

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR DEL ACEITE ESENCIAL DE LAUREL DE CERA (*Morella pubescens*)

STUDY OF EXTRACTION CONDITIONS OF “LAUREL DE CERA” (*Morella pubescens*) ESSENTIAL OIL BY MEANS OF STEAM DISTILLATION

OSCAR ARANGO¹, ANDRES HURTADO², PATRICIA CASTILLO³, MONICA SANTACRUZ⁴

PALABRAS CLAVE:

laurel de cera, *Morella pubescens*,
aceite esencial, arrastre con vapor,
GC-MS.

KEYWORDS:

Laurel de Cera, *Morella pubescens*,
essential oil, steam distillation,
GC-MS.

RESUMEN

*El laurel de cera (*Morella pubescens*) es un árbol que por sus características resulta muy apropiado para el control de la erosión y cuyos frutos son utilizados por comunidades campesinas del sur de Colombia para la obtención de una cera que se emplea en el proceso de elaboración de la panela. En esta investigación se estudió el proceso de extracción del aceite esencial de las hojas del laurel de cera mediante la técnica de arrastre con vapor y su efecto sobre la composición de los metabolitos secundarios volátiles presentes en dicho aceite. Los factores estudiados en el proceso de extracción fueron el tamaño de partícula y el tiempo de extracción y las variables de respuesta consideradas fueron el área total del cromatograma (cuentas) como parámetro indicador de la concentración del aceite y el porcentaje relativo del componente mayoritario. Se determinó que tanto el tiempo como la interacción tiempo – tamaño de partícula tienen efectos significativos (valor de $P < 0,05$) sobre la concentración del aceite esencial y al incrementar el tiempo de extracción se observó un aumento significativo en el área del cromatograma para el componente mayoritario. Se realizó la identificación de los metabolitos secundarios volátiles presentes en el aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría*

Recibido para evaluación: 11 de agosto 2009. Aprobado para publicación: 28 de septiembre

1 Profesor Asistente. Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA). Pasto. Colombia. Oscar769@udenar.edu.co

2 Profesor Asociado. Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA). Pasto. Colombia. ahurtadob@hotmail.com

3 Estudiante. Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Pasto. Colombia. Prcs07@yahoo.es

4 Estudiante. Universidad de Nariño. Departamento de Química. Pasto. Colombia. moni_santacruz6@hotmail.com

de masas (GC-MS), encontrando como componentes mayoritarios *trans*-cariofileno (21,3%), α -selineno (10,7%), β -selineno (10,0%), *óxido de cariofileno* (4,8%), *selino-3,7(11)-dieno* (3,3%) y β -elemenona (2,6%). Las actividades biológicas de estos compuestos permiten pensar que el aceite esencial del laurel de cera podría ser de interés para las industrias farmacéutica y cosmética.

ABSTRACT

Because of its characteristics, the "Laurel de Cera" tree (*Morella pubescens*) proves to be very appropriate for the erosion control. Its fruits are employed as a means to obtain wax that is used in the process of making Panela by rural communities settled in the southern region of Colombia. The extraction process of essential oil from "Laurel de Cera" tree leaves through steam distillation and its effects over the composition of volatile secondary metabolites present were considered for the research. Particle size and extraction time were the studied factors. The chromatogram total area (counts) taken as the oil concentration indicator parameter and the relative percentage were the considered response variables. According to the previous information, it was possible to determine that the time as well as the interaction time – particle size have significant effects (P -value $< 0,05$) over the essential oil's concentration. It was also possible to observe a meaningful increment in the chromatogram's area for the majority component when the extraction time was increased. The identification of the volatile secondary metabolites present in the essential oil was carried out through a gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). Such procedure gave as results *trans* caryophyllene (23,3%), α -selinene (10,7%), β -selinene (10,0%) caryophyllene oxide (4,8%), selene-3,7(11)-diene (3,3%) and β -elemene (2,6%) as majority components. These compounds' biological activities allow thinking that the essential oil from the "Laurel de Cera" tree leaves could be of great interest for the pharmabusiness and the cosmetic industries.

