

LA COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL ÁMBAR DE EL SOPLAO-RÁBAGO COMO BIOMARCADOR PALEBOTÁNICO

C. Menor-Salván¹

¹Centro de Astrobiología (CSIC-INTA). Ctra. Torrejón-Ajalvir, km 4. 28850 Torrejón de Ardoz.

INTRODUCCIÓN

El estudio científico de las resinas fósiles no es una temática de reciente invención y, tradicionalmente, se ha centrado en el aprovechamiento de la extraordinaria preservación de los materiales biológicos incluidos en ellas. Menos detallado y conocido sin embargo es el estudio de la composición molecular del ámbar, que puede aportar información acerca de su origen botánico y del destino geológico de los terpenos biológicos, además de constituir una prueba directa del metabolismo de plantas que vivieron hace millones de años. El uso de los terpenoides contenidos en el ámbar como marcadores moleculares taxonómicos y paleobotánicos constituye un área en desarrollo y las conclusiones obtenidas a partir de ellos están sujetas a la sistematización e identificación de

nuevas moléculas en los ámbares y las resinas actuales. En este aspecto, el hallazgo de un extraordinario depósito de ámbar en el término de Rábago, en la carretera de acceso a El Soplao, constituyó un hecho significativo para nuestro conocimiento del ámbar a nivel molecular, debido a su abundancia, estado de conservación y al encontrarse acompañado de abundantes restos fósiles. El ámbar de éste yacimiento se encuentra en un nivel de una potencia de 1,5 a 2 metros de lutitas negras, limolitas y areniscas con acumulaciones decimétricas de material vegetal. Los fragmentos de ámbar son tanto subaéreos como subterráneos y su rango de tamaño va desde microscópico (resinita) hasta masas decimétricas. El depósito es de edad Albiense (112-110 Ma), incluido en la formación Las Peñas (Najarro et al, 2010).



Fig. 1.- Ámbar del yacimiento de El Soplao-Rábago, encajado en lutita y fotografiado in situ con luz natural, bajo la cual el ámbar de éste depósito muestra una bella y única coloración azulada.

Como aclaración terminológica, consideraremos que *ámbar* y *resinas fósiles* son términos sinónimos desde un punto de vista geoquímico y que los podemos definir como *aquellos materiales sólidos orgánicos discretos y macroscópicos, encontrados en el registro sedimentario y derivados de resinas de plantas*

superiores (Anderson et al. 1992). El término *resinita*, que algunos autores como Anderson consideran sinónimo de resina fósil o ámbar, lo consideraremos únicamente para definir los materiales de éste tipo que se observan a nivel microscópico.

Así, en éste capítulo pondremos la composición del ámbar en su contexto bioquímico, a través de los componentes químicos de las resinas y su transformación diagenética, introduciremos los términos químicos más relevantes, para que los lectores menos formados en Química puedan entender de qué está compuesto el ámbar y describiremos la composición molecular del ámbar de El Soplo, cuyo análisis detallado e interpretación condujeron a la tesis de que su origen puede ser la familia extinta de coníferas *Cheirolepidiaceae* (Menor-Salván et al. 2010).

ORIGEN DEL AMBAR: LOS TERPENOS



Fig. 2.- Exudado resinoso de un árbol del genero *Cupressus*, compuesto mayoritariamente por los diterpenos ferruginol, totarol y ácidos dihidroagátólico y pimárico.

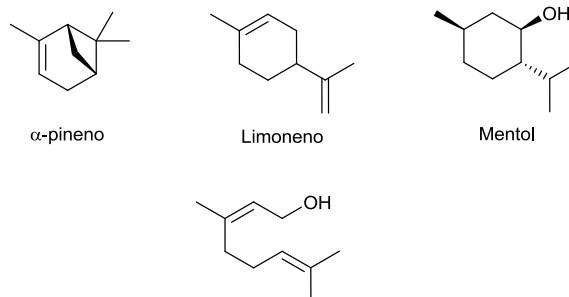
Todas las coníferas producen secreciones resinosas (Fig. 2), compuestas de una familia de moléculas llamadas *terpenos*, apreciadas por sus aromas característicos y muy utilizadas tradicionalmente como adhesivos, para la obtención de disolventes (*aguarrás*, obtenido por destilación de la resina y compuesto básicamente por el hidrocarburo pineno), obtención de pinturas y barnices, obtención de aromas o como conservantes. Las resinas de coníferas forman parte de un grupo general conocido como *exudados*, que incluye, además de las resinas de coníferas, productos de angiospermas, como la goma arábiga, mirra, la resina frankincense o los mucílagos (Langenheim, 2003).

Los exudados de coníferas, o resinas (también *oleorresinas* cuando aún no han solidificado), son líquidos viscosos, normalmente incoloros o amarillentos, que se endurecen al cabo de días o semanas. Son muy

solubles en disolventes clorados y parcialmente solubles en hexano, hidrocarburos aromáticos y metanol. Estos exudados son materiales altamente resistentes a la degradación y a los procesos biogeoquímicos, que tienen lugar tras la deposición del material biológico en el suelo. La resina, al contrario que los tejidos vegetales, puede mantenerse inalterada durante periodos de cientos a miles de años. En periodos mayores y bajo circunstancias favorables en el medio geológico, tienen lugar procesos de polimerización que endurecen el material y lo hacen más resistente a la degradación, pudiendo mantenerse inalterada durante decenas de millones de años. Esta resina, polimerizada y estabilizada en el medio geológico se conoce como *resina fósil* o *ámbar*.

Los terpenos son importantes productos metabólicos presentes en todos los órdenes biológicos y desempeñan una gran variedad de funciones. Moléculas tan conocidas como el colesterol o muchas hormonas como la testosterona, pertenecen a ésta familia molecular. Para la planta son vitales, en tanto que actúan como mediadores esenciales en procesos de polinización y defensa contra infecciones y ataques de parásitos. Químicamente, los terpenos son polímeros del hidrocarburo isopreno (2-metil-1,3-butadieno), y se clasifican en grupos según el número de unidades de isopreno que los forman:

- **Monoterpenos**: Formados por dos unidades de isopreno. Están muy extendidos en todo el reino vegetal y son responsables de aromas muy conocidos. Su interés geoquímico es limitado debido a su volatilidad.



Geraniol: monoterpene precursor (dos unidades de isopreno)

Fig. 3.- Ejemplos de monoterpenos muy conocidos. El pineno es uno de los principales responsables de la fluidez de las resinas de coníferas frescas. Su evaporación conlleva el endurecimiento de éstas.

- **Sesquiterpenos**: Formados por tres unidades de isopreno. Pueden ser lineales, mono, bi y tricíclicos y se pueden clasificar en 6 grupos

según su precursor estructural: acíclicos, bisabolanos, cadalanos, himachalanos, germacranos y humulanos. En las plantas juegan un importante papel como semioquímicos. También son precursores del color azul o violáceo de algunos hongos y flores.

Su interés quimiotaxonomico es limitado debido a su amplia distribución en todas las plantas, briofitas y hongos. La presencia de esqueletos carbonados de sesquiterpenos, en especial derivados de cadinano, en petróleos y rocas sedimentarias constituye un biomarcador de plantas terrestres. Por el momento, el mayor interés se centra en algunos derivados del bisabolano, el cedrol y cupareno y moléculas relacionadas, considerados biomarcadores específicos de *Cupressaceae* (cipreses). Asimismo, los derivados del germacrano, presentes en todas las coníferas (Otto y Wilde, 2001), pueden tener importancia como precursores de los derivados de azuleno, encontrados en las muestras de ámbar y hojas fósiles de El Soplao. Los sesquiterpenos y monoterpenos son moléculas ligeras y las responsables del aroma de las coníferas (el característico "olor a pino") y otros aromas vegetales.

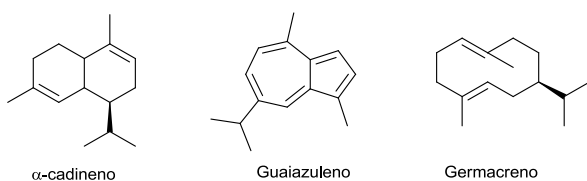


Fig. 3.- Ejemplos de sesquiterpenos.

- **Diterpenos:** formados a partir de cuatro unidades de isopreno. Son excelentes biomarcadores de coníferas, ya que son los constituyentes principales de sus resinas y tejidos (Simoneit, 1986). Están muy diversificados e incluyen hidrocarburos insaturados, compuestos fenólicos y ácidos, los llamados *ácidos resínicos*. Los diterpenos pueden ser clasificados en:

Diterpenos bicíclicos: incluyen las moléculas basadas en el esqueleto del labdano (Fig. 4). Están extendidos en todas las coníferas y la mayor parte de los ámbares son producto de polimerización de estas estructuras (Lambert et al., 2008). Así pues podemos considerarlos biomarcadores genéricos de coníferas. Su síntesis bioquímica tiene lugar a partir del geranilgeraniol (Fig. 5)

Diterpenos tricíclicos: Dentro de estos podemos encontrar un tipo muy importante desde un punto de vista geoquímico: las moléculas con el esqueleto del abietano (Fig. 4). Estas moléculas se sintetizan a partir del copalil fosfato por dos vías principales: la vía del isopimaradieno, que conduce a los abietanos fenólicos y al ácido pimarico, y la vía del abietadieno, que conduce al ácido abiético. Aunque todas las coníferas presentan derivados de abietano, la presencia de los ácidos abietanoicos (ácido abiético y su producto de oxidación, ácido dehidroabiético) es mayoritaria en las resinas de *Pinaceae* (Hautevelle et al., 2008) y rara en otros tipos, como las *Cupressaceae*. En efecto, el hecho de que constituyen dos vías metabólicas diferenciadas se evidencia en el contenido en ferruginol en coníferas de la familia *Cupressaceae* y la ausencia de estos últimos con presencia mayoritaria de ácido abiético en resinas de *Pinaceae*. Otro tipo estructural importante desde un punto de vista geoquímico y taxonómico es el de los derivados de totarano. La presencia de este esqueleto descarta el origen botánico *Pinaceae* y *Araucariaceae* (Cox et al. 2008), hecho de gran importancia en el estudio de la paleoflora. La biosíntesis de los terpenoides con esqueleto de totarano no está elucidada.

