

# Evaluación de las condiciones de extracción por hidrodestilación-cohobación del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (droga seca)

*Extraction Condition Evaluation of Pinus caribaea Morelet var. caribaea Essential Oil Foliage (Dry Drug) by Hydrodistillation-Cohobation*

Lic. Félix Fernández-Sánchez<sup>I</sup>, Ms. C. Jorge Eric Marín-Morán<sup>II</sup>, Ms. C. Zeneida Teixeira-Pinto<sup>III</sup>,  
Dra. C. Margareth María de Carvalho-Queiroz<sup>IV</sup>, Dr. C. Julio César Escalona-Arranz<sup>II</sup>   
[jcea@cnt.uo.edu.cu](mailto:jcea@cnt.uo.edu.cu)

<sup>I</sup>Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad, Moa, Holguín, Cuba; <sup>II</sup>Departamento de Farmacia, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba; <sup>III</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Laboratório de Educação em Ambiente e Saúde/FIOCRUZ, Bolsista CAPES, Brasil; <sup>IV</sup>Instituto "Oswaldo Cruz", Río de Janeiro, Brasil

## ● Resumen

Se realizó un estudio con el objetivo de seleccionar las condiciones de extracción por el método de hidrodestilación (cohobación) del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (droga seca). Los factores estudiados en el proceso de extracción fueron el tamaño de partícula (1,25; 0,6; 0,25 y 0,18 mm); la relación droga seca-agua (1:7, 1:12 y 1:16 g/mL); y el tiempo de extracción (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 y 360 min); mientras que como variable respuesta se consideró el rendimiento de aceite esencial (%). Los resultados demuestran que tanto el tamaño de partícula como el tiempo de extracción tienen efectos significativos sobre el rendimiento de aceite esencial (valor de  $P < 0,05$ ), a diferencia de la proporción droga-agua la cual no influye significativamente sobre el proceso extractivo. El máximo rendimiento obtenido entre los experimentos realizados alcanzó 1,4 % de aceite esencial, para tamaños de partícula de 0,18 mm y tiempos de extracción iguales o superiores a los 270 min.

Palabras clave: aceites esenciales, *Pinus caribaea* Morelet, plantas medicinales, tamaño de partícula, tiempo de extracción.

## ● Abstract

The selection of the extraction conditions by hydrodistillation (cohobation) of *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (dry drug) foliage was the focus of this study. Particle size (Mesh light 1,25; 0,6; 0,25; 0,18 mm); drug-water relation (proportion 1:7, 1:12, 1:6 g/mL) and extraction time (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 y 360 min) were modulated, whereas essential oil yield (%) was considered as the response variable. The results express how the diminution of the particle size and the increment of the extraction time, increase the essential oil yield in a significant way ( $p$  value  $< 0,05$ ), meanwhile drug-water relation do not has influence on the extractive process. The maximum performance obtained among the experiments accomplished rise the 1,4 % of essential oil yield when using 0,18 mm of particle size and extraction times equal or higher than 270 minutes.

Keywords: essential oil, *Pinus caribaea* Morelet, medicinal plant, particle size, extraction time.

## ● Introducción

La Organización Mundial de la Salud reconoció la importancia de las plantas medicinales, y recomendó que sean establecidos métodos científicos para asegurar la calidad de las materias prima vegetales y las preparaciones obtenidas a partir de las mismas, contribuyendo así a garantizar la efectividad del tratamiento /1/.

Entre los ensayos que tradicionalmente se deben encontrar disponibles en un Laboratorio de Control de la Calidad de fitofármacos, está la determinación del contenido de aceites esenciales, de las plantas que van a ser empleadas para la formulación de las diferentes preparaciones farmacéuticas. Muchas farmacopeas describen los porcentajes mínimos de esencias que deben estar presentes /2/. Para determinarlos, generalmente se emplea el método arrastre con vapor o algunas de sus modalidades; entre ellas la comúnmente conocida como hidrodestilación.

