



Ciencia e Ingeniería
ISSN: 1316-7081
ISSN: 2244-8780
revecien@ula.ve
Universidad de los Andes
Venezuela

Síntesis de un Surfactante Aniónico a partir del Ácido Linoleico obtenido del Aceite de Tocte (*Juglansneotropica* Diels)

Gavilanez-Alvarez, Maritza; Alvarado, José Gregorio; Cabezas-Arévalo, Ruth; Delgado-Linares, José Gregorio; Rennola-Alarcón, Leonardo

Síntesis de un Surfactante Aniónico a partir del Ácido Linoleico obtenido del Aceite de Tocte (*Juglansneotropica* Diels)

Ciencia e Ingeniería, vol. 39, núm. 2, 2018

Universidad de los Andes, Venezuela

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=507557606001>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Internacional.

Síntesis de un Surfactante Aniónico a partir del Ácido Linoleico obtenido del Aceite de Tocte (*Juglansneotropica* Diels)

Synthesis of an Anionic Surfactant from the Linoleic Acid Obtained from "Tocte" (*Juglansneotropica* Diels) Oil

Maritza Gavilanez-Alvarez
Escuela de Ingeniería Agronómica, Ecuador
igavilanez@epoch.edu.ec

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=507557606001>

José Gregorio Alvarado
Universidad de los Andes, Venezuela
josealvarado@ula.ve

Ruth Cabezas-Arévalo
Instituto Tecnológico Superior Riobamba, Ecuador
ruthcabezas02@gmail.com

José Gregorio Delgado-Linares
Universidad de los Andes, Venezuela
josedel@ula.ve

Leonardo Rennola-Alarcón
Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela
leonardo@ula.ve

Recepción: 13 Septiembre 2017

Aprobación: 20 Marzo 2018

RESUMEN:

La extracción y caracterización química del aceite de Tocte (*Juglansneotropica*Diels) a partir de la cromatografía GC-ME permitió identificar una serie de compuestos pertenecientes a diferentes familias orgánicas, entre ellas: Parafinas lineales, olefinas, alquenos, aldehídos insaturados, ésteres y compuestos saponificables, siendo el más abundante el ácido linoleico, cuya saponificación permitió obtener el linoleato de sodio (surfactante). Para caracterizar el linoleato de sodio obtenido, y cuantificar una de sus propiedades tensoactivas se construyó la curva de Tensión Superficial versus Concentración de Surfactante, que arroja una concentración micelar crítica (CMC) de 0,016 % p/v ($5,3 \times 10^{-4}$ M). Tales resultados demuestran que el aceite de Tocte es una fuente de compuestos

NOTAS DE AUTOR

Gavilanez-Alvarez Maritza : Tecnóloga Química, Licenciada en Ciencias de la Educación Mención Enseñanza de la Química, Doctora en Ciencias de la Educación Mención Enseñanza de la Química, Ingeniera Química, Maestría en Protección Ambiental de la ESPOCH (Escuela Superior Politécnica de Chimborazo) Ecuador, Maestría en Ingeniería Química en la ULA (Universidad de los Andes) Venezuela. Es profesora de la Escuela de Ingeniería Agronómica y la Escuela de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables de la ESPOCH.

Alvarado, José Gregorio : Ingeniero Químico y Maestría en Química Aplicada (Mención: Química Orgánica) de la Universidad de Los Andes (2005; 2012). Es profesor de la Escuela de Ingeniería Química de la ULA.

Cabezas-Arévalo, Ruth : Tecnóloga Química, Ingeniera Química (Escuela Superior Politécnica de Chimborazo) Ecuador, Diplomado Superior en Formulación y Evaluación de Proyectos de Investigación (Universidad de Cuenca) Ecuador, Maestría en Ingeniería Química en la ULA (Universidad de los Andes) Venezuela. Es profesora de la Carrera de Tecnología en Regencia en Farmacia del Instituto Tecnológico Superior Riobamba

Delgado-Linares, José Gregorio : Ingeniero Químico, Maestría en Ingeniería Química y Doctorado en Ciencias Aplicadas de la Universidad de los Andes (2000; 2006 y 2012) Post-doctorado en Colorado School of Mines (EE UU, 2012). Es profesor de la Escuela de Ingeniería Química de la ULA.