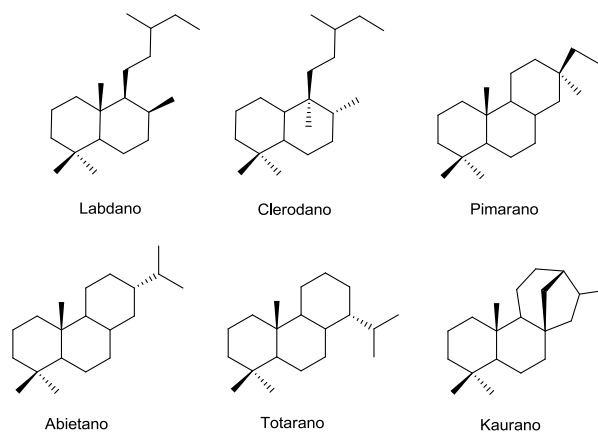


Fig. 4.- Clasificación de los diterpenos más relevantes geoquímicamente, en función de la estructura del esqueleto carbonado de su hidrocarburo prototípico.

Diterpenos tetracíclicos: Su biosíntesis sigue una vía alternativa a la de los diterpenos tricíclicos, utilizando como precursor el *ent*-copalil difosfato, que conduce a los terpenoides de la familia del kaurano, extendidos en resinas de coníferas de las familias *Araucariaceae*, *Pinaceae* y mas

raramente *Cupressaceae*. La vía del kaurano conduce a la síntesis de un tipo muy importante de diterpenoides: las gibberelinas. Estas moléculas son hormonas vegetales que regulan el crecimiento la germinación, floración y maduración del fruto. Desde un punto de vista quimiotaxonomico, la presencia de diterpenoides con el esqueleto de kaurano, filocladano o beyerano sugiere la familia *Araucariaceae* como fuente biológica de la resina (Hautevelle et al., 2006).

- **Triterpenos:** Formados por seis unidades de isopreno. Son moléculas muy importantes geoquímicamente dado que constituyen biomarcadores relevantes. Los *esteroides* como el colesterol o los esteroides vegetales, pertenecen a ésta familia molecular. En coníferas, los triterpenos son poco comunes, siendo identificados sólo en algunas especies de Pináceas, en *Criptomerias* y algunas especies de *Podocarpus*. Sin embargo, en angiospermas, metazoos, hongos, bacterias y algas son muy frecuentes.

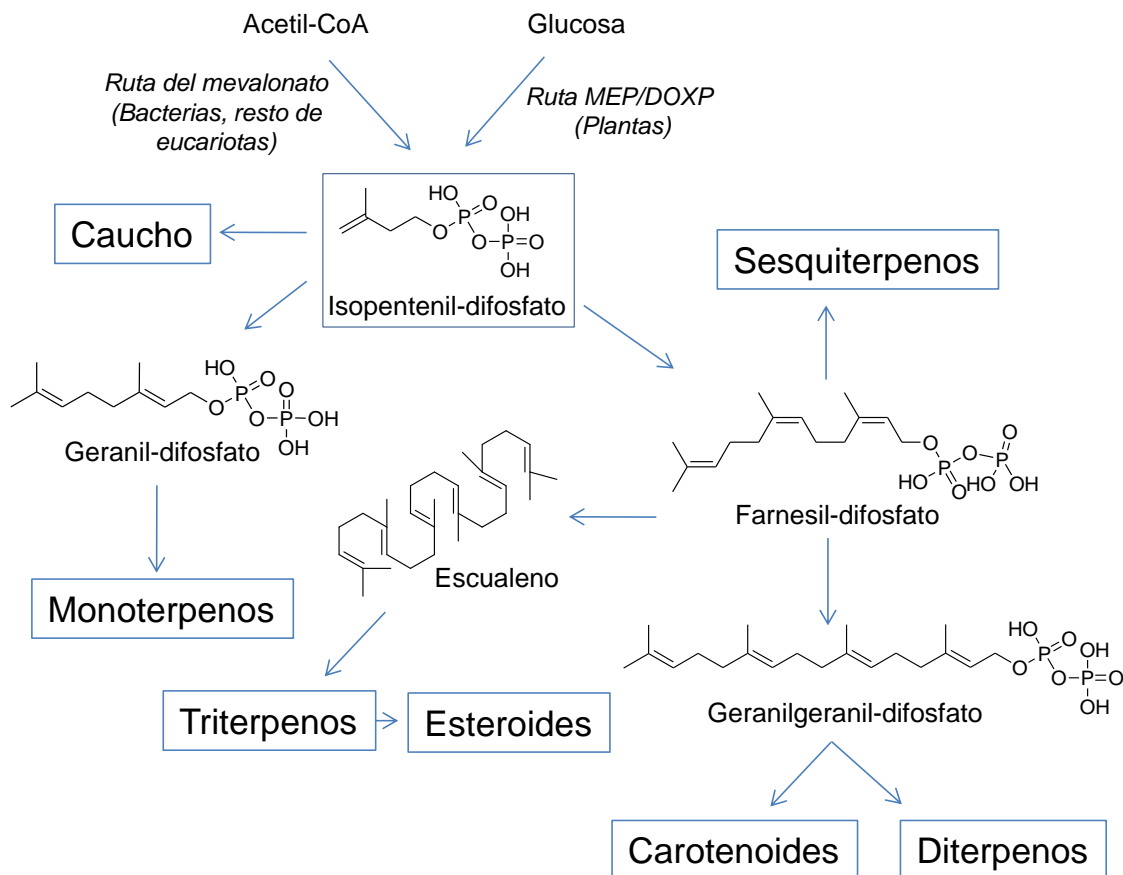


Fig. 5.- Esquema general de la bioquímica del isopreno, con las principales rutas metabólicas diferenciadas (flechas azules) que conducen a las diferentes familias de terpenoides o isoprenoides.

Globalmente, las resinas de coníferas están constituidas fundamentalmente por una mezcla de diterpenos bi y tricíclicos, mono y sesquiterpenos y ocasionalmente, triterpenos (Otto y Wilde, 2001) sintetizados biológicamente por polimerización directa a partir de un derivado de isopreno, el isopentenil difosfato (Fig. 5).

Aunque las coníferas sintetizan una enorme variedad de terpenos, con más de 7500 estructuras moleculares bien definidas cuyas

rutas bioquímicas están lejos de ser elucidadas, se conocen relativamente bien las rutas principales que conducen a los principales terpenos vegetales (Fig. 5). El isopentenil difosfato es producido en plantas por dos vías: a partir de 1-desoxy-D-xilulosa en el cloroplasto, para producir mono y diterpenoides (ruta MEP/DOXP) y a partir de acetil coenzima A en el citosol, para producir sesquiterpenoides por la vía del mevalonato. El resto de eucariotas y bacterias no expresan la vía MEP/DOPX, lo que expresa la gran diferencia existente entre las

"Avances en el Investigación de la Cueva El Soplao y su entorno"

composiciones de terpenoides de plantas superiores y otros organismos. Desde un punto de vista quimiotaxonomico de coníferas nos interesan principalmente los sesquiterpenos y diterpenos. En coníferas, los triterpenos

constituyen una contribución menor desde el punto de vista cuantitativo y, dado que no se han hallado en las muestras de ámbar objeto de este estudio, no los consideraremos en este artículo.

