de significancia ($p \leq 0.05$), por lo que se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa, lo cual indicó que el tiempo y la relación masa/volumen tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento de los extractos, sin embargo, el factor que más influyó en la variable respuesta fue el tiempo. El coeficiente de determinación del modelo fue de 0.85, lo que indicó que el modelo de regresión se ajustó a los datos experimentales y puede predecir resultados futuros. Según Le Man *et al.* en el 2010, los niveles aceptables de R^2 deben ser superiores a 0.75 ($R^2 > 0.75$). La figura 7.2 esquematiza la influencia del efecto de las variables control sobre el rendimiento de los extractos acetónicos de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. por el método de Soxhlet, el diagrama de Pareto muestra que el tiempo y la relación masa/volumen tuvieron un efecto por arriba de la media, mientras que la gráfica de efectos principales mostró que el aumento del tiempo y la temperatura incrementaron el rendimiento de los extractos, mientras que el alza en la relación masa/volumen tuvo un efecto negativo en la variable respuesta. Aquí cabe destacar, que a pesar de que la gráfica de efectos principales infiere que la temperatura tiene un efecto en el rendimiento de los extractos, esta no es estadísticamente significativa en base los resultados del ANOVA. La gráfica de las interacciones mostró que no existe relación entre los factores con respecto al rendimiento de los extractos, no obstante, sugiere una posible interacción entre la temperatura y relación masa/volumen. Estos hallazgos se atribuyeron a que el aumento del tiempo incrementó el número de ciclos de extracción y por lo tanto el rendimiento de los extractos. El aumento de la temperatura acrecentó el número de ciclos, sin embargo, redujo el tiempo de contacto entre las fases, esto limitó la transferencia de masa, es posible que por ello la temperatura no tuvo un efecto significativo en la variable respuesta. La disminución en la relación masa/volumen redujo la aglomeración de las partículas de duramen dentro del cartucho de extracción (lecho empacado), lo cual aumentó el área de contacto entre el soluto y el disolvente, así como su difusividad, por lo tanto, un periodo de operación a un nivel alto y la relación

masa/volumen en un nivel bajo son las mejores condiciones de operación para la obtención de extractos acetónico a partir del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. por el método de Soxhlet. Una vez que se estableció el disolvente y las condiciones de operación para la extracción en Soxhlet, se determinaron los parámetros de equilibrio en la extracción. El diagrama de equilibrio de fases se modeló para el proceso de extracción sólido-líquido con contacto múltiple en corriente directa, donde la Parota que entró al proceso se puso en contacto con el disolvente para obtener un extracto y un residuo. El residuo (procedente de la etapa anterior) se puso en contacto con disolvente puro en una segunda etapa y así sucesivamente, de manera tal, que el residuo de la etapa anterior conformó la alimentación de la siguiente etapa, como se mostró en la figura 7.3. La extracción sólido-líquido con contacto múltiple en corriente directa tiene mayores rendimientos en comparación con la extracción sólido-líquido en una sola etapa. Esto se confirma al comparar los compuestos extraíbles totales de este trabajo con los que reportó Montes-Vega en el 2017, quien extrajo los metabolitos secundarios del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. por maceración con disolventes de polaridad ascendente. El cual reportó un rendimiento 7.7% menor al de esta investigación. La cantidad de soluto en el inerte para los diferentes tiempos de extracción, así como la masa en la solución se obtuvieron a partir de los balances de masa. Así mismo se muestra que la relación del disolvente que se retiene no varía, por lo tanto, la constante de distribución que rige a este proceso relaciona la masa del disolvente con la masa del inerte, es decir se tiene una extracción del tipo 2 conforme a Zendejas-Cendejas, 2004. La fracción en peso de los componentes del extracto y el residuo que se utilizaron para elaborar el diagrama de equilibrio de fases del triángulo rectángulo se muestran en la figura 7.4, en el cual se determinó que se requieren de cuatro etapas teóricas para lograr llevar a cabo la extracción. En la tabla 7.4 reporta la composición del disolvente y el soluto en el extracto y el residuo, así mismo destaca la similitud entre la masa del extracto calculada y la que se obtuvo de forma experimental. El porcentaje de error (4.35%) está dentro del error experimental y confirma la exactitud de la estimación, debido a que, estos estuvieron por debajo del 10%, lo cual indica que los valores de predicción son aceptables (Kaymak-Ertekin y Sultanoglu, 2001). El espectro de ^{1}H-RMN del manool se mostró en la figura 7.5 donde se identificaron señales