Rennola-Alarcón, Leonardo : Ingeniero Químico de la Universidad Simón Bolívar (1978), Maestría en Ingeniería Química y Agrícola en Colorado State University (EE UU, 1980). Es profesor de la Escuela de Ingeniería Química de la ULA.

tensoactivos, lo que representa un hallazgo importante al considerar que, para nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta análisis químico de este aceite.

PALABRAS CLAVE: aceite de tocte, *Juglansneotropica* Diels, surfactante, síntesis química, análisis químico.

ABSTRACT:

*Extraction and chemical characterization of Tocte (*Juglansneotropica* Diels) oil by using GC-ME chromatography allowed to identify a series of compounds of different organic families, such as: linear paraffins, olefins, alkenes, unsaturated aldehydes, and esters among others. The most abundant compound is the linoleic acid, whose saponification allowed to obtain sodium linoleate (surfactant). In order to characterize the sodium linoleate obtained, and quantify one of its surfactant properties, the Surface Tension versus Surfactant Concentration curve was constructed, yielding a critical micelle concentration (CMC) of 0.016% w/v (5.3×10^{-4} M). These results show that Tocte oil is a source of surfactant compounds, which represents an important finding when considering that, to our knowledge, this is the first time that chemical analysis of this oil is reported.*

KEYWORDS: "Tocte" oil, *Juglansneotropica* Diels, surfactant, chemical synthesis, chemical analysis.

1 INTRODUCCIÓN

La familia Juglandaceae está constituida por siete géneros (*Alfaroa*, *Carya*, *Eugelhardia*, *Juglans*, *Oreomunnea*, *Platycarya*, *Pterocarya*) que engloban alrededor de 60 especies vegetales distribuidas en Norte, Centro y Suramérica, Europa del Este y Asia (Roth 1991, Badillo 1985). En Suramérica una de las especies más prominentes de esta familia es *Juglansneotropica* Diels, también conocida como árbol de nogal, cuyo fruto, comúnmente conocido como tocte, consiste en una nuez cuya semilla (kernel) es rica en aceite (Ospina y col., 2003)

Estudios realizados a otras especies del género *Juglans*, entre ellas la especie *Juglans regia* L. (nativa de Asia central y la región occidental del Himalaya) (Fernández-López y col., 2000), han demostrado que el aceite de nuez posee un alto valor nutricional debido a que dentro de su constitución química destaca el alto contenido de ácidos grasos insaturados, principalmente ácido linoleico, oleico y linolénico (Martínez y col., 2010), vitaminas y minerales, además destaca por ser una fuente de una gran variedad de flavonoides y ácidos fenólicos de relevante importancia para la salud por sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias (Anderson y col., 2001, Carvalho y col., 2010). Por tal motivo, la especie *Juglans regia* L. se constituye en un cultivo de alto interés para la industria alimenticia.

Las investigaciones realizadas a la especie *Juglansneotropica* D. se han limitado a estudios de preservación y aprovechamiento de la madera, partes aéreas y frutos de la especie (Rave-Oviedo y col., 2013, Quintero- García y col., 2012), mientras que desde el punto de vista composicional se han realizado pocas investigaciones, cuyos resultados arrojan demuestran la actividad antioxidante de las hojas del árbol (Hurtado y col., 2015).

Aunque no existen reportes que demuestren la constitución química del aceite de nuez de esta especie, su ubicación taxonómica permite inferir que puede ser muy similar a la de la especie *Juglans regia* L., lo que sin duda constituiría un elemento de interés no solo para la industria de alimentos, sino también para la industria química encargada de la comercialización y síntesis de surfactantes, ya que hipotéticamente el contenido de moléculas saponificables en el aceite de nuez, como los ácidos grasos, puede ser considerable.