A escala de laboratorio el equipo más empleado es el de *Clevenger* (Günther, 1948) /3/, siendo considerado en varios estándares internacionales, como el más adecuado para la determinación del contenido total del aceite esencial de una planta aromática /4/. Un equipo *Clevenger* se caracteriza ser un sistema cerrado en donde el solvente o material extraído (en dependencia si el aceite esencial es más o menos denso que el agua) son "devueltos o retornados" al balón de destilación en un proceso que se repite hasta que se haya considerado la total extracción del aceite esencial. Esta "devolución o retorno" es lo que se conoce como cohobación. Este proceder resulta particularmente efectivo cuando los aceites esenciales a extraer resultan parcialmente solubles en agua, o en su defecto cuando se desconoce su solubilidad en este solvente /5/.

El Sistema Nacional de Salud Cubano, establece en la Norma Ramal de Salud Pública 309/91 /6/ una metodología para la determinación del contenido de aceite esencial, la cual consiste en separar el aceite del resto del producto de la destilación mediante la extracción discontinua líquido-líquido. Esta técnica resulta eficaz cuando la planta a ser extraída, presenta bajos rendimientos de aceite esencial, eliminando las

posibles pérdidas por solubilización en agua /7/, sin embargo, resulta complejo en muchos casos la evaporación del solvente sin afectar la cantidad de aceite esencial extraído. Adicionalmente los costos económicos y medioambientales asociados al empleo de solventes orgánicos, así como las posibles intoxicaciones que pudieran ocurrir al manipular indebidamente y sin las condiciones de seguridad laboral estos productos, son aspectos negativos que también deben ser considerados.

Dentro de las plantas medicinales contenedoras de aceites esenciales que se comercializan en Cuba con fines medicinales, y que aparecen recogidas en el Nuevo Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos /8/, se encuentra el *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*. Esta especie, conocida por los nombres comunes de pino amarillo y pino macho, es nativa de Pinar del Río e Isla de la Juventud aunque se ha extendido a toda la geografía cubana y a algunas zonas del Caribe. El extracto fluido obtenido a partir del follaje de esta especie, posee actividad biológica antifúngica demostrada /9/, y se indica en las micosis provocadas por: *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* y *T. rubrum* /10/, los cuales afectan a la piel, el pelo y las uñas del hombre.

Dada su condición de endémica cubana, la variedad *caribaea* del *Pinus caribaea* Morelet, presenta pocos estudios referentes a su rendimiento en la producción de aceites esenciales, y su determinación en nuestro entorno nacional está condicionada a la anteriormente mencionada Norma Ramal de Salud Pública 309/91 /5/.

El contenido de aceites esenciales para el follaje del pino macho descrito en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos /8/ es de  $0,29 \pm 0,07$  %, hecho que justifica la selección del método normado. Sin embargo, dada la naturaleza en que queda la droga ya extraída, el conocimiento de que el género *Pinus* es internacionalmente reconocido como un abundante productor de aceites esenciales en diferentes partes de Europa /11, 12/, África /13, 14/, Asia /15/ e incluso América /16/, y las limitaciones inherentes al propio método normado, es que en el presente trabajo se propone:

Evaluar las condiciones de extracción por hidrodestilación-cohobación del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (droga seca), sobre la base de que el conocimiento y el control de las variables determinantes del proceso de extracción del aceite esencial, facilitarán el aseguramiento de la calidad de la misma.

## ● Materiales y métodos

### **Procedencia y procesamiento del material vegetal**

Se trabajó con tres lotes de follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*, recolectadas en el reparto Miraflores del municipio de Moa, provincia de Holguín, en los meses de marzo y abril de 2012. La identificación de la especie y los parámetros de calidad de la droga fueron garantizados por la Empresa Agropecuaria del propio municipio Moa, proveedor exclusivo de las plantas medicinales que servirán como materia prima en la producción de Fitofármacos en esta región de Cuba.

Las agujas del follaje fueron agrupadas en manojos los cuales fueron suspendidos por la parte maderable mediante un hilo desde el techo de la nave y se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente, por espacio de diez días al cabo de los cuales las acículas fueron separadas de la parte maderable manualmente.