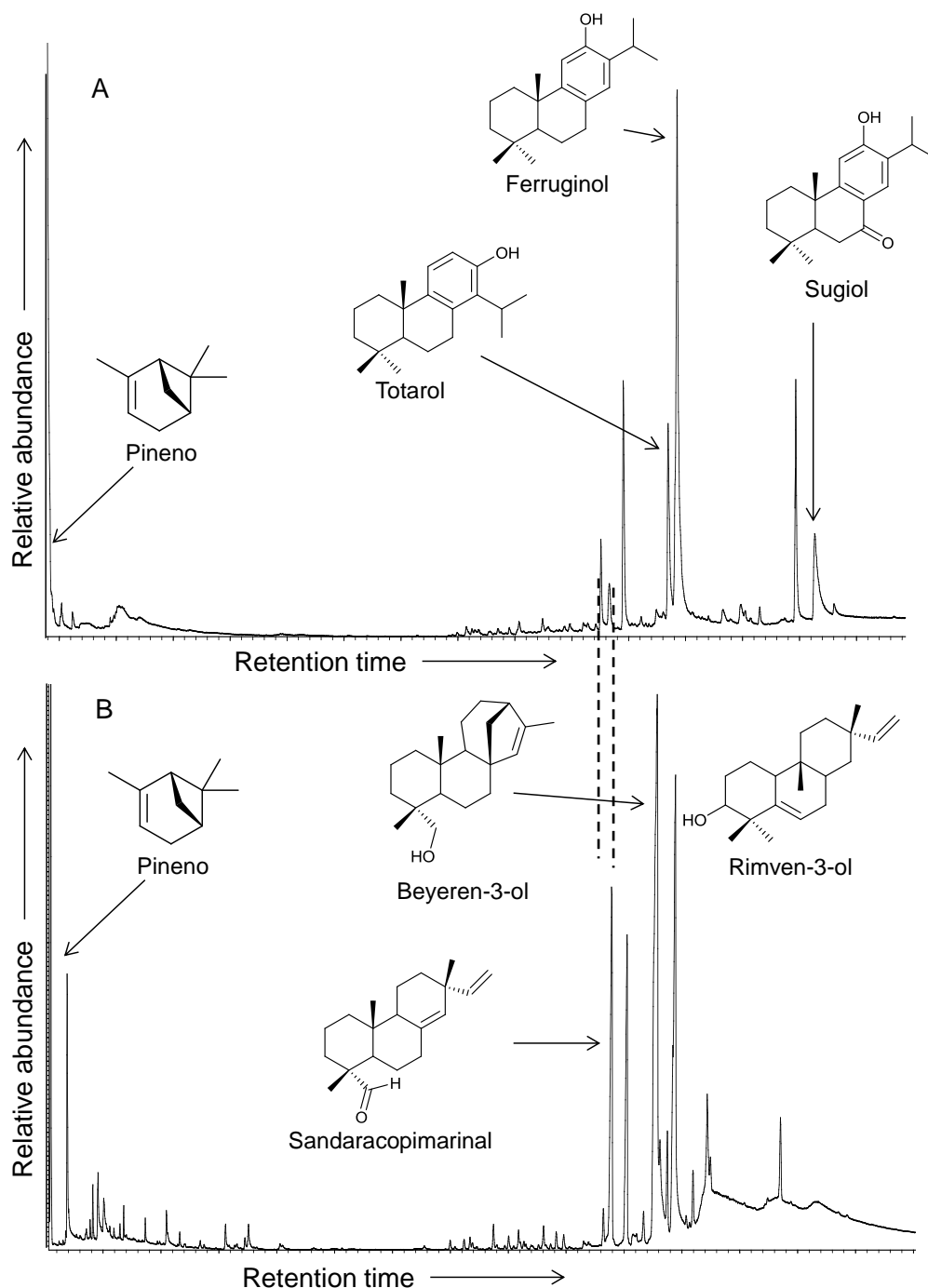


Fig. 6.- A: Perfil cromatográfico (GC-MS) de los componentes mayores de la resina de cedro blanco (*Cupressus lusitanica*, excluyendo ácidos). B: Perfil cromatográfico de los componentes mayores de la resina de kauri (*Agathis australis*, excluyendo ácidos). Las líneas punteadas indican componentes diterpénicos comunes en ambas resinas: un derivado del kaurano y un pimarano.

Hay que advertir aquí que el estudio quimiotaxonómico esta aun en una fase muy temprana de desarrollo, por lo que los conocimientos son limitados y con el tiempo muchas moléculas verán disminuida su relevancia como biomarcadores, en tanto que aparecerán otras específicas. En cualquier caso, el estudio detallado de las composiciones de resinas actuales constituye una herramienta sumamente útil para la interpretación de los datos composicionales del ámbar. Esta herramienta es bidireccional: los datos contenidos en el ámbar pueden ayudar a reconstruir el árbol filogenético y trazar el proceso evolutivo que han seguido las coníferas.

Podemos considerar como ejemplo el caso del ferruginol, por su relevancia en el estudio del ámbar del norte de España. El ferruginol es un diterpeno fenólico muy abundante en las resinas de las familias *Cupressaceae* y *Podocarpaceae* (Fig. 6). Sin embargo, está ausente en las resinas de la familia *Araucariaceae* y, a pesar de datos publicados que indican que algunas especies de ésta familia pueden contenerlo, nuestro laboratorio no ha podido hallarlos en ninguna resina de *Araucaria* o *Agathis* analizada. Así, en resinas se considera que el ferruginol es un biomarcador específico. Por otro lado, la presencia de diterpenos de la familia del kaurano se ha considerado tradicionalmente como indicativa de la familia *Araucariaceae*, al no estar presentes en otras familias de coníferas. Esta apreciación es incorrecta, ya que los kauranos se hallan también, aunque en cantidades inferiores, en las resinas de *Cupressaceae* y *Podocarpaceae* así como en algunas *Pináceas*.

Sin embargo, esta información, obtenida del análisis del fenotipo de coníferas actuales, ¿es extrapolable al Cretácico? Es decir, ¿la presencia significativa de ferruginol en un ámbar y la ausencia o presencia muy minoritaria de kauranos implica que la fuente botánica no puede considerarse *Araucariaceae*? Si tenemos en cuenta que las *Podocarpaceae*, en cuyas resinas es frecuente hallar ferruginol, y *Araucariaceae* eran monofiléticas, tal vez nos encontrásemos ante una especie extinta perteneciente a la familia *Araucariaceae* cuya vía metabólica de síntesis de ferruginol estuviera activa. Por tanto, si bien la composición de las resinas actuales puede ser una orientación importante en el estudio del ámbar, las respuestas obtenidas no pueden considerarse definitivas.

GEOQUÍMICA ORGÁNICA DE LOS TERPENOS DE CONÍFERAS

Podemos definir la *diagénesis* como todos los procesos químicos, bioquímicos, químico-físicos y estructurales que tienen lugar en los componentes, tanto minerales como orgánicos, de un sedimento durante el periodo de consolidación a roca sedimentaria. La diagénesis tiene lugar a presiones y temperaturas bajas desde el punto de vista geológico. Con el incremento de presión y temperatura, la diagénesis va terminando gradualmente, dando lugar a los procesos de metamorfismo.

Durante la diagénesis, en el sentido de aplicación del término al ámbito de la geoquímica orgánica, las resinas de coníferas depositadas en el sedimento (suelo) se transforman gradualmente en el ámbar. La composición del ámbar resultante difiere de la resina original, generándose unos compuestos característicos que denominamos *geoterpenos*, para diferenciarlos de los *bioterpenos* o *productos naturales* (*natural products*) en la literatura en inglés, que constituyen sus antecesores biológicos. La correlación entre los geoterpenos y sus precursores constituye un problema complejo, debido a que un mismo geoterpeno puede proceder de diversos precursores, a la pérdida de información que tiene lugar en la molécula durante su degradación y sobre todo a la falta de información quimiotaxonómica.

Un ejemplo que ilustra este proceso es la formación del cadaleno, un importante biomarcador de plantas terrestres, y otras moléculas relacionadas, a partir de sesquiterpenos de la familia del cadineno (Fig. 7).

La correlación entre los geoterpenos presentes en el ámbar y sus precursores se basa en el conocimiento preciso de la composición molecular de las resinas de árboles actuales. En el momento en el que un geoterpeno es vinculado inequívocamente a un precursor biológico hallado en una muestra actual, el geoterpeno se convierte en un *fósil molecular* o *biomarcador* específico de la especie que sintetizó el precursor. Esto ocurre muy pocas veces, con lo cual la mayor parte de los geoterpenos son biomarcadores poco específicos de coníferas o inespecíficos de plantas superiores en general.

A este problema hay que añadir el hecho de que existen geoterpenos derivados de géneros vegetales extintos, cuya bioquímica es desconocida, con lo que no se pueden vincular

a un origen claro. En este problema, el ámbar constituye un elemento de gran valor, ya que en su estructura conserva biomoléculas que, una vez vinculadas con su origen biológico con ayuda del estudio de los fósiles asociados y las inclusiones, nos permite conocer las rutas biosintéticas activas en la planta original. Así, el estudio de la composición del ámbar puede aportar datos importantes a la paleobotánica y la filogenia.

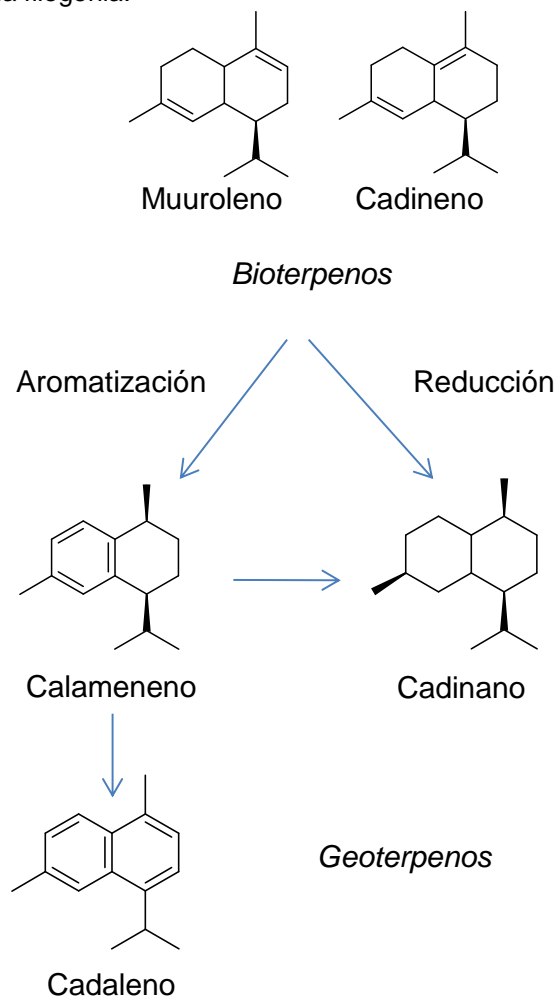


Fig. 7.- Formación de geoterpenos derivados de sesquiterpenos vegetales por diagénesis reductiva y oxidativa (aromatización).

Otro factor esencial en la correlación de una resina fósil con su precursor biológico es el conocimiento de todos los procesos químicos

que pueden tener lugar en el periodo de diagénesis. Estos procesos químicos incluyen reacciones redox y de desproporción (Otto et al., 2007), pérdida de ramificaciones y de dobles enlaces en medios anaeróbicos (Simoneit et al., 1986), ciclaciones, rupturas y aromatizaciones en medios aeróbicos, alteraciones químicas debidas a degradación bacteriana o presencia de ciertos minerales y combinaciones de todos los factores citados (Tavendale et al., 1997), que conducen en general a mezclas de productos muy complejas que dificultan la identificación y la obtención de conclusiones en cuanto al origen de las moléculas encontradas.