Las sales de sodio o de potasio de ácidos grasos son de gran utilidad en la industria del jabón, así como para la formulación de emulsiones en la industria alimenticia y farmacéutica debido a la no toxicidad del grupo lipofílico de la molécula (cola hidrocarbonada del ácido graso), en relación a aquellos que se derivan del petróleo (por ejemplo: alquilbencenosulfonatos de petróleo) (Salager y col., 1970, Becher 1972, Schawartz y col., 1977, Davidson y col., 1978).

En ese orden de ideas, el presente trabajo tiene por finalidad extraer y fraccionar el aceite de tocte para dilucidar por primera vez su composición, y aislar algunas especies químicas saponificables que permitan la obtención de jabón a partir de esta fuente natural.

2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 Recolección del Tocte

La recolección del tocte madurado se realizó en los alrededores de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Riobamba-Ecuador) en el mes de julio del año 2016. El fruto recolectado se expuso a la luz solar durante 7 días a temperatura ambiente para secar la corteza y facilitar su apertura.

2.2 Extracción del Aceite de Tocte

Medio kilogramo (0,5 kg) de semillas de tocte se sometió a molienda y posteriormente fueron secadas en una estufa durante cuatro días a 70°C. Seguidamente, el material seco y molido (0,42 kg) fue macerado con n-hexano durante cuatro días en un recipiente color ámbar. El líquido sobrenadante se dejó en reposo durante 24 horas para permitir la sedimentación de las partículas sólidas suspendidas, y luego de decantado se destiló en un rota- evaporador, obteniéndose 0,13 kg de aceite de tocte.

2.3 Fraccionamiento del Aceite de Tocte

El aceite obtenido por maceración se sometió a fraccionamiento a través de una cromatografía en columna (CC) sobre sílica gel (60-200 mesh), a partir de la cual se obtuvieron 3 fracciones (1, 2 y 3) empleando como eluyentes: n-hexano y mezclas de polaridad creciente constituidas por n-hexano/i-butanol en proporciones volumétricas 90/10 y 70/30 respectivamente. Cada fracción se sometió a un proceso de destilación en un rota- evaporador para eliminar el solvente, con lo cual se obtuvieron: 40,94 g de la fracción 1, 72,85 g de la fracción 2 y 16,21 g de la fracción 3.

2.4 Aislamiento e Identificación de los Constituyentes del Aceite de Tocte

El análisis de cada fracción obtenida por CC se realizó en un equipo Hewlett-Packard modelo 6890 serie II, provisto con una columna capilar HP-5 (5% fenil - 95% metil silicona) de 30 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interno, con un espesor de pared de 0,33 μm . Se utilizó Helio como gas portador, a un flujo de 1 ml/min. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: Temperatura inicial: 60 °C (0 min); temperatura final: 300 °C (10 min); gradiente de temperatura: 4 °C/min; temperatura del inyector: 250 °C. La identificación de los componentes se realizó mediante comparación computarizada de sus espectros de masas con los de la base de datos del equipo

(Librería Wiley, Sexta Edición y Nist 05).

2.5 Saponificación de los Ácidos Grasos obtenidos del Aceite de Tocte

Tres gramos (3 g) de la fracción 2 obtenida de la CC (rica en ácido linoleico, como se mostrará en la sección 3) se hicieron reaccionar con una solución de NaOH (1M) a 80°C con agitación constante. Seguidamente, la fase acuosa resultante se decantó y filtró por gravedad. Finalmente se secó en una estufa a 80°C durante 3 días. De este proceso se obtuvieron 0,21 g de linoleato de sodio.

2.6 Transesterificación de Ácidos Grasos del Aceite de Tocte

Una mezcla constituida por aceite de tocte, NaOH y metanol se calentó a reflujo con agitación constante durante 90 min. Los ésteres obtenidos se lavaron con HCl (5% v/v) para neutralizar el excedente de NaOH, seguido de una extracción en CH₂Cl₂ y posterior separación en un embudo de decantación. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se eliminó el solvente en un rota-evaporador.