La humedad residual de la droga se determinó por el método azeotrópico con tolueno, según el procedimiento descrito en NRSP 309, y según consta en la ficha de control de la calidad de los lotes emitidos por la Empresa Agropecuaria del municipio Moa, Holguín. La disminución del tamaño de partículas se realizó en un molino artesanal para luego tamizarse utilizando tamices de la serie China YF.

### **Extracción de los aceites esenciales.**

#### **Selección de las condiciones**

La extracción del aceite esencial de pino macho se realizó en el Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad del municipio de Moa, por el método de hidrodestilación-cohobación a escala de laboratorio, en un equipo *Clevenger*.

Se modificaron linealmente las variables que según las experiencias previas del investigador y las referencias encontradas en la bibliografía consultada, resultaban determinantes en el proceso de extracción de los aceites esenciales /9/. Tres variables fueron consideradas:

- Proporción droga seca/volumen de agua.
- Tamaño de partículas del material vegetal.
- Tiempo de extracción.

En cada uno de los experimentos, se modificaron los niveles de la variable en estudio manteniendo fijo una combinación de niveles de las otras dos variables. Los experimentos realizados se describen a continuación:

- *Variación de la proporción droga seca/volumen de agua:* Se varió este parámetro en tres niveles: 30:210, 30:360 y 30:480 (m/v). En todos los casos se mantuvo constante el tamaño de partícula  $T_p < 0,18$  milímetros y un tiempo de extracción de 270 min. No se consideraron otras proporciones por las limitaciones asociadas a la capacidad (en volumen) del equipo de destilación.
- *Variación del tamaño de partículas del material vegetal:* Se varió el tamaño de partícula en cuatro niveles:  $0,60 < T_p < 1,25$ ;  $0,25 < T_p < 0,60$ ;  $0,18 < T_p < 0,25$  y  $T_p < 0,18$  milímetros. En todos los casos se mantuvo constante una proporción droga/agua de 30:480 (m/v) y un tiempo de extracción de 270 min.
- *Tiempo de extracción:* Se varió el tiempo de extracción en un total de 12 niveles correspondientes a los tiempos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 y 360 minutos. En todos los casos, se mantuvo constante una proporción droga/agua 30:480 (m/v) y un tamaño de partículas de  $T_p < 0,18$  mm.

### **Caracterización física y química del aceite esencial**

Los aceites esenciales extraídos a cada uno de los lotes y experimentos realizados fueron caracterizados físico-químicamente según las especificaciones de las normas de control de la calidad cubanas. Para cada una de las variables determinadas se reporta el valor medio y la desviación estándar de las tres réplicas realizadas.

### Determinación de la densidad relativa

La densidad relativa del aceite esencial ( $d_{25}^{25}$ ) se midió con un picnómetro de 10 mL de acuerdo al procedimiento descrito en Norma Ramal de Salud Pública 312/91/17/. Las pesadas se realizaron en una Balanza electrónica analítica ACCULAB (Sartorius, Alemania), mientras que la temperatura del medio se empleando un termómetro estándar.

La densidad relativa ( $d$ ) se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$d_{25}^{25} = d_{25}^t + 0,000\ 80(t-25) \quad (1)$$

donde:

$d_{25}^{25}$  = densidad relativa a 25 °C

$d_{25}^t$  = densidad relativa a la temperatura de medición.

$t$  = temperatura de la medición (°C).

### Determinación del índice de refracción

El índice de refracción ( $n$ ) fue medido con un refractómetro de Abbe (Modelo 320, AuxilabCarl Seis; Alemania) de fabricación alemana, de acuerdo al procedimiento que aparece en la norma citada anteriormente NRSP 312/91. El índice de refracción ( $n$ ) se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$N_{D}^{25} = n_{D}^t + 0,000\ 44(t-25) \quad (2)$$

donde:

$n_{D}^{25}$  = índice de refracción a 25 °C.

$n_{D}^t$  = valor medido a la temperatura  $t$ .

$t$  = temperatura de la medición (°C).