INTRODUCCIÓN

El sector de productos naturales está en crecimiento a nivel mundial debido a que las preferencias de los consumidores están cambiando drásticamente a tal punto que los nichos de mercado dominados completamente por productos sintéticos empiezan a tener competencia de productos naturales [1]. Los aceites esenciales poseen bioactividades importantes tales como propiedades antifúngicas, antibacteriales y antioxidantes, por lo cual su extracción surge como una alternativa productiva viable para el aprovechamiento de plantas promisorias colombianas como el laurel de cera (*Morella pubescens* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) Wilbur), pero existen limitantes tales como la ausencia de tecnologías apropiadas y la falta de conocimientos para su obtención [2] [3]. El conocimiento y el control de las variables determinantes del proceso de extracción del aceite esencial, además de facilitar el aseguramiento

de la calidad, permiten ajustar la composición del aceite a los requerimientos del mercado, de manera que sea posible el ofrecimiento de diferentes versiones del mismo aceite esencial [4].

Morella pubescens, conocido por los nombres comunes de laurel, laurel de cera, olivo, olivo de cera, es un árbol que crece de manera natural cerca de los ríos, quebradas, en zonas erosionadas, taludes de carretera, pendientes abruptas, orillas de senderos y caminos y en periferias de los bosques. En algunos sitios alcanza alturas hasta de doce metros, además de Colombia, crece en Costa Rica, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia.

Al colonizar sustratos altamente degradados *Morella pubescens* se comporta como una especie pionera, modificando el terreno, contribuyendo al inicio de la sucesión vegetal y permitiendo el establecimiento de otras especies [5]. El sistema radicular extenso, la densidad

de la copa y la resistencia de las ramas a los fuertes vientos son las principales características morfológicas que presenta *M. pubescens* para ser usada con éxito en el control de la erosión [6].

Las comunidades campesinas de la zona norte del departamento de Nariño (Colombia) han extraído de forma tradicional y rudimentaria la cera de los frutos de *Morella pubescens* la cual se empleaba para la elaboración de velas en tiempos de la colonia [7] y en la actualidad se usa como clarificante y antiadherente en el proceso de fabricación de la panela.

Son pocas las investigaciones realizadas con relación a la extracción y composición de los aceites esenciales del laurel de cera a pesar del carácter aromático de sus hojas. Quijano y Pino analizaron la composición de aceite esencial de hojas de *Morella pubescens* obtenido por la técnica de destilación-extracción simultánea encontrando presencia de 1,8-cineol y otros compuestos terpénicos, así como distintos ésteres que otorgan la nota aromática de las hojas [8].

Una de las técnicas más utilizadas para la extracción de aceites esenciales es la destilación por arrastre con vapor, en la cual factores como el tamaño de partícula del material vegetal, el factor de empaquetamiento o densidad del lecho y el tiempo de extracción influyen en la composición y rendimiento de los aceites obtenidos. Li *et al.* estudiaron el efecto del tamaño de partícula y el tiempo de extracción en el rendimiento del aceite esencial de semillas de *Cuminum cyminum* y encontraron los mayores rendimientos cuando se trabajó con los menores tamaños de partícula y tiempos de extracción prolongados [9].

Leyva *et al.* consideraron importante el estudio del diámetro de partícula y su efecto en el rendimiento y composición química del aceite esencial de *zingiber officinale*, observando un incremento de los monoterpenos y un mayor rendimiento de la esencia cuando se usó el menor diámetro de partícula ($D_p = 1.67$ mm) [10].

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del tamaño de partícula y el tiempo de extracción sobre la

composición del aceite esencial de las hojas de *Morella pubescens* extraído por arrastre con vapor, con miras a determinar las condiciones más apropiadas para su obtención y posible aprovechamiento comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de realización del estudio. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Nariño en la ciudad de Pasto, ubicada a 2527 msnm, con una temperatura ambiente promedio de 14 °C y humedad relativa de 65%.

Material vegetal. Las hojas y tallos de *Morella pubescens*, se recolectaron en zona rural del municipio de San Pablo, norte del departamento de Nariño (Colombia). La identificación taxonómica de las muestras se llevó a cabo en el Herbario de la Universidad de Nariño de acuerdo con el trabajo de Parra [5].

El material vegetal (solo hojas) se pesó, se separó de piedras, impurezas y otros elementos extraños y se dejó secar a la sombra a temperatura ambiente por espacio de ocho días, luego se trituro en un molino de martillos y se tamizó utilizando tamices de la serie ASTM de 8, 14, 30 y 50 mallas.