características de manool a 400 MHz en $CDCl_3$: *δ*: 0.67 (3H, s, CH_3-20), 0.80 (3H, s, CH_3-19), 0.86 (3H, s, CH_3-18), 1.27 (3H, s, CH_3-16), 4.47 (2H, dq, *J* = 131.5, 1.7 Hz, H-17, H-17'), 5.06 (1H, dd, *J* = 10.8, 1.3 Hz, H-15') 5.21 (1H, dd, *J* = 17.4, 1.3 Hz, H-15), 5.91 (1H, dd, *J* = 17.3, 10.7 Hz, H-14), estas comparadas por las que reportan Samson *et, al*., 2013 y Rubin, 2020. Para confirmar la asignación del espectro de ^{1}H-RMN se realizó el experimento de espectroscopía de correlaciones (COSY, por sus siglas en inglés) en el que se observa que el hidrógeno a 1.96 correlaciona con las señales 5.06 y 5.21 ppm correspondientes a los protones del C-15, así como con la señal una señal en 2.37 ppm del protón del C-7, lo que indica que la señal a 1.96 corresponde al hidrógeno del C-9. También se nota la correlación entre los protones del C-15 y su vecino del hidrógeno del C-14. Una vez dilucidada las huellas de hidrógeno que componen la molécula del componente B se realizó un análisis de espectroscopía infrarroja. El espectro de infrarrojo se analizó por discriminación de señales en las bandas a partir de las zonas características de las vibraciones en grupos funcionales, se encontraron señales a 3 437 cm^{-1} donde el ancho de la banda indica la presencia de un alcohol terciario, tres bandas a 3 081, 2 925 y 2 845 cm^{-1} correspondientes a los enlaces C-H de los carbonos C-5, C-9 y C-14; la señal del metileno terminar del carbono diecisiete se muestra a 1 643 y entre los 1 400 y 600 cm^{-1} tenemos las "zona de la huella dactilar" donde encontramos los enlaces que constituyen el cuerpo labdano, donde se encontró la constitución de la molécula. En el cromatograma de gases se observó una señal a 14.45 min con un índice de retención de 2 016, correspondiente al manool, comparable con Marongiu *et al*., 2001 y Adams, 2007. En el espectro de masas se encontraron patrones de fragmentación con iones moleculares (m/z) de 290.2609 uma, que corresponde a una fórmula molecular $C_{20}H_{34}O$ el cual se comparó con la base de datos de espectrometría de masas del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST, versión 2.0) el cual tuvo identidad con el diterpeno manool. El análisis del efecto de la región de origen del *E. cyclocarpum* sobre la cantidad de manool, mostró que las tres regiones evaluadas tuvieron presencia de manool, como se muestra en la tabla 7.5. En cuanto a la variabilidad en el rendimiento de manool, se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb procedente de Tuzantla tuvo un mayor rendimiento en manool con respecto al material biológico procedente de Ixtapa y Veracruz, los cuales