El porcentaje de aceite esencial se determinó mediante la siguiente expresión:

$$Ae = \frac{v \cdot d}{m} \cdot 100 (\%) \quad (3)$$

donde:

$v$  = volumen de aceite esencial obtenido (mL)

$d$  = densidad del aceite esencial (g/mL)

$m$  = masa de la droga (g)

100 = Factor matemático para los cálculos.

Los resultados se aproximaron hasta la décima. Se informó el promedio de las tres determinaciones del por ciento de aceite esencial (tres lotes).

### Procesamiento estadístico de los datos

Tomando en consideración que cada experimento se realiza a cada uno de los tres lotes de la droga, un análisis múltiple de varianzas se emplea para detectar las posibles diferencias estadísticas, entre los diversos niveles de experimentación de cada variable. Las diferencias entre las medias se obtienen aplicando el test de Tuckey de las mínimas diferencias significativas para un valor de  $p < 0,05$ . Para ello se empleó el software estadístico profesional Statgraphics Centurion XV.

### ● Resultados y discusión

Las agujas del follaje del *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* secado en las condiciones definidas anteriormente conservan el color verde-amarillento que las caracteriza. Su consistencia se hace más quebradiza que el de las agujas frescas, favoreciendo el proceso de disminución del tamaño de partículas. El proceso de secado, aunque puede extenderse hasta los 10 días, no afecta el aroma del follaje que caracteriza a esta especie. El valor de humedad residual declarado por el distribuidor fue 10,07 %, declarado como apto según los parámetros de calidad de la droga seca /8/.

### Extracción de los aceites esenciales.

#### Selección de las condiciones

La variación de la proporción droga seca/volumen de agua (g/mL) en tres niveles: 1:7, 1:12 y 1:16 manteniendo constante el tamaño de partícula 0,18 mm y un tiempo de extracción de 270 min (experimento 1) no provoca ningún incremento en las cantidades de aceites esenciales extraídos. Ello corrobora lo sugerido en la bibliografía sobre el hecho de que una proporción droga (g)/volumen de agua (mL) de 1:7 resulta eficaz en la extracción de los mismos /1/. Ante este tipo de comportamiento, se sugiere emplear las proporciones menores para aprovechar al máximo las capacidades del equipo de extracción y para disminuir la posibilidad de solubilización de los aceites esenciales en el agua.

Como se ha mencionado anteriormente, el método de hidrodestilación-cohobación es particularmente efectivo en aceites esenciales que puedan solubilizarse

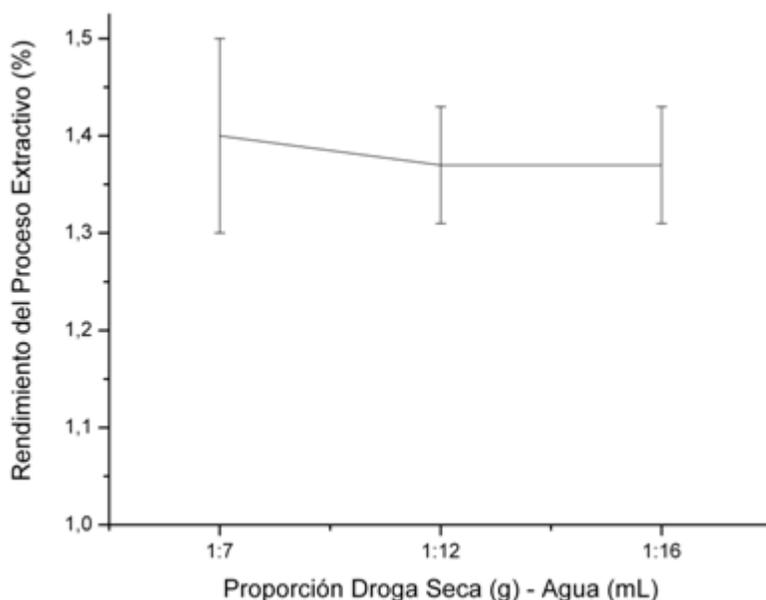
en el agua o cuando se desconoce la solubilidad de estos en este medio, por lo que las proporciones de droga seca/agua podrían ser determinantes en los rendimientos obtenidos.