Proceso de extracción. La extracción de los metabolitos secundarios volátiles del laurel de cera se realizó mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor. Para ello se utilizó un equipo a escala de laboratorio especialmente diseñado por los autores para tal efecto. El equipo consta de un balón de 2000 mL, una columna portamuestra de 600 mL con anillos raschig y un condensador de espiral. Para cada una de las extracciones se usaron 700 mL de agua destilada en el balón y una densidad de lecho en la columna portamuestra de 0,167 g/mL, es decir, 100 g de muestra seca. Estos valores fueron determinados a través de ensayos previos realizados por los investigadores. El aceite esencial se deshidrató con Na_2SO_4 anhidro (Mallinckrodt). Una alícuota del aceite (30 μL) se diluyó en 1 mL de diclorometano (Merck), para el análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico. El análisis para determinar la concentración de los aceites se realizó en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 17A versión 3, equipado con un inyector split/splitless a temperatura de 250 °C, relación split 1:100 y un detector de ionización en llama (FID) (280 °C). Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con un programa Shimadzu Class VP 4.3. Para la separación de mezclas se utilizó una columna apolar DB-5 (J&W) de 30 m x 0,25 mm D.I. y 0,25 μm de una fase estacionaria de 5% fenil-poli metilsiloxano. La temperatura del horno fue programada de 40 °C (5 min) hasta 250 °C a 5 °C min^{-1} . El gas de arrastre y gas auxiliar empleado fue helio (99.9995%, Aga-Fano S.A) a flujo de 1 ml min^{-1} , las velocidades de flujo para gases de combustión en el FID fueron 300 mL min^{-1} para el aire y 30 mL min^{-1} para el hidrógeno, el volumen inyectado de los extractos fue de 1.0 μL . Los espectros de masas se obtuvieron en modo SCAN en un intervalo de masas de 38 a 450 m/z.

La identificación de los compuestos se realizó utilizando los índices de retención de Kovats [11], usando una serie de n-alcenos ($\text{C}_6\text{-C}_{32}$) y mediante comparación de los espectros de masas obtenidos con aquellos de la librería de espectros Wiley. La cuantificación se realizó mediante el cálculo del porcentaje relativo de áreas de cada compuesto.

Diseño de experimentos y análisis estadístico. La evaluación del proceso de extracción se realizó utilizando un diseño factorial de experimentos tipo screening 2^2 con 2 puntos centrales, cada ensayo se realizó por duplicado para un total de 12 experimentos. Los factores estudiados fueron el tamaño de partícula y el tiempo de operación a dos niveles (inferior y superior). Los diámetros de partícula (D_p) promedio evaluados en la experimentación fueron codificados de la siguiente manera: 1 = 0,446 mm, 2 = 0,893 mm y 3 = 1,785 mm. El factor tiempo se estudió a dos niveles 60 y 180 minutos. Las variables de respuesta consideradas fueron el área total del cromatograma (cuentas) como parámetro indicador de la concentración del aceite y el porcentaje relativo del componente mayoritario. La matriz de diseño experimental y el análisis de resultados se elaboraron con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp. 1994 – 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición del aceite esencial del laurel de cera. La matriz del diseño experimental junto con los resultados obtenidos para las variables de respuesta evaluadas se presentan en la tabla 1, en la cual se puede observar el área total del cromatograma y el porcentaje relativo

Tabla 1. Resultados del diseño experimental para la extracción por arrastre con vapor de hojas de *Morella Pubescens* con relación a los cuatro compuestos mayoritarios