compartieron semejanzas. El diagrama de flujo para el enriquecimiento de manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum* que se mostró en la figura 7.6 se subdividió en etapas, las cuales se señalaron con colores distintos. El tamaño de escala de procesamiento fue importante para determinar la rentabilidad del proceso. La factibilidad económica del proceso se evaluó con una base de cálculo de 10 kg por lote. La tabla 7.6 mostró las dimensiones y costos de los equipos que se cotizaron para un tamaño de escala uno (Eq^1). El valor del costo de adquisición del equipo (CAE) para una producción de 10 kg se calculó conforme a lo que se estableció en el apartado 6.10. Una vez que se determinó el CAE. Los costos de operación fijos se determinaron por el método de estimación por factores (Harrison *et al.*, 2015). La tabla 7.7 contiene el costo total de inversión (CTI) para la adquisición de una planta para la producción de manool a partir de duramen de *E. cyclocarpum* a escala piloto. En la figura 7.7 se mostraron los diagramas de pastel que componen el CTI, los cuales se componen por los costos directos totales (CDT) y los costos indirectos totales (CIT). El CAE constituye casi el 50% del valor de los CDT, mientras que los gastos de construcción, diseño e ingeniería sobrepasan el 50% de los CIT. El costo de operación anual para la producción de manool a partir del duramen de *E. cyclocarpum* se muestra en la tabla 7.8, mientras que su distribución porcentual se muestra en la figura 7.8 donde se puede ver que el 66% de los costos de operación son variables de los cuales un 36% son costos de materia prima, los cuales se detallan en la tabla 7.9, donde se considera que el *E. cyclocarpum* no tiene valor, únicamente se cargan los gastos de transporte. La figura 7.9 muestra los porcentajes que componen los costos de materia prima. El periodo de recuperación de la inversión es de 17 meses. Los indicadores de rentabilidad, para un periodo de 5 años se muestran en la tabla 7.10, los cuales se obtuvieron con una tasa de interés anual del 25%. El valor presente neto (VPN) indica que habrá una recuperación de cuatro millones de peso para el quinto año, mientras que índice de rentabilidad del proyecto (ICB) es de 3.52, lo significa que, por cada peso que se invirtió en el proyecto, se obtendrán 2.52 pesos de beneficio. La tasa interna de retorno es de 94.15%, lo que significa que el proyecto es rentable y debe aceptarse.

CAPÍTULO 9. CONCLUSIÓN

El manool se enriqueció del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. mediante un proceso de extracción sólido-líquido, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa.

CAPÍTULO 10. RECOMENDACIONES

Determinar las funciones objetivo, simular y optimizar el proceso de enriquecimiento en manool a partir de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb.

BIBLIOGRAFÍA

Achotegui-Castells, A; Rocca, D.G; Llusià, J; Danti R; Barberini, S; Bouneb, M; Simoni, S; Michelozzi, M; Peñuelas J. (2016) “Terpene arms race in the *Seiridium cardinale – upressus sempervirens*”, *Scientific Reports,* 6: 1-13.

Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatograpy/Mass Spectrometry. In *Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream*. http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.018%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3853939&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%255Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.017

Alejandro-Martínez, M. (2020). *Química de Productos Naturales: aspectos fundamentales del metabolismo secundario*.

Andersen-Ranberg, J., Kongstad, K. T., Nielsen, M. T., Jensen, N. B., Pateraki, I., Bach, S. S., Hamberger, B., Zerbe, P., Staerk, D., Bohlmann, J., Møller, B. L., & Hamberger, B. (2016). Expanding the landscape of diterpene structural diversity through stereochemically controlled combinatorial biosynthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, *55*(6), 2142–2146. https://doi.org/10.1002/anie.201510650

Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). Fundamentos de fisiología vegetal. In *McGrawHill*.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426–436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

Azwanida, N. N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, *04*(03), 3–8. https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196

Batool, A., & Menaa, F. (2020). Concentration and purification of seaweed components

by chromatography methods. In *Sustainable Seaweed Technologies* (Issue August). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817943-7.00013-5

Bian, X., Bai, J., Hu, X., Wu, X., Xue, C., Han, A., Su, G., Hua, H., & Pei, Y. (2015). Penioxalicin, a novel 3-nor-2,3-seco-labdane type diterpene from the fungus Penicillium oxalicum TW01-1. *Tetrahedron Letters*, *56*(35), 5013–5016. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.07.014

Bigley, D. B., Rogers, N. A. J., & Barltrop, J. A. (1962). Chem. Ind.pdf. *Chem. Ind.*, 1570.