Aunque la composición de aceites esenciales de la variedad *caribaea* es poco conocida, los estudios con otras variedades de esta especie demuestran la presencia de alcoholes monoterpénicos y sesquiterpénicos como el cis-verbenol, el geraniol, el metil carvacol, el 2-en-1-mentol, el linalool y el 4-terpinenol/14-16/.

Los alcoholes y fenoles son los tipos de aceites esenciales comúnmente más solubles en agua,

pudiendo incrementar valores de solubilidad desde un 0,2 % (solubilidad media de los aceites esenciales) hasta un 0,7 % (solubilidad media de los aceites esenciales ricos en alcoholes y fenoles) /2/, confirmando la utilidad de esta metodología para la extracción de los aceites esenciales del *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*. Estas observaciones podrían servir como elementos de justificación a la hora de destacar los altos rendimientos de aceites esenciales obtenidos (cerca de 1,4 %), casi cinco veces superior al método normado en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos /8/.

Los resultados obtenidos en el experimento 1 se muestran en la figura número 1.



**Fig. 1** Influencia de la proporción droga seca (g)/agua (mL) en el rendimiento de extracción del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*.

La disminución del tamaño de partículas del material vegetal (mm) en cuatro niveles:  $0,6 < T_p < 1,25$ ;  $0,25 < T_p < 0,6$ ;  $0,18 < T_p < 0,25$  y  $T_p < 0,18$ , manteniendo constante una proporción droga/agua de 1:7 y un tiempo de extracción de 270 min (experimento 2) provocó un incremento significativo entre cada punto evaluado para la variable respuesta (por ciento de aceites esenciales) de manera exponencial, logrando un máximo de extracción de 1,4 % para el tamaño de partículas menor de 0,18 mm.

Este comportamiento resulta coherente, pues la disminución del tamaño de partículas aumenta la

superficie de contacto entre la droga a extraer y el solvente de extracción (agua) y, por tanto, aumenta la eficiencia del proceso extractivo.

Adicionalmente a esto, el proceso de disminución del tamaño de partícula implica, para la muestra, una ruptura del material biológico, el cual puede ver afectada su integridad celular y dejar expuesto al medio de extracción su composición intracelular, la cual será más fácilmente extraída. En el caso particular del género *Pinus* es reconocido que la mayor parte de los aceites esenciales se almacenan y excretan a través de tejidos y vasos esquizógenos que recorren

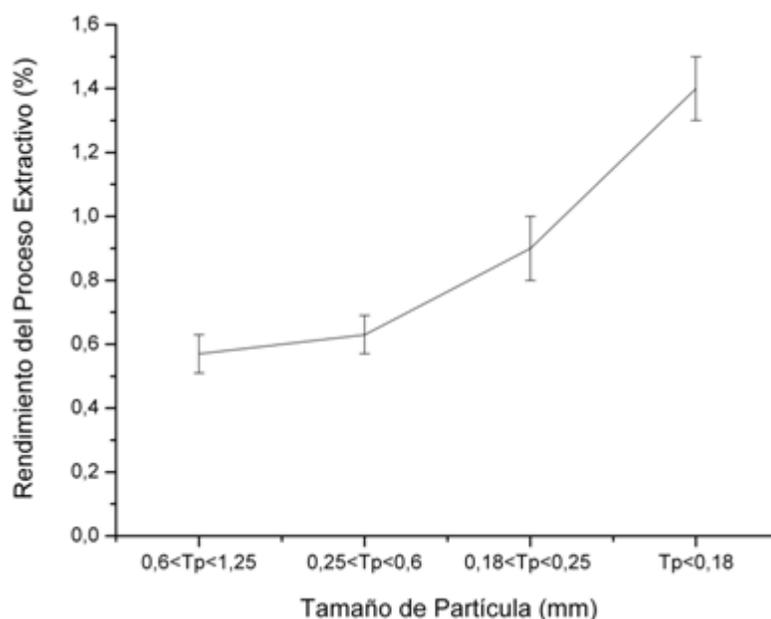
toda la planta a manera de tubos de comunicaciones /1/. Estos espacios intercelulares, que se originan por separación de las células glandulares, son los recipientes en los que se vierten los productos elaborados y constituyen las cavidades esquizógenas o de secreción.