Exp	D_p	Tiempo (min)	A_{TC} (Cuentas)	# picos	A_{PM} (Cuentas)	Trans-Cariofileno	CR (%)	α -Selineno	CR (%)	β -Selineno	CR (%)	Oxido de cariofileno	CR (%)
1	3	60	593167	36	257.254	118.859	20,04	55454	9,349	56712	9,561	26229	4,422
2	2	120	987553	26	526.270	248.567	25,17	112950	11,44	115331	11,68	49422	5,004
3	3	180	1276046	27	640.493	292.431	22,92	137820	10,8	148449	11,63	61793	4,843
4	2	120	959106	23	469.415	230.991	24,08	90900	9,478	100376	10,47	47148	4,916
5	1	180	1830354	25	1.012.656	473.261	22,22	210948	9,902	220240	10,34	108207	5,079
6	1	60	361596	29	144.567	62.991	17,42	32965	9,117	33943	9,387	14668	4,056
7	3	60	566610	21	285.953	134.185	23,68	59104	10,43	65429	11,55	27235	4,807
8	2	120	872375	28	435.630	202.998	23,27	92712	10,63	97576	11,19	42344	4,854
9	3	180	1330022	28	648.502	307.734	23,14	129510	9,737	142074	10,68	69184	5,202
10	2	120	632320	22	217.546	88.234	13,95	43923	6,946	56175	8,884	29214	4,62
11	1	180	1682790	24	716.132	315.678	18,76	148273	8,811	165427	9,831	86754	5,155
12	1	60	314881	25	193.424	92.941	29,52	45225	14,36	40120	12,74	15138	4,808

de los cuatro componentes mayoritarios para cada una de las condiciones experimentales estudiadas en el proceso de extracción por arrastre con vapor.

D_p: diámetro de partícula, A_{TC}: área total del cromatograma, A_{PM}: área de los picos mayoritarios, CR: cantidad relativa del compuesto

En la figura 1 se muestra un perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles extraídos mediante arrastre con vapor de hojas de laurel de cera, se encontraron más 20 sustancias en concentraciones relativas superiores a 0,05% en el aceite esencial.

Los componentes volátiles mayoritarios identificados en el aceite esencial del laurel de cera y su concentración relativa se observan en la tabla 2, los resultados difieren de los reportados por Quijano y Pino [8], quienes analizaron la composición de aceite esencial de hojas de *Morella pubescens* recolectadas en el departamento de Nariño (Colombia) y extraído por la técnica de destilación-extracción simultánea (DES) con pentano:

éter etílico (1:1 v/v), encontrando como componentes mayoritarios el 1,8-cineol (20,0 %), linalol (16,4 %) y acetato de α -terpinilo (11,1 %). Las diferencias encontradas pueden ser atribuidas al hecho de que se utilizaron técnicas de extracción diferentes.

Hurtado et al. [12], analizaron la composición de los compuestos volátiles de la cera de laurel y encontraron un total de 27 compuestos en las muestras analizadas; los compuestos mayoritarios encontrados fueron α -muuroleno (26,9 %), β -selineno (26,6 %), trans-cariofileno (24,5 %), β -elemeno (4,8 %), δ -cadineno (4,2 %) y linalol (2,3 %). Al comparar los metabolitos secundarios encontrados en el aceite esencial con los volátiles presentes en la cera se observa que los compuestos trans-cariofileno, β -elemeno, γ -cadineno y linanol se encuentran en ambas matrices en proporciones similares.

En la tabla 3 se presentan algunas actividades biológicas reportadas para los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *Morella pubescens*, de

Figura 1. Perfil cromatográfico típico de aceite esencial de *Morella pubescens* extraído por arrastre con vapor