Binello, A., Orio, L., Pignata, G., Nicola, S., Chemat, F., & Cravotto, G. (2014). Effect of microwaves on the in situ hydrodistillation of four different Lamiaceae. *Comptes Rendus Chimie*, *17*(3), 181–186. https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.007

Bisht, B. S., Bankoti, H., & Bharti, T. (2021). A Review on Therapeutic Uses of Terpenoids. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, *11*(1-s), 182–185. https://doi.org/10.22270/jddt.v11i1-s.4523

Bott, R. F., Labuza, T. P., & Oliveira, W. P. (2010). Stability testing of spray- and spouted bed-dried extracts of Passiflora alata. *Drying Technology*, *28*(11), 1255–1265. https://doi.org/10.1080/07373937.2010.482718

Brooker, S. G., Cambie, R. C., & Cooper, R. C. (1989). Economic native plants of New Zealand. *Economic Botany*, *43*(1), 79–106. https://doi.org/10.1007/BF02859329

Caniard, A., Zerbe, P., Legrand, S., Cohade, A., Valot, N., Magnard, J. L., Bohlmann, J., & 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*, 1–13. https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-119

Chen-Lung, H., Li, L.-H., Weng, Y.-C., Hua, K.-F., & Ju, T.-C. (2020). Eucalyptus essential oils inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages through reducing MAPK and NF-κB pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *0*, 1–11. https://doi.org/10.1186/s12906-020-02999-0

Chinou, I. (2005). Labdanes of Natural Origin-Biological Activities (1981-2004). *Current*

Medicinal Chemistry, *12*(11), 1295–1317. https://doi.org/10.2174/0929867054020990

Comerlatto, A., Voll, F. A., Daga, A. L., & Fontana, É. (2021). Mass transfer in soybean oil extraction using ethanol/isopropyl alcohol mixtures. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, *165*, 120630. https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2020.120630

CONAFOR. (2018). *Lidera México en producción y consumo de madera de pino en América Latina y El Caribe*. 1–6. https://www.gob.mx/conafor/prensa/lidera-mexico-en-produccion-y-consumo-de-madera-de-pino-en-america-latina-y-el-caribe

Conner, H., & Rowe, J. W. (1976). *Differentiating Manool and 13-Epimanool*. *I*, 1949–1951.

de Oliveira, P. F., Munari, C. C., Nicolella, H. D., Veneziani, R. C. S., & Tavares, D. C. (2016). Manool, a Salvia officinalis diterpene, induces selective cytotoxicity in cancer cells. *Cytotechnology*, *68*(5), 2139–2143. https://doi.org/10.1007/s10616-015-9927-0

Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, *70*(15–16), 1621–1637. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030

Demetzos, C., & Dimas, K. S. (2001). Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, *25*(PART F), 235–292. https://doi.org/10.1016/S1572-5995(01)80009-0

Dewick, P. M. (2002). The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*, *19*(2), 181–222. https://doi.org/10.1039/b002685i

Espinoza-Madrigal, R. M. (2008). *Efecto del extracto acuoso de Enterolobium cyclocarpum (Jacq.) Griseb. sobre la enzima Dihidrofolato reductasa de hongos oomicetos fitopatógenos.* [Tesis de Licenciatura en Químico Farmacobiólogo]. Morelia Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Fengel, D., & Wegener, G. (2011). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de

Gruyter.

Francis, J. K., & Lowe, C. A. (2000). Silvics of Native and Exotic Trees of Puerto Rico and the Caribbean Islands. In J. K. Francis & C. A. Lowe (Eds.), *United States Departament of Agriculture*. June 2000.

Geankoplis, C. J. (2006). *Procesos de transporte y operaciónes unitarias* (4a ed.). Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México.