Aunque en este diseño de experimento no se logra una inflexión en la variable respuesta, es importante señalar que un tamaño de partícula muy pequeño genera un grado de compactación muy alto, lo cual dificulta el paso a través del material vegetal del solvente de extracción disminuyendo los rendimientos

/19/. La carencia de tamices de luz de malla menor a los 0,18 mm, impidieron ampliar los niveles de variación de esta variable.

Al igual que en el experimento anterior, resulta notorio el hecho que incluso para un tamaño de 1,25 mm los rendimientos de aceites esenciales son el doble de los reportados en la norma cubana en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos /8/.

Los resultados de este experimento se muestran más claramente en la figura 2.



**Fig. 2** Influencia del tamaño de partícula en el rendimiento de extracción del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*.

El incremento de los tiempos de extracción a 12 niveles (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 y 360 min) manteniendo constante una proporción droga seca/agua de 1:7 y un tamaño de partículas de 0,18 mm provoca un incremento sostenido del porcentaje de aceites esenciales hasta los 270 min, tiempo a partir del cual el valor de la variable respuesta se mantiene constante. La modulación de esta variable sugiere que, bajo las condiciones experimentales empleadas, una extracción de tiempo igual a los 270 min resulta suficiente para lograr la total extracción de los aceites esenciales del follaje de la especie *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*.

En sentido general, los altos rendimientos de aceite esencial obtenidos al prolongar el tiempo de extracción se debe a que la mayoría de los aceites volátiles son mezclas complejas de muchos tipos de compuestos. Al calentar el aceite en un aparato de destilación, el componente que tiene el punto de ebullición más bajo destila primero, luego la temperatura se eleva hasta que alcanza el punto de ebullición de otro compuesto y así sucesivamente hasta lograr la extracción total. El tiempo requerido para la destilación completa de la esencia varía con la naturaleza de la droga y su grado de pulverización, pero son suficientes, por lo general y según algunas

bibliografías, unas cuatro horas /1/. En esta variable también es necesario considerar la localización celular de los aceites esenciales y la naturaleza química de ellos, pues aunque mono y sesquiterpenos suelen ser los más extraídos, un extenso período de extracción podría además extraer diterpenos, los cuales presentan puntos de ebullición más elevados y por ende requieren de mayores tiempos de extracción.

Compuestos diterpénicos como los ácidos pimárico, Sandaracopimárico y abiático entre otras oleorresinas,

han sido extraídas de la variedad *hondurensis* del *Pinus caribaea* /2/.

Una vez más se repiten los elevados valores de rendimiento de aceites esenciales los cuales rondan el 1,4 %. Un valor cercano a este (1,24 %) fue obtenido por un estudio precedente realizado en Cuba empleando el mismo método de extracción pero a tiempo de 250 min/3/.

Los resultados de este experimento se muestran más claramente en la figura 3.

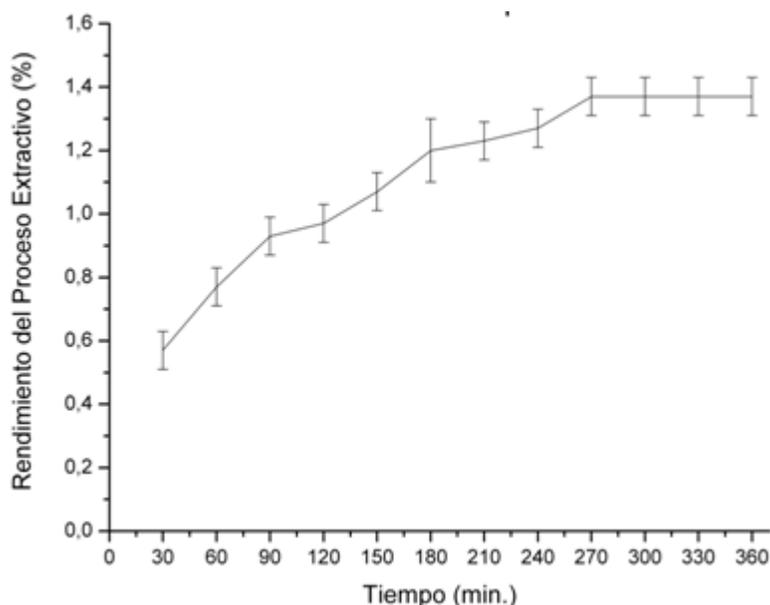


Fig. 3 Influencia del tiempo de extracción en el rendimiento de extracción del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*.