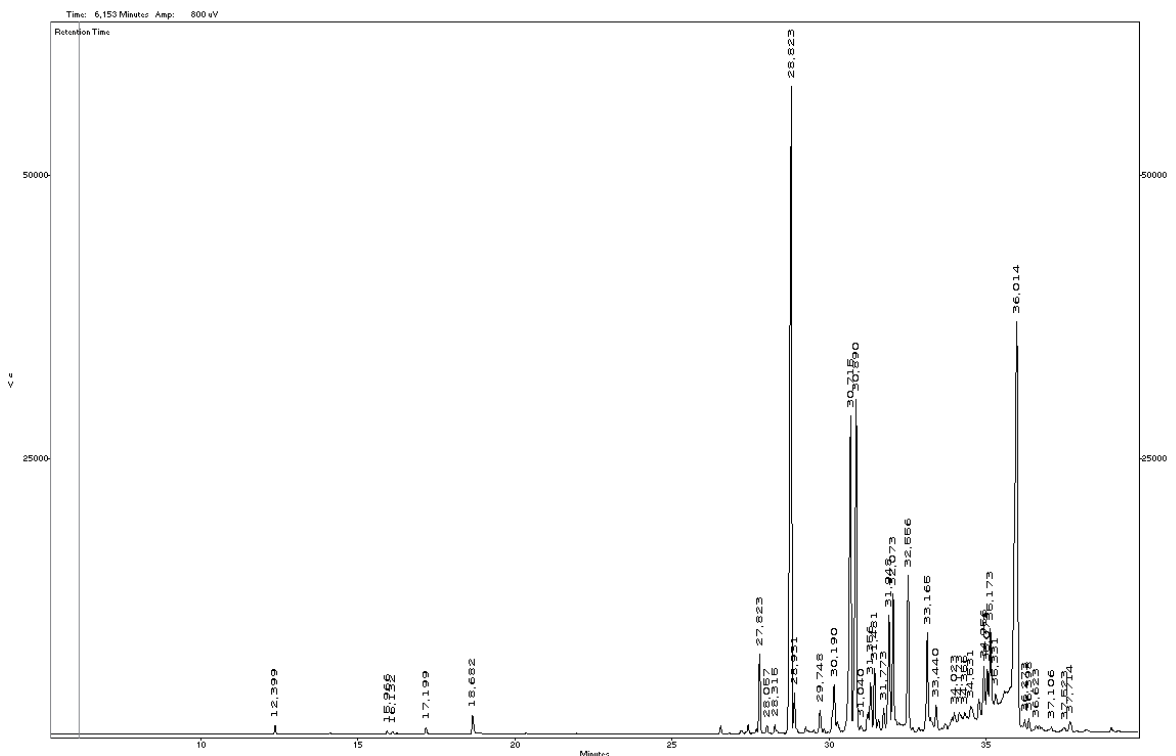


Tabla 2. Compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial de *Morella pubescens*

I _k Teórico	Cr (%)	Posible Compuesto
1097	1,07	Linalool
1319	1,81	β-Elemeno
1409	21,33	<i>trans</i> -Cariofileno
1440	0,83	β-Humuleno
1455	0,61	α-Humuleno
1479	1,51	γ-Selineno
1490	9,97	c-Selineno
1498	10,66	α-Selineno
1514	1,17	γ-Cadineno
1530	1,61	<i>cis</i> -Calameneno
1547	3,29	Selino-3,7(11)-dieno
1583	4,81	Oxido de cariofileno
1590	2,58	β-Elemenona
1608	0,68	Epoxido de Humuleno II

Tabla 3. Actividad biológica de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de las hojas de *Morella pubescens*

Compuesto	Actividad biológica
Trans- Cariofileno	Antiflamatorio, antibacterial, antiacné, antialérgico, fungicida, irritante.
α-Selineno	Antimalarico, antiplasmodial, aromatizante(perfumería)
β-Selineno	Antimalarico, antiplasmodial, aromatizante (perfumería)
Oxido de cariofileno	antiedémico, antiinflamatorio, antitumoral, fungicida, insecticida

Fuente: tomados de base de datos virtual fitoquímica y etnobotánica Dr. Duke

donde se puede deducir que este aceite podría ser de interés para las industrias farmacéutica y cosmética.

Estudio del efecto de las variables del proceso de extracción sobre la concentración y composición del aceite esencial. El análisis de varianza de los factores estudiados en el proceso de extracción del aceite esencial para la variable de respuesta concentración del aceite (área total del cromatograma) mostró que