Geiselman, G. M., Zhuang, X., Kirby, J., Tran-Gyamfi, M. B., Prahl, J. P., Sundstrom, E. R., Gao, Y., Munoz Munoz, N., Nicora, C. D., Clay, D. M., Papa, G., Burnum-Johnson, K. E., Magnuson, J. K., Tanjore, D., Skerker, J. M., & Gladden, J. M. (2020). Production of ent-kaurene from lignocellulosic hydrolysate in Rhodosporidium toruloides. *Microbial Cell Factories*, *19*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12934-020-1293-8

Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, *3*(7), 408–414. https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5

Harrison, N., Agnew, S., & Serido, J. (2015). Attitudes to debt among indebted undergraduates: A cross-national exploratory factor analysis. *Journal of Economic Psychology*, *46*, 62–73. https://doi.org/10.1016/j.joep.2014.11.005

Hosking, J. R. (1936). Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, B: Abhandlungen. *Journal of the American Chemical Society*, *69*(B), 780.

Hosking, J. R., & Brandt, C. W. (1935). Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, B: Abhandlungen. *Journal of the American Chemical Society*, *68*(B), 1311.

Ignea, C., Ioannou, E., Georgantea, P., Loupassaki, S., Trikka, F. A., Kanellis, A. K., Makris, A. M., Roussis, V., & Kampranis, S. C. (2015). Reconstructing the chemical diversity of labdane-type diterpene biosynthesis in yeast. *Metabolic Engineering*, *28*, 91–103. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.12.001

Jaeger, R., & Cuny, E. (2016). Terpenoids with special pharmacological significance: A review. *Natural Product Communications*, *11*(9), 1373–1390.

https://doi.org/10.1177/1934578x1601100946

Jothy, S. L., Zakaria, Z., Chen, Y., Lau, Y. L., Latha, L. Y., Shin, L. N., & Sasidharan, S. (2011). Bioassay-directed isolation of active compounds with antiyeast activity from a cassia fistula seed extract. *Molecules*, *16*(9), 7583–7592. https://doi.org/10.3390/molecules16097583

Kaymak-Ertekin, F., & Sultanoglu, M. (2001). Moisture sorption isotherm characteristics of peppers. *Journal of Food Engineering*, *47*(3), 225–231. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00120-5

Keeling, C. I., & Bohlmann, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, *170*(4), 657–675. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01716.x

Lee, M. J., Prabhu, S., Meng, X., Li, C., & Yang, C. S. (2000). An improved method for the determination of green and black tea polyphenols in biomatrices by high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *Analytical Biochemistry*, *279*(2), 164–169. https://doi.org/10.1006/abio.2000.4487

Levey, M. (1959). Chemistry and chemical technology in ancient Mesopotamia.pdf. *Elseivier, Amsterdam, The Netherlands*, *20*(4), 110–112.

Lipmann, F., & Tuttle, L. C. (1945). a Specific Micromethod for the Determination of Acyl Phosphates. *Journal of Biological Chemistry*, *159*(1), 21–28. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)51298-4

López-Hernández, Y. (2010). *Nuevo método de separación de manool*. [Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica]. Morelia Michoacán: Instituto Tecnológico de Morelia José María Morelos y Pavón, México.

Marongiu, B., Porcedda, S., Della Porta, G., & Reverchon, E. (2001). Extraction and isolation of Salvia desoleana and Mentha spicata subsp. insularis essential oils by supercritical CO2. *Flavour and Fragrance Journal*, *16*(5), 384–388. https://doi.org/10.1002/ffj.1021

Martinez Pacheco, M. M., Del Rio, R. E., Flores Garcia, A., Martinez Muñoz, R. E., Ron Echeverria, O. A., & Raya Gonzalez, D. (2012). Enterolobium cyclocarpum (Jacq.) Griseb.: The biotechnological profile of a tropical tree. *Boletin Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, *11*(5), 385–399.