### Caracterización física y química del aceite esencial

Los aceites esenciales extraídos a cada uno de los lotes y experimentos realizados, fueron caracterizados físico-químicamente por determinación de la densidad relativa y del índice de refracción. Para ambas variables se reporta el valor medio obtenido y el de la desviación estándar, según muestra la tabla 1.

TABLA 1. PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DEL FOLLAJE DE *Pinus caribaea* Morelet var. *Caribaea*

Densidad relativa (g/L)	0,920 ± 0,002
Índice de refracción	1,503 ± 0,003

Como bien se observa en la anterior tabla, el aceite esencial de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*. resulta menos denso que el agua, razón por la cual el aceite extraído queda retenido en la parte superior del tubo colector del aparato *Clevenger* empleado. Adicionalmente, en este aceite esencial resalta un índice de refracción mucho más elevado que el agua.

La determinación de ambas propiedades a los aceites obtenidos en los tres lotes estudiados nos permite comprobar que independientemente del lote que se trate y de la combinación de factores empleados, el comportamiento del aceite esencial es el mismo (desviación estándar baja) y por tanto dichos parámetros podrán ser utilizados como

criterios de calidad del aceite esencial extraído, tal y como se realiza desde inicios del siglo XX /1/



## Conclusiones

Según demuestran las tres variables evaluadas, para el follaje del *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*, un tamaño de partícula del material vegetal de 0,18 mm, y tiempos de extracción de 270 min son condiciones favorables para incrementar los rendimientos extractivos. Las proporciones droga seca-agua empleadas no mostraron diferencias significativas entre ellas, aunque se sugiere el empleo de la menor (1:7). Adicionalmente se demostró que es posible obtener rendimientos superiores a los reportados en el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos si se aplica el método de hidrodestilación-cohobación.

Independientemente del lote que se trate y de la combinación factores extractivos empleados, los valores de densidad relativa e índice de refracción de los aceites esenciales obtenidos son muy similares, pudiendo ser empleados dichos parámetros como criterios de calidad del aceite esencial extraído.