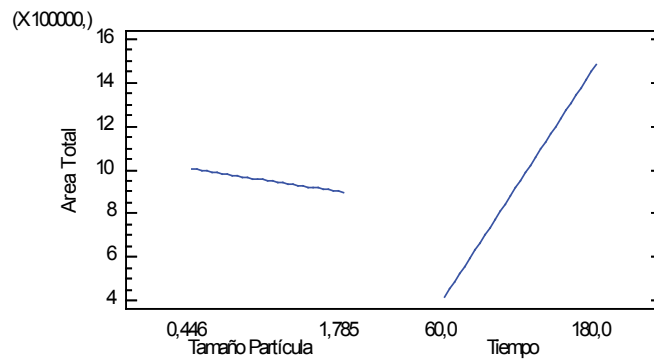
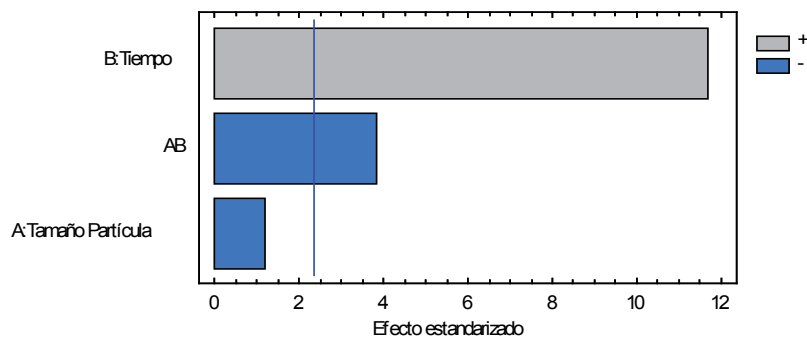
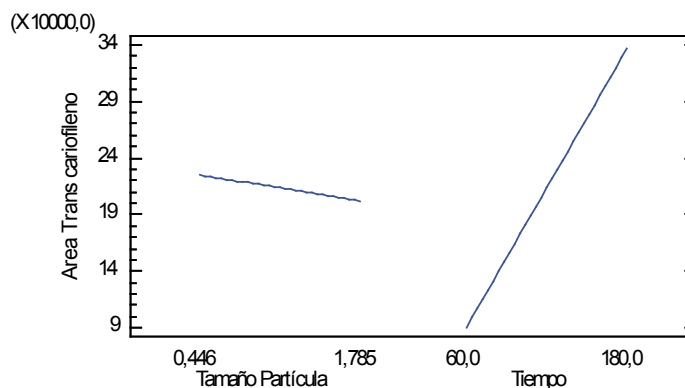
tanto el tiempo como la interacción tiempo – tamaño de partícula tuvieron un efecto significativo (valor de $P < 0,05$) sobre la concentración del aceite esencial de *Morella pubescens* extraído por la técnica de arrastre con vapor, mientras que la variable tamaño de partícula por sí sola no mostró un efecto estadísticamente significativo en el rango de diámetros evaluados.

El diagrama de efectos principales (figura 2) muestra por separado la influencia de cada factor con respecto a la variable de respuesta expresada como área total del cromatograma. El tamaño de partícula en los niveles empleados en el diseño experimental (1 = 0,446 mm, 2 = 0,893 mm, 3 = 1,785 mm) no mostró un efecto significativo en las extracciones realizadas, mientras que el tiempo si tuvo un efecto importante, observándose que al pasar de 60 a 180 minutos se logra un aumento significativo sobre la concentración del aceite.

En el diagrama de Pareto (figura 3) se muestra en orden de importancia el efecto de cada uno de los factores analizados con respecto a la concentración del aceite esencial. Se observa que el factor tiempo tuvo el mayor efecto sobre la concentración del aceite y de manera directamente proporcional, mientras que el efecto de la interacción del tiempo con el tamaño de partícula fue inversamente proporcional y en menor medida que el primero.

Con relación al efecto de las variables del proceso de extracción sobre la composición del aceite esencial, el análisis de varianza permitió determinar el efecto significativo ($P < 0,05$) del factor tiempo sobre el porcentaje relativo de *trans*-Cariofileno. Se demostró que con tiempos de extracción más prolongados se logra una mayor concentración de este componente en el aceite esencial.

En la gráfica de efectos principales (figura 4) se muestra que la reducción en el tamaño de partícula ejerce un efecto muy pequeño respecto al incremento en el área del componente mayoritario en el cromatograma, sin embargo cuando se aumenta el factor tiempo de 60 a 180 minutos se obtiene un incremento aproximado en dicha área de 90000 a 34000 cuentas.