2.7 Determinación de la Concentración Micellar Crítica (CMC) del Jabón Obtenido

Se prepararon diluciones acuosas del linoleato de sodio obtenido por saponificación y se midió la tensión superficial de cada dilución empleando el método del anillo de Du Nouy en un equipo Krüss-K100.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se determina el rendimiento en aceite obtenido a partir del tocte, que puede calcularse a través de la Ecuación 1:

$$\text{Rendimiento de la extracción del aceite de tocte} = \frac{m_{\text{aceite extraído (g)}}}{m_{\text{total de semillas (g)}}} * 100$$

$$\text{Rendimiento de la extracción del aceite de tocte} = \frac{130 \text{ g}}{420 \text{ g}} * 100 = 30,95 \% \quad (\text{Ecn},2)$$

Por otra parte, el cromatograma GC-ME mostrado en la Figura 1 (Tabla 1) da cuenta de la composición química del aceite de tocte. Se puede verificar la presencia de diversos compuestos pertenecientes a diferentes familias orgánicas, dentro de las que destacan: Parafinas lineales, terpenos (limoneno), alquenos, aldehídos insaturados y ésteres.

El primer aspecto a destacar es la ausencia aparente de ácidos grasos, resultado inesperado sobre todo considerando el perfil químico de otras especies pertenecientes al género *Juglans*, como *J. regia*. Debido a que los ácidos grasos pudieran estar presentes bajo la forma de triglicéridos, y además, algunas señales del cromatograma pudieran solaparse impidiendo la detección adecuada por parte del equipo, se procedió a transesterificar el aceite siguiendo la metodología antes expuesta, con la finalidad de verificar la presencia o no de ácidos grasos.

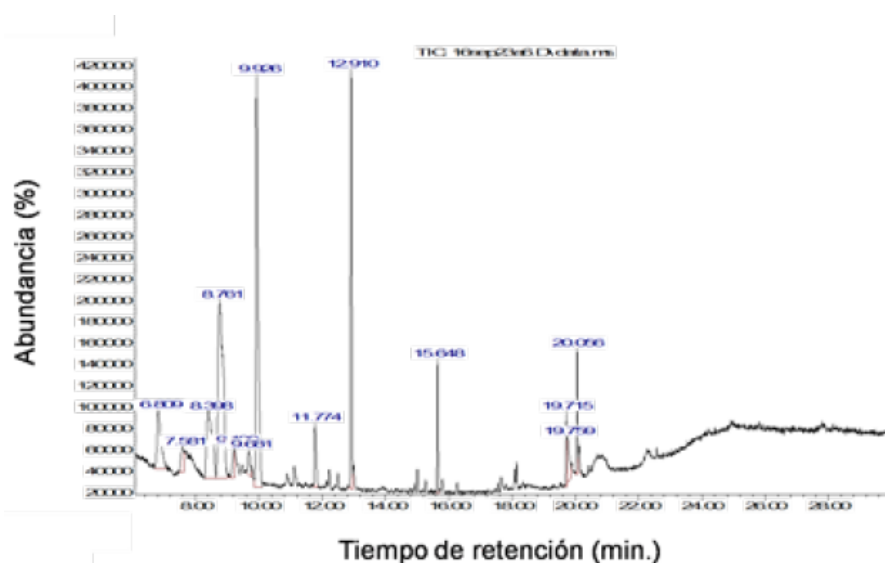


FIGURA 1.

Cromatograma GC-MS del aceite de Tocte obtenido por maceración con n-hexano.

TABLA 1.

Constitución química del aceite de Tocte. TR = tiempo de retención

Compuesto	T_R (min.)	Proporción en el aceite (% p/p)
Penten-3-ol	6,809	6,51
Hexen-3-ol	7,581	2,19
2E,4Z-Decadienal	8,398	10,51
2E,4E-Decadienal	8,761	25,48
Eicosano	9,199	1,81
Limoneno	9,681	1,72
Tetradecano	9,926	24,21
BHT (contaminante)	11,774	2,97
Hexadecano	12,910	13,34
Octadecano	15,648	3,18
Linoleato de metilo	19,715	4,96

El cromatograma del aceite transesterificado (Figura 2; Tabla 2) muestra los resultados obtenidos, destacando la presencia de linoleato de metilo (éster del ácido linoleico) y palmiato de metilo (éster del ácido palmítico), además del ácido linoleico y palmítico que comprueban la presencia de especies químicas saponificables en el aceite de tocte. En términos porcentuales el ácido linoleico y el linoleato de metilo representan aproximadamente el 85 % (p/p) de la muestra transesterificada, lo que indica que el ácido linoleico es el ácido graso más abundante en el aceite de Tocte.