## Bibliografía

- <sup>1</sup> SHARAPIN, N. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Secretaría Ejecutiva. Convenio Andrés Bello. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 2000. págs. 150-151.
- <sup>2</sup> BRITISH PHARMACOPOEIA (BP). *Her Majesty Stationary Office*. London; UK. 2010. CD-Rom
- <sup>3</sup> GÜNTHER, E. *The Essential Oils. History and Origin in Plants Production Analysis*. Vol. 1. Krieger Publishing: New York, USA, 1948.
- <sup>4</sup> CERPA C., M. G. "Hidrodestilación de Aceites Esenciales: Modelado y Caracterización". Tesis en opción del título de Doctor en Ciencias en Ingeniería Química. Universidad de Valladolid. España 2007.
- <sup>5</sup> LAWRENCE, B. M. The Isolation of Aromatic Materials from Natural Plant Products. In: A Manual on the Essential Oil Industry, Tuley De Silva (Ed.), United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), Vienna, Austria. 1995: p132.
- <sup>6</sup> MINSAP. *Medicamentos de origen vegetal: Droga Cruda*. Métodos de ensayo. NRSP 309. La Habana. Cuba. 1991.
- <sup>7</sup> SANTOS C., M. A. "Evaluación del rendimiento de aceite esencial de Hinojo (*Foeniculum vulgare* Miller) procedente de dos niveles altitudinales de Guatemala". Tesis de Diploma en opción al título de Ingeniero Químico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, 2006, págs. 1-5.
- <sup>8</sup> MINSAP. Dirección Nacional de Farmacia. Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos. 2010: 90-92.
- <sup>9</sup> LÓPEZ, R. M.; A. M. GONZÁLEZ; L. T. ACOSTA; G. J. CÁCERES. Actividad antifúngica *in vitro* del *Pinus caribaea* (pino macho). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1997; 2(1): 25-29.
- <sup>10</sup> QUERT, Á. R. "Contribución al estudio del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* Barret y Golfari de la provincia de Pinar del Río". Tesis de doctorado IFAL. Universidad de la Habana, 2000.
- <sup>11</sup> MACCHIONI, M. *et al.* Chemical composition of essential oils of needles, branches and cones of *Pinus. Pineae, P. halepensis, P. pinaster* and *P. nigra* from Central Italy. *Flavour and Fragrances*. 2003, 18(2): 139-143.
- <sup>12</sup> STEVANOIC, T. F. *et al.* "The Essential Oil Composition of *Pinus mugo* Terra from Serbia". *Flavour and Fragrances*. 2004, 20(1): 96-97.
- <sup>13</sup> DOB, T.; T. BERRAMDANE; C. CHELGOUM. "Chemical Composition of Essential Oil of *Pinus halepensis* Miller Growing in Algeria". C.R. *Chimie*. 2005, 8: 1939-1945.
- <sup>14</sup> Sonibare, O; K. Olakunle. Chemical "Composition and Antibacterial Activity of the Essential oil of *Pinus caribaea* from Nigeria. Chemistry Department". University of Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2008, 7 (14): 2462-2464.
- <sup>15</sup> CHOWDHURY, U. J.; I. N. BHUIYAN; C. N. NANDI. "Essential Oil Constituents of Needles, Dry Needles, Inflorescences and Resins of *Pinus caribaea* Morelet Growing in Bangladesh". *Bangladesh Journal of Botany*. 2008, 37(2): 211-212.
- <sup>16</sup> BARNOLA, F. L.; A. CEDEÑO. "Inter-population Differences in the Essential Oils of *Pinus caribaea* Needles". Biochemical. Facultad de Ciencias, Instituto de Zoología Tropical. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Venezuela. *Systematics and Ecology*. 2000, 28; 923-931.
- <sup>17</sup> MINSAP. Norma Ramal de Salud Pública 312. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. La Habana. Cuba. 1991.
- <sup>18</sup> KARAWYA, M.; F. E-WAKEIL; M. HIFNAWY; F. ISMAIL; M. KHALIFA. Study of Certain Factors Affecting Yield and Composition of Herbs Parsley Essential Oil (Effect of Stage of Growth, Successive Cutting, Time of Day of Harvesting, Method of Drying, Storage of Herb Oil). *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1980, 21(1-2): 69-75.
- <sup>19</sup> SWAMI HANDA, S.; S. P. SINGH KHANUJA; G. LONGO; D. DUTT RAKESH. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. Trieste, Italy. 2008. p. 29.
- <sup>20</sup> BARNOLA, L. F.; M. HASEGAWA; A. CEDEÑO. Mono- and Sesquiterpene Variation in *Pinus caribaea* Needles and its Relationship to *Atta laevigata* Herbivory. *Biochemistry*

- Systematic and Ecology*. 1994, 22: 437-445.
- <sup>21</sup> MARTÍN, E. W. *Farmacología práctica de Rémington*. Edición Revolucionaria. La Habana: Instituto Cubano del Libro, 1972. p. 720.
- <sup>22</sup> JANTAN, I.; A. S. AHMAD. Oleoresins of Three Pinus Species from Malaysian Pine Plantations. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC). November – December 1999: 1-9.
- <sup>23</sup> QUERT ÁLVAREZ, R.; J. M. MARTÍNEZ; F. GELABERT AYÓN. "Contenido del aceite esencial en el follaje de *Pinus caribaea* Morelet según la época del Año". I. *Revista Cubana de Farmacia*. Ene.-abr. 1998, v.32 (1): 32-37.
- <sup>24</sup> PARRY, E. *The Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes*. Volume I, fourth edition. Scott, Greenwood and Son. London, UK. 1921. P. 32.