Figura 2. Diagrama de efectos principales para área total del cromatograma**Figura 3.** Diagrama de Pareto para área total del cromatograma**Figura 4.** Diagrama de efectos principales para porcentaje relativo del componente mayoritario

En términos generales las mayores concentraciones del aceite esencial y sus componentes mayoritarios se obtuvieron cuando las condiciones del proceso de extracción se encontraban en el nivel inferior del tamaño de partícula (0.446 mm) y el nivel superior del tiempo (180 minutos), esto se puede explicar desde el punto de vista de los fenómenos de difusión y la

transferencia de masa. Un tamaño de partícula fino permite un incremento de la superficie específica del material y por tanto una mayor área de contacto entre la fase de vapor y el material vegetal, lo que conduce a que se obtengan mayores concentraciones de aceite esencial. El aceite esencial contenido en las glándulas odoríferas existentes dentro de las células vegetales se

acumula en las paredes de las mismas, estas células secretoras al estar en contacto con el vapor de agua hinchan sus paredes celulares y posibilitan el paso de los aceites esenciales al exterior por osmosis [13], en las primeras horas de extracción se da una difusión de los componentes de una fase a otra presentándose entre ellos una transferencia de masa de los componentes activos con tendencia al equilibrio [14].

CONCLUSIONES

Los componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial de las hojas de *Morella pubescens* extraído por la técnica de arrastre con vapor fueron *trans*-Cariofileno (21,3%), α -Selineno (10,7%), β -Selineno (10,0%), Oxido de cariofileno (4,8%), Selino-3,7(11)-dieno (3,3%) y β -Elemenona (2,6%).

Tanto el tiempo como la interacción tiempo – tamaño de partícula tuvieron efectos significativos (valor de $P < 0,05$) sobre la concentración del aceite esencial de *Morella pubescens* medida como área total del cromatograma, mientras que la variable tamaño de partícula por sí sola no mostró un efecto estadísticamente significativo.

Se determinó que, en la técnica de arrastre con vapor, al incrementar el tiempo de extracción de 60 a 180 minutos se logra un incremento significativo en la concentración de *trans*-Cariofileno como componente mayoritario del aceite esencial de *Morella pubescens*, mientras que la variación en el tamaño de partícula no ejerció efecto significativo sobre dicho componente.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] BANDONI, A. (Ed.), Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. CYTED, 1ª ed., Buenos Aires, 2000. pp. 29-30.
- [2] BAYDAR, H.; SAGDIC, O.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey, *Food Control*, 2004. 15, pp. 169–172.
- [3] LAHLOU, M., Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytother. Res.* 2004. 18, pp. 435-436.
- [4] STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity, *J. Chromatogr. A.* 1025, 2004. pp. 93-103.
- [5] PARRA, C. Revisión taxonómica de la familia Myricaceae en Colombia. *Caldasia*, 25(1), 2003. pp. 23-64.
- [6] TREJOS, A. Estudios sobre el “palomero”, “torcaz”, “roble”, “encinillo” o “palomito” (*Myrica* sp.). Ministerio de Agricultura y Cria. Dirección de Recursos Naturales Renovables. Caracas. 1960.
- [7] URIBE, J. “Flora Sonsonera” o colección de monografías familiares de vegetales selectos indígenas o cultivados en el municipio de Sonsón, Colombia. Edición hecha por el Consejo. Sonsón, Antioquia. 1928.
- [8] QUIJANO, C.; PINO, J. Constituyentes volátiles de las hojas de *Morella pubescens* (Humb. et Bonpl. ex Willd.) Wilbur. *Revista Cubana de Química.* 19 (1), 2007. pp. 54–57.
- [9] LI, X.M.; TIAN, S.L. PANG, Z.C.; CHI, J.Y.; FENG, Z.S.; ZHANG, Y. M. Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chemistry.* 115(3). 2009. pp. 1114-1119.
- [10] LEYVA, M.A.; FERRADA, P.J.; MARTINEZ, J. R.; STASHENKO, E.E. Rendimiento y composición química del aceite esencial de *zingiber officinale* en función del diámetro de partícula. *Scientia et Technica.* 2007. 33. pp. 187-188.
- [11] KOVATS, E. “Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system”. *Adv. Chromatogr.* 1. 1965. pp. 229-247.
- [12] HURTADO, A.; IBAÑEZ, E.; SEÑORANS, J.; REGLERO, G.; Characterization of *Morella pubescens* fruits aroma by SPME-GC-MS. 11ª Jornadas

de Análisis Instrumental, Barcelona, noviembre, 2005.

[13] HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods*. Third edition. Ed. Chapman & Hall, London. 1998. pp. 295.

[14] GEANKOPLIS, C.J. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. Tercera edición. Ed. CECSA, Mexico. 1998. pp. 993.