Mendes-Ferreira, S. F., Matanovich, L., Moraes, S., Henrique, C., & Martins, G. (2020). *Anaerobe Antibacterial activity of salvia of fi cinalis L . against periodontopathogens : An in vitro study*. *63*. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102194

Merz, D. F., & Ritchie, W. J. (1970). The production of crystalline manool from Dacrydium biforme. *New Zealand Journal of Science*, *13*(2), 268–286.

Montes-Vega, L. E. (2017). *Obtención de Manool a partir de duramen de Enterolobium cyclocarpum (Jacq.) Griseb. (Parota).* [Tesis de Maestria en Ciencias y Tecnologías de la Madera]. Morelia Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Moreira, M. R., 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., & Veneziani, R. C. S. (2013). RP-HPLC analysis of manool-rich Salvia officinalis extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *23*(6), 870–876. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000600003

Mtewa, A. G., Deyno, S., Kasali, F. M., Annu, A., & Sesaazi, D. C. (2018). General Extraction, Isolation and Characterization Techniques in Drug Discovery: A Review. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, *38*(1), 10-2 4. http://gssrr.org/index.php?journal=JournalOfBasicAndApplied

Neves-Monteiro, A. S., Campos, D. R., Albuquerque, A. A. S., Evora, P. R. B., Ferreira, L. G., & Celotto, A. C. (2020). Effect of diterpene manool on the arterial blood pressure and vascular reactivity in normotensive and hypertensive rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, *115*(4), 669–677. https://doi.org/10.36660/abc.20190198

Nicolella, H. D., Oliveira, P. F. de, Munari, C. C., Costa, G. F. D., Moreira, M. R., Veneziani, R. C. S., & Tavares, D. C. (2014). Differential effect of manool - A

diterpene from Salvia officinalis, on genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in V79 and HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *72*, 8–12. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.025

Nóvoa, M. L., Salazar, F. J., Gámez, C., Angarita, A. Y., Tropper, E., Canudas, N., & Villamizar, J. E. (2014). Facile access to optically active ring C aromatic diterpene derivatives from (+)-manool. First synthesis of 13,14-dihydroxy-8,11,13-podocarpatrien-7-one. *Natural Product Communications*, *9*(3), 355–358. https://doi.org/10.1177/1934578x1400900317

Olate, V. R., Vélez, M. L., Greslebin, A., & Schmeda-Hirschmann, G. (2015). Phytophthora austrocedri elicitates changes in diterpene profile of austrocedrus chilensis. *Molecules*, *20*(8), 15084–15097. https://doi.org/10.3390/molecules200815084

Pal, M., Mishra, T., Kumar, A., & Tewari, S. K. (2016). Medicinal plants: Biological evaluation of terrestrial and marine plant originated labdane diterpenes (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, *50*(8), 558–567. https://doi.org/10.1007/s11094-016-1490-2

Pamatz-Bolaños, T. (2008). *Estudio parcial fitoquímico y evaluación antitermita de*. [Tesis de Licenciatura en Químico Farmacobiólogo]. Morelia Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Pasdaran, A., & Hamedi, A. (2017). Natural Products as Source of New Antimicrobial Compounds for Skin Infections. In *The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections* (1st ed., Vol. 2). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811079-9.00014-8

Peters, R. J. (2010). Two rings in them all: The labdane-related diterpenoids. *Natural Product Reports*, *27*(11), 1521–1530. https://doi.org/10.1039/c0np00019a

Prieto, J. M., & Silveira, D. (2019). Natural Cytotoxic Diterpenoids, a Potential Source of Drug Leads for Melanoma Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(36), 4237–4250. https://doi.org/10.2174/1381612825666190111143648

Ramos-Pantaleón, D., Ávilla-Calderón, L. E., Ochoa-Ruíz, H. G., & Rutiaga-Quiñones, J.

G. (2011). *Contenido de sustancias extraíbles en la madera de Enterolobium cyclocarpum (Jacq.) Griseb (Leguminosae)*. *53*, 7–19.