La diagénesis de los diterpenos derivados del labdano es de especial relevancia en el ámbar. Uno de los primeros pasos que tienen lugar tras la deposición es la polimerización de los derivados del labdano (Fig. 8), que conduce a la formación de un copolímero de diversos labdanoides (ácido comúnic, biformeno, esclareno) con otros componentes presentes en la resina, como estireno o cadineno. La gran mayoría de los ámbares encontrados a nivel mundial tienen como estructura fundamental este copolímero de labdano, estructura que le confiere su dureza y características que motivan su uso ornamental. La alteración del polilabdano durante la diagénesis da lugar a componentes de menor peso molecular que son característicos de este tipo de ámbar. Los más importantes son: el alfa-ioneno y derivados con estructura terpenoide de 14 a 19 carbonos, considerados un indicador de este tipo de polímero. En conjunto, la degradación de la superestructura del ámbar da lugar a una amplia serie de derivados del naftaleno y la tetralina, que constituyen la fracción mayoritaria de los extractos orgánicos del ámbar (Otto y Simoneit, 2002). La composición y abundancias relativas de los productos bicíclicos de 14 y 15 carbonos y de derivados bicíclicos completamente aromatizados (naftaleno y tetralinas) son de importancia para conocer el grado de maduración del ámbar (Lambert et al., 1993).

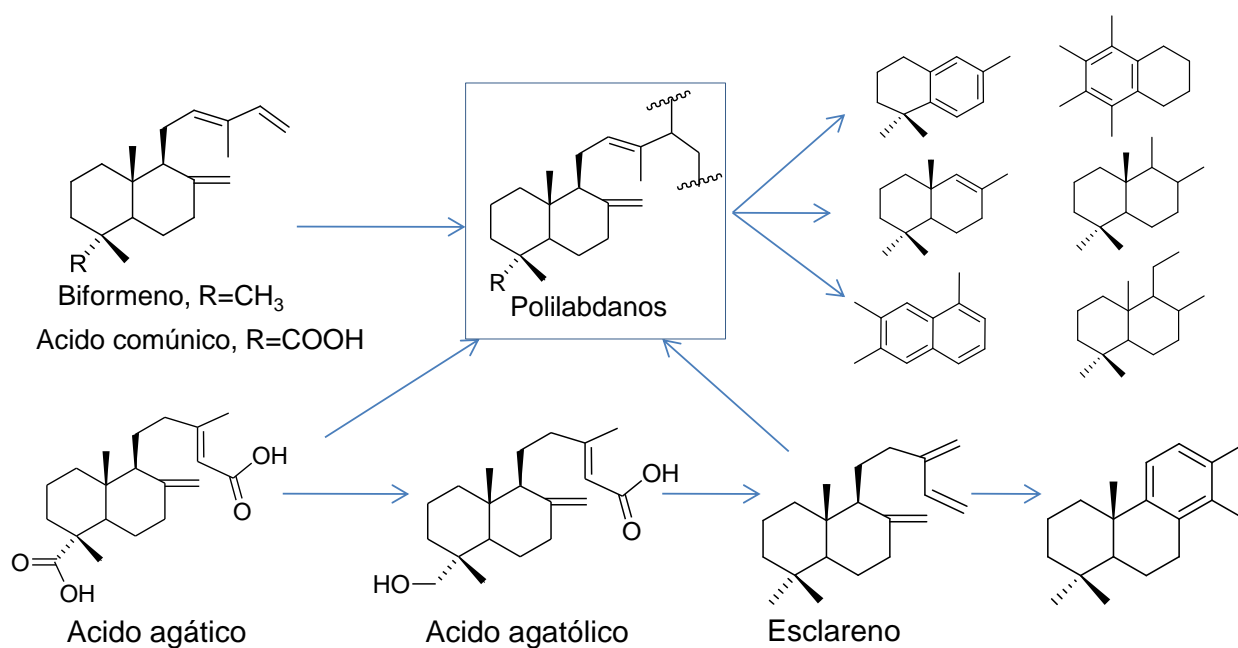


Fig. 8.- Diagénesis de los principales labdanos de resinas. La polimerización para dar lugar a un material polimérico compuesto, que implica el curado y endurecimiento de la resina, es el paso fundamental en la formación del ámbar. La alteración y ruptura de estas estructuras conduce a una completa colección de moléculas basadas en el naftaleno y tetralina. Todas las estructuras mostradas han sido halladas en el ámbar de El Soplao.

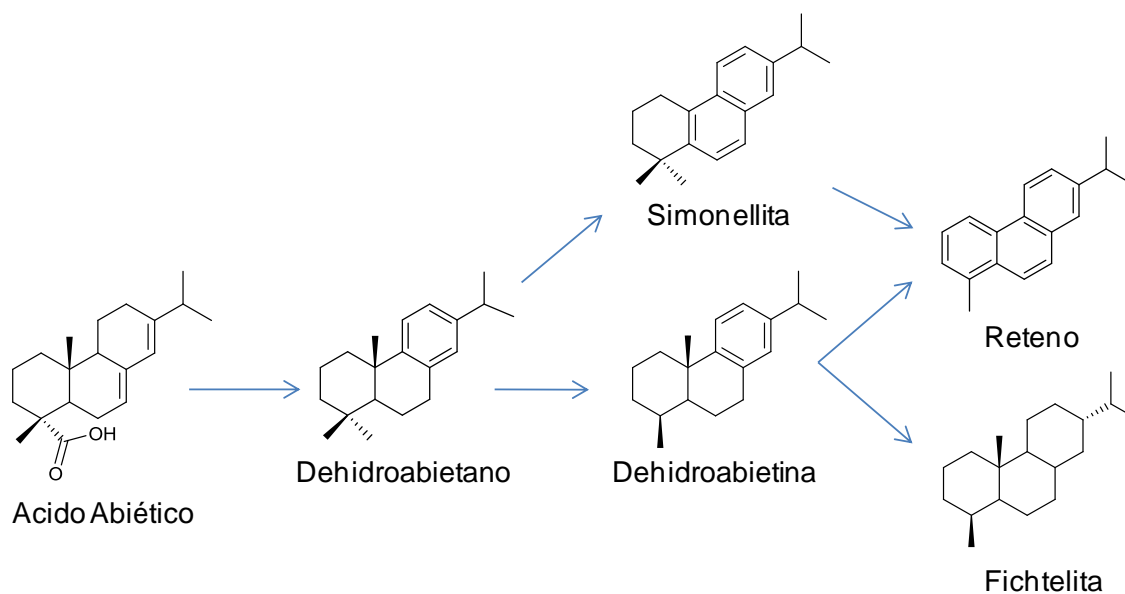


Fig. 9.- Esquema general de la diagénesis de diterpenos de la familia del abietano, que conduce a la formación de moléculas de gran importancia en geoquímica orgánica. En fuentes muy ricas en abietanos, como las resinas de Pináceas, donde el ácido abiético es dominante, la acumulación de sus geoterpenos derivados llega a ser muy significativa, como en el caso de la madera fósil del Holoceno en Fichtelgebirge (Alemania), donde la fichtelita alcanzó el estatus de especie mineral.

La diagénesis de los diterpenos tricíclicos derivados del abietano conduce a una serie de componentes comunes en los que se retiene el esqueleto original. Las principales reacciones diagenéticas de estos bioterpenos implican desfuncionalizaciones como son la descarboxilación, pérdida de hidroxilo, la desmetilación y las aromatizaciones (Fig. 9). La descarboxilación y la pérdida de hidroxilo da lugar a uno de los principales geoterpenoides, considerado biomarcador de coníferas: el dehidroabietano. La desmetilación del dehidroabietano conduce a la dehidroabietina. Estas dos moléculas pueden evolucionar en medios oxidativos a simonellita y al derivado completamente aromatizado, el retero. En medios anóxicos y reductores, o por reacción de desproporción, por el contrario, es más relevante la formación de los derivados completamente saturados, como el norabietano o la fichtelita. No obstante, estos procesos nunca tienen lugar aislados, sino que a lo largo de la maduración del ámbar, se suceden diversas fases oxidativas o reductoras, que conducen a una mezcla de componentes con diversos grados de aromatización (Otto y Simoneit, 2002), si bien en el ámbar es más frecuente encontrar las formas reducidas, como la dehidroabietina, en tanto que en sedimentos u otros restos fósiles, es más habitual encontrar las formas aromatizadas, como el retero, un biomarcador clásico de gimnospermas muy utilizado en petróleos para el cálculo de la contribución de materia orgánica de origen terrígeno. Un caso particularmente importante de estas vías de alteración diagenética es el de la formación de fichtelita en grandes cantidades en el bosque fosilizado de Fichtelgebirge (Bavaria, Alemania), en el que la madera de Pináceas, cuya resina está formada básicamente por ácido abietico, en un ambiente extremadamente reductor, condujo a la acumulación de masas de fichtelita, en lugar de la formación de ámbar.

Un caso particular importante en el estudio de los ámbares del Cretácico es el ferruginol, que, como hemos visto, es un componente principal en la resina de las Cupresáceas. La estructura fenólica del ferruginol es especialmente resistente a la suave diagénesis que implica la formación del ámbar, por lo que éste bioterpeno, de estar en la resina original, se mantiene en cantidad significativa en la resina fósil resultante. Tan solo se observan procesos de aromatización, produciéndose una serie de derivados (Fig. 10), cuya determinación nos permite evaluar el contenido total original de ferruginol.

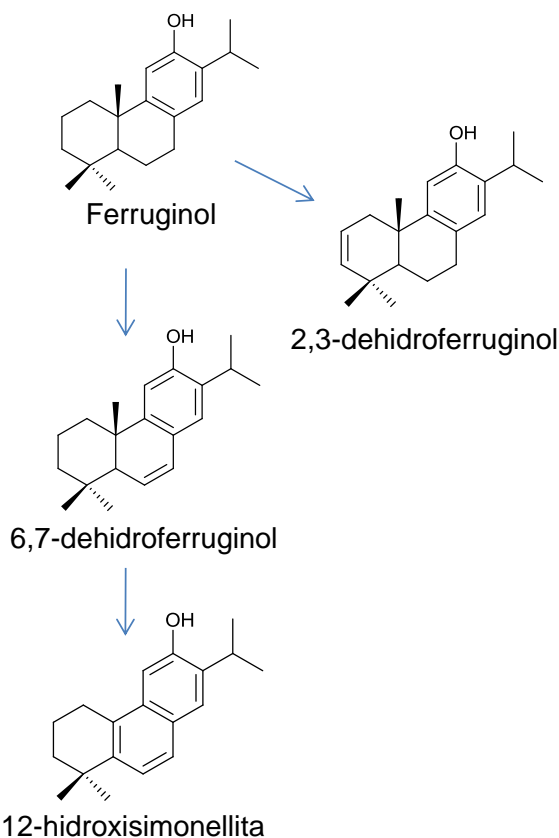


Fig. 10.- Ruta de alteración del bioterpeno ferruginol en el ámbar.