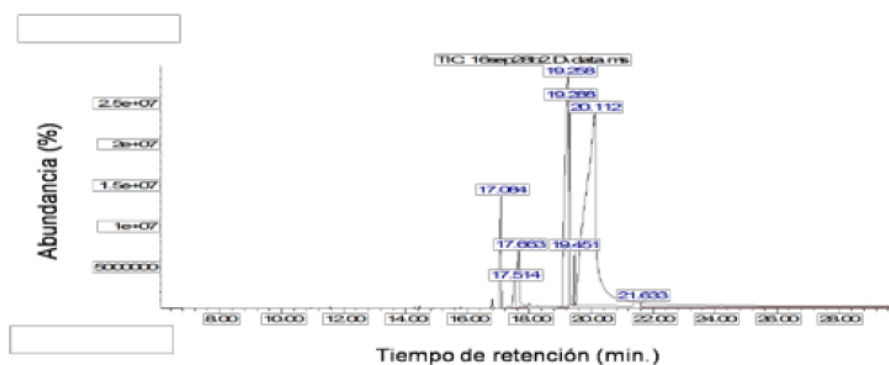


FIGURA 2.
Cromatograma GC-ME del aceite de Tocte transesterificado

TABLA 2.
Constitución química del producto transesterificado obtenido a partir del aceite de Tocte

Compuesto	TR (min.)	Proporción en la muestra Transesterificada (% p/p)
Palmiato de metilo	17,084	3,95
Acido palmítico	17,663	5,70
Linoleato de metilo	19,258	21,38
Oleato de metilo	19,288	4,20
Estearato de metilo	19,451	1,20
Ácido linoleico	20,112	63,57

El ácido linoleico contenido en el aceite de Tocte eluyó en las fracciones 1 y 2 obtenidas a través de la CC, cuyos cromatogramas GC-SE ME muestran en las Figuras 3 y 4. Las Tablas 3 y 4 muestran la composición química de cada fracción.

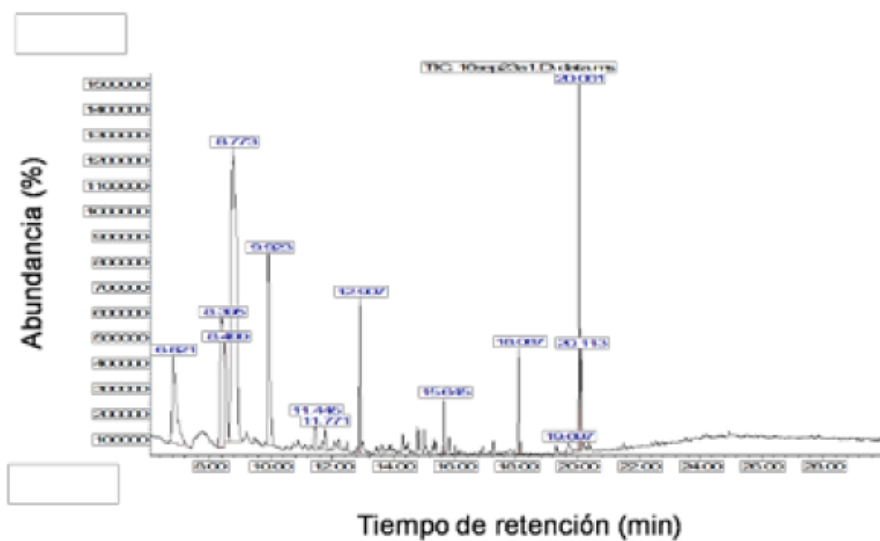


FIGURA 3.