Ravera, S., Esposito, A., Degan, P., Caicci, F., Manni, L., Liguori, A., Bisio, A., Iobbi, V., Schito, A., Traverso, C. E., & Panfoli, I. (2021). The diterpene Manool extracted from Salvia tingitana lowers free radical production in retinal rod outer segments by inhibiting the extramitochondrial F1Fo ATP synthase. *Cell Biochemistry and Function*, *November 2020*, 1–8. https://doi.org/10.1002/cbf.3618

Raya-gonzalez, 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*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Rhafouri, R., Strani, B., Zair, T., Ghanmi, M., Aafi, A., Omari, M. E., & 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.

Rogachev, V., Löhl, T., Markert, T., & Metz, P. (2012). A short and efficient synthesis of (+)-totarol. *Arkivoc*, *2012*(3), 172–180. https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.313

Romdhane, M., & Gourdon, C. (2002). Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, *87*(1), 11–19. https://doi.org/10.1016/S1385-8947(01)00206-6

Roncero, A. M., Tobal, I. E., Moro, R. F., Díez, D., & Marcos, I. S. (2018). Halimane diterpenoids: sources, structures, nomenclature and biological activities. *Natural Product Reports*, *35*(9), 955–991. https://doi.org/10.1039/c8np00016f

Rubin, D. (2020). *Discoveries from the alpine daisy Celmisia viscosa : unique diterpenes and flavones , and variation within the species* (Issue December).

Ruzicka, L., Durst, O., & Jeger, O. (1947). Zur Kenntnis von Triterpenen; Umwandlung des Triterpens Ambreïn in ein Abbauprodukt des Diterpens Manool. *Helv Chim Acta*, *30*, 353.

Salazar, F. J., & Villamizar, J. E. (2013a). Use of (+)-manool in the synthesis of natural products. Part II. Diterpenes and relatives. *Journal of Chemical Research*, *37*(2), 63–70. https://doi.org/10.3184/174751912X13563728953551

Salazar, F. J., & Villamizar, J. E. (2013b). *Use of (+) -manool in the synthesis of natural products . Part I . Sesquiterpenes*. 1–5.

Sansom, C. E., Larsen, L., Evans, A. C., & Perry, N. B. (2013). Epimanool and a new 2,6-dideoxy-hexopyran-3-ulose derivative from Celmisia viscosa. *Natural Product Communications*, *8*(6), 689–692. https://doi.org/10.1177/1934578x1300800601

Schalk, M., & Rocci, L. (2019). *Production of manool. Patent Application Publication: US 2019 / 0253069 A1*.

Scheffrahn, R. H., Hsu, R. C., Su, N. Y., Huffman, J. B., Midland, S. L., & Sims, J. J. (1988). Allelochemical resistance of bald cypress,Taxodium distichum, heartwood to the subterranean termite,Coptotermes formosanus. *Journal of Chemical Ecology*, *14*(3), 765–776. https://doi.org/10.1007/BF01018771

Sekine, N., Shibutani, S., & Yatagai, M. (2013). Chemical composition of the terpenoids in wood and knots of Abies species. *European Journal of Wood and Wood Products*, *71*(5), 679–682. https://doi.org/10.1007/s00107-013-0715-2

Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E., & Aceituno, C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in Opuntia spp. *Journal of Arid Environments*, *68*(4), 534–545. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.08.001

Sheng-Yang, W., Pin-Fun, C., & Shang-Tzen, C. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (Cinnamomum osmophloeum) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, *96*(7), 813–818. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.010

Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *53*, 10–23. https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003

Shmidt, E. N., Beneshova, V., Chirkova, M. A., & Pentegova, V. A. (1964). IZVESTIYA AKADEMII NAUK SSSR, SERIYA GEOLOGICHESKAYA (IZVESTIYA OF THE ACADEMY OF SCIENCES OF THE U.S.S.R.) IN COVER-TO-COVER TRANSLATION, 1962, NO. 2. *International Geology Review*, *6*(1), 91–93. https://doi.org/10.1080/00206816409474603

Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2008). Principios de análisis fundamental. In *Principios de análisis fundamental*.