El estudio de la composición molecular del ámbar nos permite, por tanto, establecer modelos de alteración química por diagénesis, que ayudan a entender el origen de hidrocarburos presentes en materiales orgánicos geológicos. Un campo de estudio en desarrollo, motivado por la complejidad química del ámbar, es la *paleoquimiotaxonomía experimental*, que consiste en la simulación en laboratorio de los procesos de diagénesis que sufren los terpenos biológicos en el ámbar y los sedimentos, a fin de establecer correlaciones más precisas entre las complejas mezclas encontradas en el material geológico y los posibles materiales de origen.

COMPOSICIÓN DE LOS ÁMBARES CRETÁDICOS DEL NORTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA. GENERALIDADES.

Químicamente, el ámbar consta de dos fracciones fundamentales: una fracción macromolecular, polimérica, insoluble en disolventes orgánicos y una fracción extraíble en disolventes orgánicos y que constituye entre el 10 y el 30% del peso total. Esta fracción extraíble es muy compleja, ya que suele contener entre 600 y más de 2000 moléculas distintas, y su estudio e interpretación no están exentos de dificultades. Pero, como aspecto positivo, puede contener relictos de bioterpenos no modificados y, por tanto, nos puede aportar una información botánica directa.

El análisis de la estructura molecular permite la categorización de los ámbares en diversas clases (I a V, Anderson et al. 1992) según las características de los monómeros que componen la estructura macromolecular, presencia o ausencia de ácido succínico y el grado de polimerización. El análisis de la composición molecular de la fracción extraíble, compuesta como hemos explicado por geoterpenos y relictos de bioterpenos, proporciona información específica del ámbar de cada yacimiento y permite evaluarlo como biomarcador en el estudio de la paleosistemática, quimiotaxonomía y filogenia, además de permitirnos mejorar nuestro conocimiento de los procesos químicos que sufren las moléculas biológicas en el ambiente geológico.

De modo general, los ámbares cretácicos del norte de la Península Ibérica, cuyos yacimientos se extienden formando una faja que abarca desde la depresión Centro-Asturiana en el extremo occidental hasta la Cuenca del Maestrat, en el extremo oriental (Delclòs et al. 2007; Alonso et al., 2000), los podemos clasificar según su composición en dos grandes tipos:

Tipo I

Contiene, en su fracción diterpénica, como componente mayoritario el 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-trieno, además de cantidades significativas de dehidroabietina y ferruginol. Es rico en terpenos de la familia del labdano y el pimarano.

El componente principal de éste tipo es un geoterpeno posiblemente derivado por diagénesis de los ácidos pimáricos, también presentes en el ámbar, (Fig. 11). Esta ruta diagénética ha quedado claramente establecida a partir del estudio en profundidad del ámbar de El Soplao, un ámbar del tipo I.

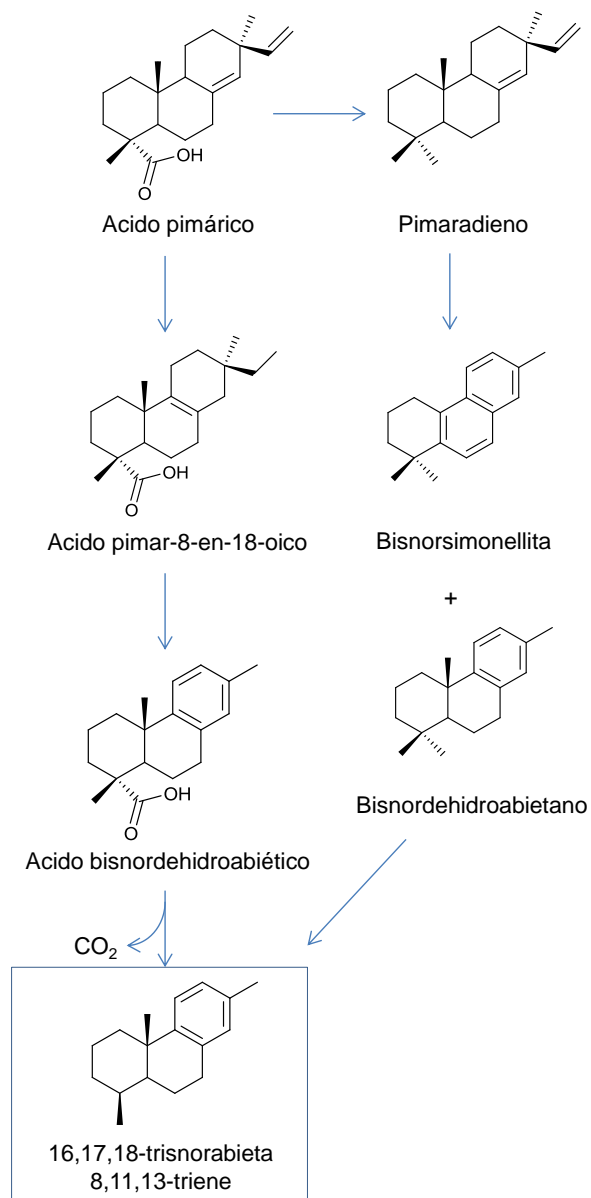


Fig. 11.- Ruta de diagénesis de los ácidos pimáricos (pimárico e isopimárico, no mostrado) para formar el compuesto mayoritario en el extracto de los ámbares del primer tipo. Todas las moléculas mostradas han sido halladas en el ámbar de El Soplao, lo que ha permitido esclarecer ésta ruta diagénética.

Tipo II

El segundo grupo carece o contiene cantidades muy pequeñas de dehidroabietina y otros terpenos de la familia de los abietanos, carece o contiene una proporción inferior de ferruginol y contiene proporciones muy bajas de pimaranos. La molécula dominante en este grupo es el hidrocarburo *ambereno* (1,6-dimetil-5-isopentil tetralina) descrito por primera vez por nuestro laboratorio gracias al estudio de la composición del ámbar de El Soplao. Este hidrocarburo puede provenir de la alteración de labdanos o bien de la diagénesis de algunas moléculas relacionadas con los clerodanos, como el ácido kolavénico. Esta posibilidad está motivada por la presencia significativa de clerodanos en este tipo de ámbar, concretamente de 15,20-bisnorkolavano y 15,20-bisnorkolav-3-eno y la relación directa entre la proporción de éstos y la de ambereno. Los kolavanos, así como ambereno, también están presentes en los ámbares del tipo I, pero en una proporción inferior respecto de los pimaranos/abietanos. El ámbar de tipo II presenta una cantidad importante de un hidrocarburo de la familia del adamantano cuya estructura no ha sido elucidada todavía, y de un xilil-alcano. Ambos constituyen un indicador específico y que es especialmente abundante en los ámbares de la zona oriental de la Cuenca Vasco Cantábrica y de la Cuenca del Maestrat.

La distribución de ambos grupos composicionales a lo largo de la faja de ámbar de la Península sigue una tendencia claramente definida: si bien los ámbares del primer tipo se concentran en la Cuenca Vasco-Cantábrica, restringiéndose, según nuestros estudios, a Cantabria, los del segundo tipo están más extendidos a lo largo de la faja de yacimientos de ámbar, siendo especialmente abundantes en la Formación Escucha. Es posible que el primer tipo composicional este asociado a árboles ligados a zonas costeras con un alto grado de transgresión marina, posiblemente adaptados a suelos inundados y con mayor salinidad, similares a los actuales manglares.

Estos datos abren una perspectiva paleobotánica muy interesante debido a dos motivos:

Primero, en plantas modernas, nuestro laboratorio ha localizado los clerodanos, incluyendo el ácido kolavénico, por primera vez en resinas del género *Araucaria*, pudiendo constituir un biomarcador específico de ésta familia. En algunas especies de *Araucaria*, como *Araucaria bidwillii*, los ácidos kolavénico e isokolavénico son componentes principales de la resina, junto con los ácidos labdanoicos (copálico, agático, comúnico) y los abietanos, siendo los kauranos muy minoritarios o inexistentes, a diferencia del género *Agathis*.

Segundo, los datos analíticos de los ámbares Cretácicos del norte de la Península Ibérica indican que tienen al menos dos fuentes botánicas diferenciadas. Como hemos visto, las resinas del tipo II muestran una clara relación con las modernas coníferas del género *Araucaria*. Las resinas del tipo I, caracterizadas por la riqueza en abietanos, pimaranos, presencia de ferruginol y ambereno, constituye un caso único que apunta a una resina original distinta composicionalmente a las resinas de coníferas actuales, siendo las más próximas las de las familias Cupresáceas y Podocarpáceas, aunque sin un equivalente actual definido.

La idea de una resina original distinta de las resinas actuales, posiblemente perteneciente a una especie extinta, se fortalece por el hecho de que en ámbares post-cenomanienses de la Península Ibérica, como es el caso del ámbar turoniense de Soto del Real (Madrid), tanto el ambereno como los clerodanos derivados del kolavano desaparecen, indicando un cambio paleobotánico importante.

El estudio detallado de la resina fósil de El Soplao-Rábago, como modelo de este tipo de resina perteneciente a una especie no correlacionable con familias modernas de coníferas, así como el estudio de la composición molecular de fósiles vegetales asociados, apoya la idea de que podemos estar ante la resina de una familia extinta de coníferas cuyos equivalentes modernos más próximos son las familias de Cupresáceas y Podocarpáceas. La presencia de abundantes restos fósiles de *Frenelopsis*, un género de la extinta familia de coníferas *Cheirolepidiaceae* sugiere la hipótesis de que los ámbares del tipo I pueden ser resinas fósiles de ésta familia.