Cromatograma GC-ME de la fracción 1 obtenida del aceite de Tocte a través de la CC.

TABLA 3.

Constitución química de la fracción 2 obtenida del aceite de Tocte a través de la CC

Compuesto	T _R (min)	Proporción en la fracción 1 (% p/p)
Dodecane	6.821	9,65
2E,4Z-decadienal	8.395	19,06
2E,4E-decadienal	8.773	39,75
Tetradecano	9.923	9,88
BHT (contaminante)	11.771	0,94
Hexadecano	12.907	4,24
Octadecane	15.645	1,12
Hexadecanoato de etilo	18.087	2,15
Ácido Linoleico	19.697	0,97
Linoleato de metilo	20.061	8,22
Butyl tiglate	20.113	2,45

En base a la masa de la fracción 1 (72,85 g) y de la fracción 2 (40,94 g), se calcula el rendimiento del ácido linoleico en el aceite de Tocte (Ecuación 2):

$$\text{Rendimiento (ác. lln. en aceite de tocte)} = \frac{72,85 \text{ g } (0,0097) + 40,94 \text{ g } (0,1002)}{130 \text{ g de aceite}} \cdot 100$$

$$= 3,7 \%$$

(Ecn,2)

Donde $x_{ac. \text{ lin.}}$ es la fracción másica del ácido linoleico en las fracciones 1 y 2 (Tablas 3 y 4).

$$\text{Rendimiento (ác. lln. en aceite de tocte)} = \frac{72,85 \text{ g } (0,0097) + 40,94 \text{ g } (0,1002)}{130 \text{ g de aceite}} \cdot 100$$

$$= 3,7 \%$$

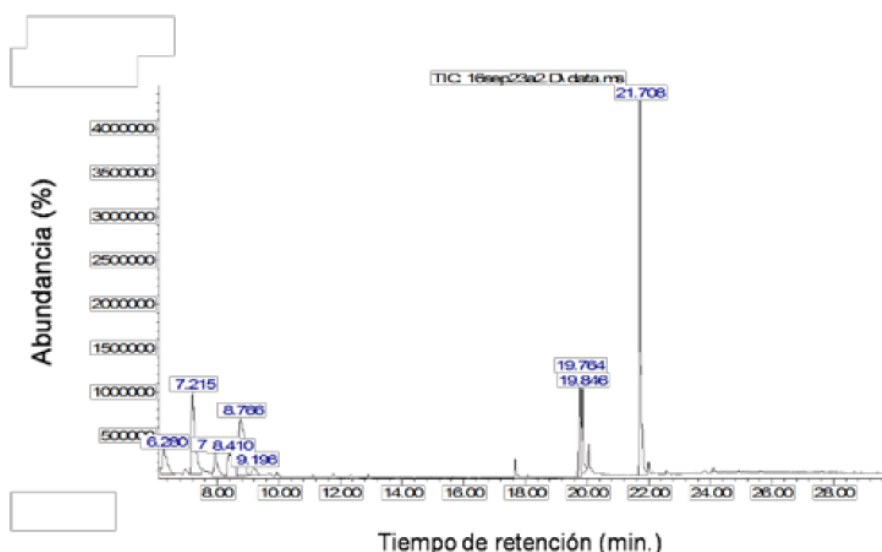


FIGURA 4.

Cromatograma GC-ME de la fracción 2 obtenida del aceite de Tocte a través de la CC.

TABLA 4.

Constitución química de la fracción 2 obtenida del aceite de Tocte a través de la CC

Compuesto	T _R (min.)	Proporción en la fracción 2 (% p/p)
Penten-3-ol	6,280	6,09
Hexen-3-ol	7,215	17,07
2E,4Z-Decadienal	8,410	7,52
2E,4E-Decadienal	8,766	17,45
Tetradecano	9,196	1,99
Acidolinoleico	19,764	10,02
Hexadecanoato de 2-metilpropilo	19,846	5,63
Linoleato de metilo	21,708	29,36

Asumiendo una relación molar 1:1 entre el ácido linoleico y el linoleato de sodio en la reacción de saponificación, este resultado muestra el rendimiento máximo en linoleato de sodio que es posible obtener a partir del aceite de tocte.