Steele, C. L., Katoh, S., Bohlmann, J., & Croteau, R. (1998). Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (Abies grandis): Differential Transcriptional Control of Monoterpene, Sesquiterpene, and Diterpene Synthase Genes in Response to Wounding. *Plant Physiology*, *116*(4), 1497–1504. https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1497

Stoessl, A., Stothers, J. B., & Ward, E. W. B. (1976). Sesquiterpenoid stress compounds of the solanaceae. *Phytochemistry*, *15*(6), 855–872. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84361-7

Sun, L. C., Li, S., Wang, F., & Xin, F. (2017). Research progresses in the synthetic biology of terpenoids. *Biotechnol. Bull*, *33*, 64–75.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). Plant physiology. In *Sunderland, United States: Editorial Sinauer Associates, Inc.: Vol. 3rd ed*. https://doi.org/10.1017/9781108486392

Tang, M. C., Zou, Y., Watanabe, K., Walsh, C. T., & Tang, Y. (2017). Oxidative Cyclization in Natural Product Biosynthesis. *Chemical Reviews*, *117*(8), 5226–5333. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00478

Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *148*(January), 63–106. https://doi.org/10.1007/10_2014_295

Trapp, S. C., & Croteau, R. B. (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, *158*(2), 811–832. https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.811

Ulubelen, A., Topcu, G., Eri, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., & Bozok-Johansson,

C. (1994). Terpenoids from Salvia sclarea. *Phytochemistry*, *36*(4), 971–974. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90474-6

Van Wyk, A. W. W., Lobb, K. A., Caira, M. R., Hoppe, H. C., & Davies-Coleman, M. T. (2007). Transformations of manool. tri- and tetracyclic norditerpenoids with in vitro activity against Plasmodium falciparum. *Journal of Natural Products*, *70*(8), 1253–1258. https://doi.org/10.1021/np0701071

Veličković, D. T., Randjelović, N. V., Ristić, M. S., Veličković, A. S., & Šmelcerović, A. A. (2003). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of Salvia officinalis L. *Journal of the Serbian Chemical Society*, *68*(1), 17–24. https://doi.org/10.2298/JSC0301017V

Vickers, C. E., & Sabri, S. (2015). Isoprene. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 148). https://doi.org/10.1007/10_2014_303

Villamizar, J. E., Gamez, C., Alcalá, A., Salazar, F. J., Tropper, E., Angarita, A., & Canudas, N. (2011). Facile and Simple Synthesis of Ring C Aromatic Diterpenes: Synthesis of (+)-13-Hydroxypodocarpa-8,11,13-triene and (+)-7-Deoxynimbidiol. *Synthetic Communications*, *April 2013*, 1733–1741.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, *8*(3), 303–313. https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(6), 300–312. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004

Xu, Y., Tang, P., Zhu, M., Wang, Y., Sun, D., Li, H., & Chen, L. (2021). Diterpenoids from the genus Euphorbia: Structure and biological activity (2013–2019). *Phytochemistry*, *190*(June), 112846. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112846

Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., & Yu, X. (2020). Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Natural Product Communications*, *15*(3). https://doi.org/10.1177/1934578X20903555

Yazaki, K., Arimura, G. I., & Ohnishi, T. (2017). “Hidden” terpenoids in plants: Their biosynthesis, localization and ecological roles. *Plant and Cell Physiology*, *58*(10), 1615–1621. https://doi.org/10.1093/pcp/pcx123

Zendejas-Cendejas, F. M. (2004). *Elaboración de una práctica en el laboratorio de ingeniería química del proceso de separación “Extracción sólido-líquido, en un sistema azúcar-agua.”* Universidad Nacional Autónoma de México.