Yacimiento	Tipo	Terpenos extraíbles principales
El Soplao-Rábago (Cantabria)	I	Trisnorabietatrienos, ambereno, dehidroabietano, dehidroabietina, ferruginol, ácidos pimáricos.
Peñacerrada (alava)	II	Ambereno, kolavanos, ácidos labdanoicos
Sant Just (Teruel)	II	Ambereno, kolavanos, ácidos labdanoicos
Fonfría (Cantabria)	II	Ambereno, kolavanos, ácidos labdanoicos
Cuchía (Cantabria)	II	Ambereno, kolavanos, ácidos labdanoicos
Oreña (Cantabria)	I*	1,5,8-trimetiltetralina, trisnorabietatrienos, ambereno, ácido bisnordehidroabiético, ferruginol.
El Caleyú (Asturias)	II	Ambereno, ácidos labdanoicos.
Reocín (Cantabria)	II	Ambereno, kolavanos, ácidos labdanoicos
Ruiloba (Cantabria)	I	Trisnorabietatrienos, dehidroabietano, dehidroabietina, ambereno, ferruginol, ácidos pimáricos.

Tabla 1.- Clasificación de algunos ámbares cretácicos del norte de la Península Ibérica en función de sus componentes principales. El ámbar de Oreña (indicado con un asterisco) aunque pertenece al primer grupo, muestra una historia diagenética distinta revelada por sus productos de degradación, tal vez por circunstancias particulares del yacimiento.

METODOLOGÍA ANALÍTICA.

El análisis de la composición molecular del ámbar se lleva a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para ello se realiza una extracción con disolventes orgánicos (diclorometano/metanol) del ámbar, cuidadosamente seleccionado para que se encuentre libre de inclusiones que puedan añadir componentes ajenos a la resina y pulverizado. El extracto obtenido (Fig. 12) se analiza para obtener los componentes mayoritarios y, posteriormente, se somete a un complejo y laborioso proceso de separación en fracciones, obteniéndose inicialmente una fracción apolar formada por hidrocarburos y dos fracciones polares, una conteniendo compuestos fenólicos y otra formada por compuestos ácidos y que presentan el mayor interés, al contener los relictos de bioterpenos originales no alterados. La purificación de ferruginol, ambereno y 12-hidroxisimonellita mediante HPLC a partir de estas fracciones ha permitido confirmar estructuralmente éstas moléculas, subrayando la importancia de los terpenos fenólicos como indicadores paleobotánicos en el ámbar de El Soplao. Las fracciones polares se analizan mediante GC-MS

tras la transformación de los grupos alcohólicos y ácidos en sus derivados trimetil-sililados.



Fig. 12.- Extracto crudo del ámbar de El Soplao. Este material, un aceite viscoso de agradable olor resinoso con un toque alquitranado, está formado por una mezcla compleja de terpenos y constituye el 16% del peso total del ámbar de este yacimiento.

COMPOSICIÓN Y QUIMIOTAXONOMÍA DEL ÁMBAR DE EL SOPLAO

El ámbar de El Soplao-Rábago presenta unas características únicas dentro de los ámbares cretácicos del norte de España. Afortunadamente, la gran abundancia, preservación y extraordinaria calidad de las muestras encontradas en el yacimiento han permitido el estudio profundo de su composición química, resultando ser definitorio de un tipo bien diferenciado desde un punto de vista químico y paleobotánico.

El extracto del ámbar de El Soplao contiene algo más de 1200 especies moleculares, de las cuales 75 constituyen el 95% del peso total. El componente mayoritario es el 16,17,18-trisnorabieta-8-11-13-trieno, que constituye un 8% del peso total del extracto (Fig. 13). Este compuesto, junto con ambereno, dehidroabietano, dehidroabietina, ferruginol y ácidos labdanoicos constituyen el 26% del total. Otro porcentaje similar se corresponde con hidrocarburos derivados de naftaleno y tetralina, de escaso valor taxonómico, procedentes de la ruptura de la estructura del ámbar. Estos componentes confieren olor característico y fluorescencia intensa al ámbar y dan una idea de la maduración térmica del ámbar: mayor contenido de hidrocarburos ligeros se asocia con mayor maduración térmica. Sin embargo, este tipo de hidrocarburos no explican la peculiar coloración azul del ámbar de El Soplao, color especialmente intenso bajo la luz solar. Esta coloración podría deberse a hidrocarburos derivados del azuleno, como el chamazuleno, de intenso color azul violáceo, especialmente bajo la luz solar, presentes en el ámbar. Sin embargo no podemos descartar que se trate de un efecto físico. La coloración azul del ámbar de El Soplao es fotosensible, decayendo rápidamente con el tiempo y la exposición al sol. En general, los datos moleculares confirman que el ámbar de El Soplao procede de una conífera, cuya resina original estaba dominada por abietanos ácidos y fenólicos, ácidos pimáricos y ácidos labdánicos, siendo los equivalentes modernos más próximos las resinas de Cupresáceas y Podocarpaceas.

Bioterpenos del ámbar de El Soplao

El análisis de la fracción polar del extracto de ámbar muestra una serie de bioterpenos no transformados por diagénesis, que pueden

aportar pistas importantes desde el punto de vista paleobotánico. Posiblemente, el más importante de éste tipo sea el ferruginol. Este se presenta inalterado, junto con la 12-hidroxisimonellita e isómeros del dehidroferruginol, un producto de oxidación habitual de aquel (Otto y Simoneit, 2001) sugieren que la concentración original de abietanos fenólicos debió ser elevada.

Más reveladora aún que la presencia de ferruginol es la purificación de éste compuesto a partir del extracto de ámbar (Fig. 14A). En efecto, al aislar y purificar la fracción de abietanos fenólicos presentes en el ámbar, el ferruginol se aísla junto con su isómero totarol, de características químicas similares y que pasa desapercibido en el análisis del extracto total. El totarol se considera un biomarcador específico de árboles actuales de las familias Cupressaceae y Podocarpaceae, aunque esté presente en cantidades a nivel de traza (Stefanova y Simoneit, 2008). Teniendo en cuenta que el ámbar está asociado a abundantes fósiles de *Frenelopsis*, conífera de la extinta familia *Cheirolepidiaceae*, y dado que ha quedado claro que el ámbar de El Soplao, del tipo composicional I, procede de una fuente botánica distinta de los ámbares del tipo II, más comunes, toma forma la hipótesis de que éste ámbar puede constituir una prueba de que las coníferas extintas del género *Frenelopsis* expresaron vías biosintéticas similares a las actuales Cupressaceae y Podocarpaceae.

La fracción ácida del extracto del ámbar de El Soplao (Fig. 14B) completa la información contenida en forma de bioterpenos preservados y sus productos de alteración más inmediatos. Esta fracción está compuesta fundamentalmente por ácidos de la familia de los labdanos, incluyendo varios isómeros del ácido agático, ácido agatólico y ácido dihidroagatólico. Estos ácidos, muy en especial éste último, identificado por vez primera por nuestro laboratorio, son abundantes en las resinas de las actuales Cupresáceas. Hasta la fecha no hemos hallado el ácido dihidroagatólico en resinas de otras familias de coníferas. La polimerización de éstos ácidos y otras moléculas altamente insaturadas, un proceso que tiene lugar durante los primeros 0.1-10 millones de años tras la deposición de la resina, conlleva la formación del ámbar a partir del *copal*, resina de conífera no fosilizada hallada en entornos geológicos.

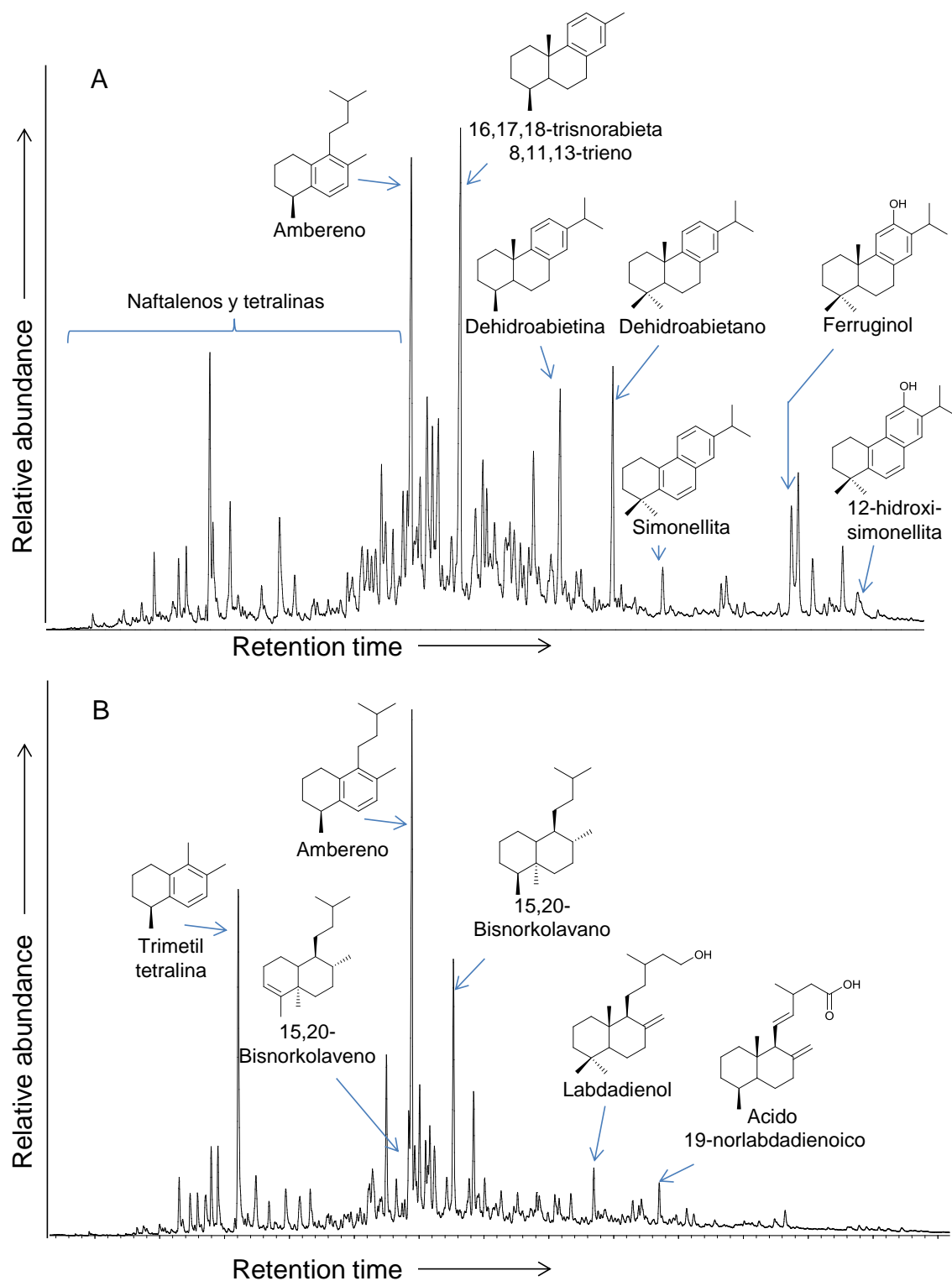


Fig. 13.- Perfil cromatográfico total del ámbar de El Soplao (A), mostrando sus componentes más relevantes. A fin de comparación, se muestra el perfil cromatográfico de un ámbar de tipo composicional II: el ámbar de la cantera de Cuchía, en Cantabria (B).

"Avances en el Investigación de la Cueva El Soplao y su entorno"

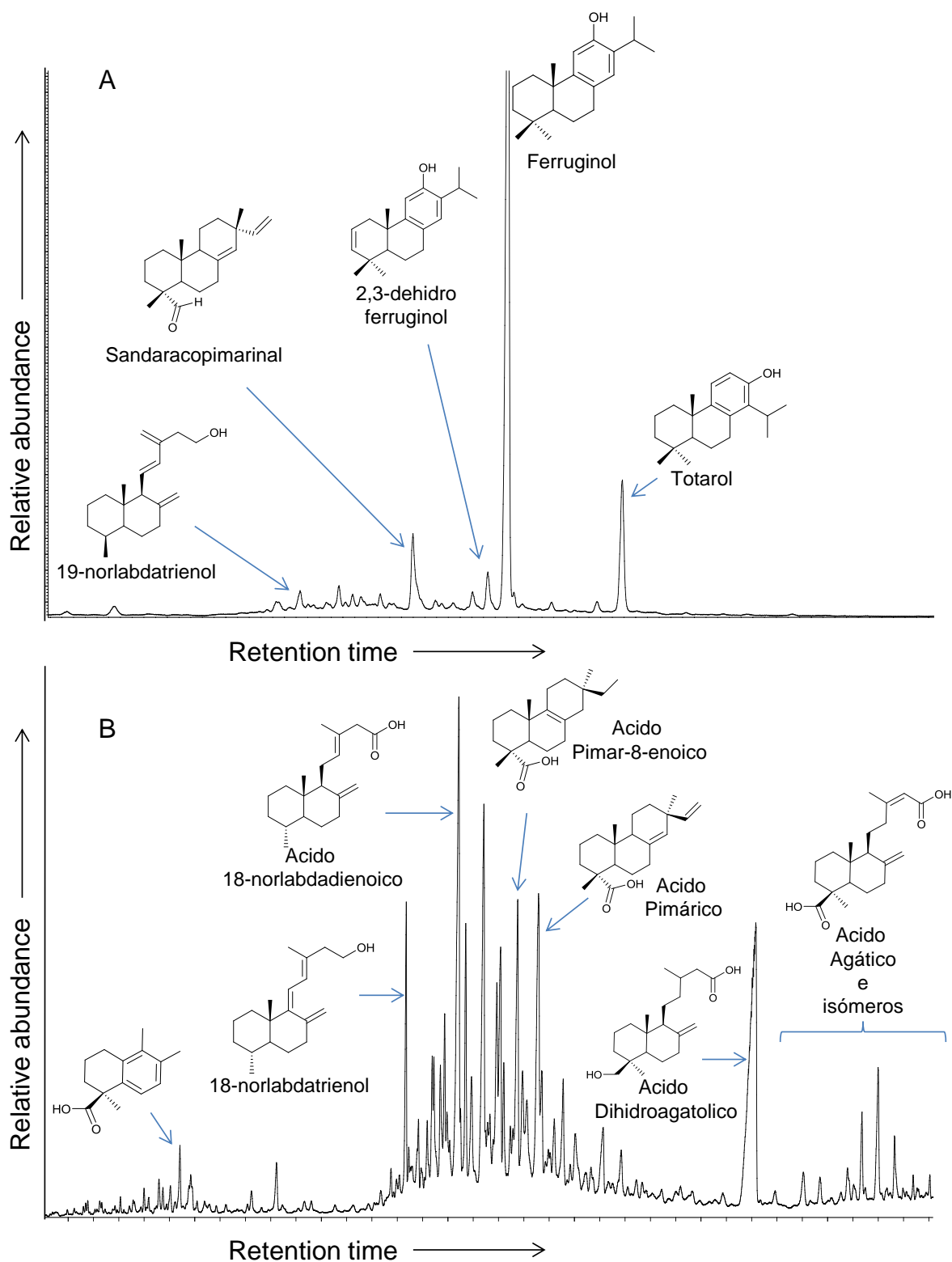


Fig. 13.- A: Perfil cromatográfico del producto de purificación parcial del ferruginol del ámbar de El Soplao, que muestra la presencia de totarol, entre otros compuestos oxigenados. B: Perfil cromatográfico de la fracción ácida del ámbar de El Soplao, que contiene ácidos preservados de la resina original junto con sus productos de alteración diagenética más inmediatos.

La falta de ácido abietico y dehidroabietico descarta la contribución por parte de árboles de la familia *Pinaceae*, en coherencia con el registro fósil. Sí que se han observado trazas de ácido callitrísico, un isómero de ácido abietico presente en algunas especies de Cupresáceas, en especial las de género *Callitris*. Los ácidos tricíclicos mayoritarios en la resina original que formó el ámbar de El Soplao eran el pimárico e isopimárico. Esto se puede deducir observando tanto la presencia de éstos ácidos, preservados sin transformar, como la de sus productos de alteración más inmediatos, como son los ácidos pimar-8-enoico e isopimar-8-enoico. La presencia de cantidades importantes de estos ácidos en la resina original es coherente con la idea de una conexión entre las vías biosintéticas de Cheirolepidiáceas y Cupresáceas, ya que los ácidos pimáricos son componentes importantes de éstas últimas.

Frenelopsis como progenitor fósil del ámbar de El Soplao.

Afortunadamente, el ámbar de El Soplao estaba acompañado por un abundante registro fósil con un grado de preservación muy elevado. Es inmediato entonces realizar un estudio detallado de la composición de los restos fósiles de la conífera *Frenelopsis* (Menor-Salván et al., 2010), de modo que se pueda establecer una relación directa con el ámbar del yacimiento. A pesar de que esperamos que la preservación de terpenos en las hojas y otro material vegetal fósil sea menor, la resinita presente en los restos puede haber preservado una representación molecular suficiente para dar un resultado positivo.

En efecto, el análisis de los restos fósiles de *Frenelopsis* indica que la materia orgánica extraíble, una vez separada la fracción de hidrocarburos saturados lineales por filtración a través de un tamiz molecular de zeolita, está formada fundamentalmente por azufre, procedente de la alteración de la gran cantidad de pirita del yacimiento, biomarcadores generales de plantas superiores y terpenos. A pesar de que los compuestos aromáticos son más dominantes en los restos vegetales que en el ámbar, donde prevalecen los procesos reductores, hay una identificación clara entre los biomarcadores observados en *Frenelopsis* y en el ámbar, siendo los terpenos mayoritarios el 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-trieno, la dehidroabietina, simonellitas, reteno y ferruginol.

Por tanto, existe una coherencia entre la composición molecular del ámbar de El Soplao y la de fósiles de *Frenelopsis* en el mismo

yacimiento. Parece acertado afirmar entonces que el ámbar de éste yacimiento constituye la primera descripción de una resina fósil de una familia de coníferas extinguida. A pesar de existir diferencias, no pudiendo considerarse equivalentes, los resultados analíticos sugieren que las coníferas *Cheirolepidiaceae* y las modernas Cupresáceas tienen en común algunas vías metabólicas fundamentales en la síntesis de sus resinas, como son la formación de abietanos fenólicos, ácidos agáticos y pimaranos.

Geoterpenos del ámbar de El Soplao.

Si nos centramos en la composición molecular correspondiente a los diterpenos de origen diagenético, el extracto orgánico del ámbar (Fig. 13A) está dominado por dos hidrocarburos: el ambereno y el 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-trieno. El origen del primero de ellos aún es objeto de estudio y puede provenir de los ácidos relacionados con el agático o bien, en una hipótesis que barajamos actualmente (Menor-Salván et al. 2014), pudiera provenir de la diagénesis del ácido kolavénico, presente en cantidad importante en algunas resinas actuales de los géneros *Araucaria*, *Pinus* y *Cupressus*. También es posible que se trate de un producto de ruptura de la estructura macromolecular del ámbar, junto con toda la colección de derivados del naftaleno y la tetralina.

El compuesto mayoritario, 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-trieno, parece claro que es un derivado diagenético relacionado con los ácidos pimáricos, como hemos explicado anteriormente (Fig. 11). En cualquier caso, el establecimiento de rutas diagenéticas no es una tarea sencilla, ya que superponiéndose con las reacciones esperadas de desfuncionalización y oxido-reducción, tenemos isomerizaciones y otras reacciones de difícil predicción que incrementan notablemente la composición final del ámbar. Por ello, el estudio de los geoterpenos tiene un valor taxonómico o paleobotánico limitado, excepto en los casos en los que el esqueleto hidrocarbonado del bioterpeno original se ha mantenido intacto y en los casos donde se puede establecer una correlación entre la materia orgánica a fin de averiguar fuentes biológicas comunes.

No obstante, sí que pueden encontrarse moléculas singulares en el registro de productos de diagénesis. Es el caso de los hidrocarburos relacionados con el azuleno, relativamente comunes en carbones. Se han encontrado cantidades significativas de guaiazuleno, camazuleno y 4,6,8-trimetilazuleno en los restos

fósiles. En cantidad menor, también se encuentran en el ámbar de El Soplao, pudiendo ser la causa de la coloración característica del mismo, para el cual se había propuesto en principio un origen basado en la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, como perileno, causante del color azulado en el ámbar dominicano (Bellani y Giulotto, 2005), pero que en el caso de El Soplao debemos descartar tras estudiar su espectro de fluorescencia. El origen de los derivados del azuleno en una resina de conífera no está claro, aunque podrían provenir de la alteración diagenética del guaieno y el guaiol, sesquiterpenoides presentes en las actuales *Cupressaceae* y *Pinaceae* (Otto y Wilde, 2001). Como ya comentamos anteriormente, no se puede descartar un origen físico para la coloración del ámbar de El Soplao. El ámbar pierde rápidamente su coloración por exposición a la luz solar y dado que su espectro de fluorescencia parece coherente con los naftalenos, mucho más abundantes, podemos considerar el origen de su particular coloración como una cuestión no cerrada.

Un aspecto importante de la composición de geoterpenos del ámbar es la estimación de su maduración térmica, procesos de alteración y otras circunstancias particulares del yacimiento. Por ejemplo, el contenido en derivados de naftaleno, se incrementa con la edad y maduración térmica. Tradicionalmente, un indicador *de campo* del grado de maduración siempre ha sido la fluorescencia. Una resina o copal carece o muestra una fluorescencia débil, en tanto que el ámbar muestra fluorescencia más intensa y pasando de todos verdosos o amarillentos al blanco azulado según se incrementa el grado de maduración. Los procesos oxidativos o de meteorización implican un aumento de compuestos con oxígeno y pérdida de moléculas ligeras. En cambio, los incendios abiertos durante o tras la deposición del ámbar incrementarían la cantidad de aromáticos, como reteno, simonellita e hidrocarburos policíclicos aromáticos.

En general, la interpretación de la composición molecular del ámbar debe considerarse un tema en desarrollo. El avance del nuevo campo de la paleotaxonomía molecular experimental, en el que con ayuda del laboratorio se podrán predecir las poblaciones moleculares derivadas por diagénesis y otros procesos naturales a partir diversas biomoléculas de partida, nos permitirá revisar y mejorar las conclusiones obtenidas a partir del análisis del ámbar.

CONCLUSIONES

El estudio de la composición molecular de los ámbares cretácicos del Norte de la Península Ibérica nos muestra que pueden clasificarse en dos grandes grupos composicionales, procedentes de resinas de coníferas de origen botánico diferente.

El primer grupo se caracteriza por la presencia de ferruginol y totarol, dominancia de ácidos pimáricos y sus derivados de diagénesis y de ácidos agáticos y sus derivados. Su origen es una conífera que no puede correlacionarse directamente con ninguna conífera actual, basándose únicamente en los datos quimiotaxonómicos.

El segundo grupo se caracteriza por contener el hidrocarburo *ambereno*, una nueva molécula descrita a partir de los ámbares de la Cuenca Vasco-Cantábrica, como componente principal, por la proporción inferior o ausencia de abietanos fenólicos, siendo los ácidos agáticos y sus derivados así como los derivados del kolaveno sus diterpenos más reseñables desde el punto de vista biológico. Su composición se correlaciona con las coníferas actuales del género *Araucaria*.

El ámbar de El Soplao se engloba en el primer tipo composicional. Una característica distintiva es la excelente preservación de bioterpenos procedentes de la resina original, siendo rico en ferruginol y otros compuestos fenólicos y en ácidos resínicos. El estudio de estos terpenos preservados muestra proximidad con las composiciones de resinas actuales de las familias de Cupresáceas y Podocarpáceas.

El estudio de la composición molecular de fósiles de *Frenelopsis*, asociados al ámbar en el yacimiento, sugieren que el ámbar de El Soplao puede ser resina fósil de éste género extinto de conífera. Así, el ámbar de El Soplao proporciona la primera descripción quimiotaxonómica de la extinta familia de coníferas *Cheirolepidiaceae* y el estudio detallado de su composición permite esclarecer las rutas diagenéticas de los diterpenos biológicos.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Bernd Simoneit, de la Oregon State University, quien me enseñó lo que necesitaba saber para estudiar la geoquímica orgánica del ámbar. Al Real Jardín Botánico de Madrid, sobre cuya colección de coníferas se ha estudiado la quimiotaxonomía de las resinas.

REFERENCIAS

- Alonso, J., Arillo, A., Barron, E., Carmelo Corral, J., Grimalt, J., Lopez, J.F., Lopez, R., Martinez-Delclòs, X., Ortuño, V., Peñalver, E., Trincao, P.R. (2000). A new fossil resin with biological inclusions in lower Cretaceous deposits from Alava (Northern Spain, Basque-Cantabrian basin). *Journal of Paleontology*, 74, 158-178.
- Anderson, K.B., Winans, R.E., Botto, R.E. (1992). The nature and fate of natural resins in the geosphere-II. Identification, classification, and nomenclature of resinites. *Organic Geochemistry*, 18, 829-841.
- Bellani, V., Giolotto, E., Linati, L., & Sacchi, D. (2005). Origin of the blue fluorescence in Dominican amber. *Journal of Applied Physics*, 97(1), 016101. doi:10.1063/1.1829395
- Cox, R.E., Yamamoto, S., Otto, A., Simoneit, B.R.T. (2008). Oxygenated di- and tricyclic diterpenoids of southern hemisphere conifers. *Biochemistry and Systematic Ecology* 35, 342-362.
- Delclòs, X., Arillo, A., Peñalver, E., Barrón, E., Soriano, C., Del Valle, R. L., Bernárdez, E., Corral, C., Ortuño, V. M. (2007). Fossiliferous amber deposits from the Cretaceous (Albian) of Spain. *Comptes Rendus Palevol*, 6, 135-149.
- DePaiva, J., Campello, S., Ferreira Fonseca, C.J., Chang, E. (1975). Terpenes of Podocarpus lambertius. *Phytochemistry* 14, 243-248.
- Hautevelle, Y., Michels, R., Malatre, F., Trouiller, A. (2006). Vascular plant biomarkers as proxies for palaeoflora and palaeoclimatic changes at the Dogger/Malm transition of the Paris Basin (France). *Organic Geochemistry*, 37, 620-625.
- Lambert, J.B., Johnson, S.C., Poinar, G.O., Frye, J.S. (1993). Nuclear magnetic resonance characterization of Cretaceous amber. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57, 141-155.
- Lambert, J.B., Santiago-Blay, J.A., Anderson, K.B. (2008). Chemical signatures of fossilized resins and recent plant exudates. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 2-11.
- Langenheim, J.H. (2003). *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany*, Timber Press, Portland (USA).
- Menor-Salván, C., Najarro, M., Velasco, F., Rosales, I., Tornos, F., Simoneit, B.R.T. (2010). Terpenoids in extracts of Lower Cretaceous ambers from the Basque-Cantabrian basin (El Soplao, Cantabria, Spain): Paleobotanomic aspects. *Organic Geochemistry*, 41, 1089-1103.
- Menor-Salván, C., Simoneit, B.R.T., Ruiz-Bermejo, M., Lin, H. (2014). Structural identification of 1,6-dimethyl-5-alkyltetralins, new labdane biomarker family from Cretaceous ambers. *Organic Geochemistry* En prensa.
- Najarro, M., Peñalver, E., Pérez de la Fuente, R., Menor-Salván, C., Barrón, E., Soriano, C., Rosales, I., López del Valle, R., Velasco, F., Tornos, F., Daviero-Gomez, V., Gomez, B., Delclòs, X. (2010). Review of the El Soplao Amber Outcrop, Early Cretaceous of Spain. *Acta Geologica Sinica*, 84, 801-818.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T. (2001). Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 3505-3527.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T. (2002). Biomarkers of Holocene buried conifer logs from Bella Coola and north Vancouver, British Columbia, Canada. *Organic Geochemistry*, 33, 1241-1251.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., Wilde, V. (2007). Terpenoids as chemosystematic markers in selected fossil and extant species of pine (Pinus, Pinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154, 129-140.
- Otto, A., Wilde, V. (2001). Sesqui-, Di- and Triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers-A review. *The Botanical Review*, 67, 141-238.
- Sargent-Bray, P., Anderson, K. (2008). The nature and fate of natural resins in the geosphere XIII: a probable pinaceous resin from the early Cretaceous (Barremian), Isle of Wight. *Geochemical Transactions*, 9, 3-8.
- Simoneit, B.R.T. (1986). Biological Markers in the Sedimentary Record. pp. 43-99. Elsevier, Amsterdam.
- Simoneit, B.R.T., Grimalt, J.O., Wang, T.G., Cox, R.E., Hatcher, P.G., Nissenbaum, A. (1986). Cyclic terpenoids of contemporary resinous plants detritus and of fossil woods, ambers and coals. *Organic Geochemistry*, 10, 877-889.
- Stefanova, M., Simoneit, B.R.T. (2008). Polar aromatic biomarkers of Miocene-aged Chukurovo resinite and implication of the *Taxodium dubium* progenitor macrofossil. *International Journal of Coal Geology*, 75, 166-174.

"Avances en el Investigación de la Cueva El Soplao y su entorno"

Tavendale, M.H., McFarlane, P.N., Mackie, K.L., Wilkins, A.L., Langdon, A.G. (1997). The fate of resin acids – 2. The fate of resin acids and resin acid derived neutral compounds in anaerobic sediments. *Chemosphere* 35, 2153-2166.