Este resultado es inferior al reportado en otros aceites, como el de avellana, nuez y pistacho (Kola y col., 2015), cuyo porcentaje en ácido linoleico es próximo al 12 %. Esto indica que el aceite de Tocte posiblemente no es la mejor fuente en ácido linoleico, pero si se constituye en una nueva fuente de ácidos grasos, y por tanto, una nueva fuente de materia prima para la síntesis de surfactantes iónicos.

La saponificación del ácido linoleico se realizó a partir de la fracción 2, debido, por una parte, a que su contenido en ácido linoleico es muy superior en relación al de la fracción 1, y por otra, a que el ácido linoleico es la única especie química saponificable en esta fracción.

La caracterización del linoleato de sodio obtenido por saponificación se realizó a través de la determinación de la concentración micellar crítica (CMC), cuya magnitud se obtuvo a partir de la curva Tensión Superficial versus Concentración de surfactante (Figura 5).

El primer aspecto a destacar es que el comportamiento de la curva es característico de especies químicas con propiedades anfífilas; a saber, un régimen descendente que indica el aumento de la cantidad de moléculas

adsorbidas en la superficie agua-aire en la medida que aumenta la concentración de surfactante, que supone la disminución progresiva de la tensión superficial, hasta una concentración crítica (CMC) a partir de la cual la superficie se satura y todas las moléculas adicionales se asocian en el seno del agua formando micelas. Por tanto, a partir de la CMC la tensión superficial no se modifica.

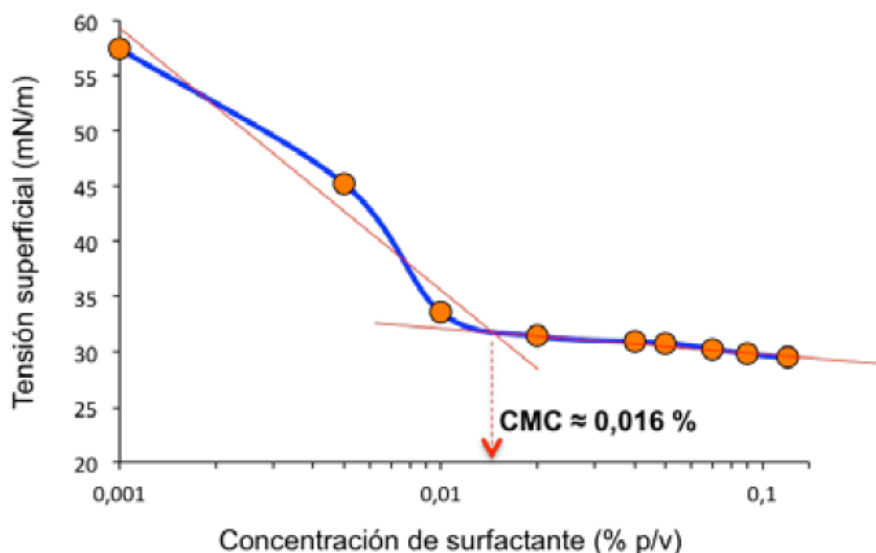


FIGURA 5.
Variación de la tensión superficial respecto a la concentración de surfactante en sistemas linoleato de sodio / agua

Experimentalmente la CMC se estima a partir del punto de corte entre ambos regímenes, que para el caso actual presenta un valor de 0,016 % p/v ($5,3 \times 10^{-4}$ M). El valor teórico de la CMC del linoleato de sodio a 20 °C en medio acuoso se puede estimar a través de la Ecuación 3 (Rosen, 2004):

$$\log CMC (M) = A - BN \quad (\text{Ecn},3)$$

donde A es una constante de la cabeza iónica del surfactante, B es una constante cuyo valor es aproximadamente 0,3, y N es el número de carbonos de la cola lipofílica del surfactante. Por lo tanto, para el linoleato de sodio se tendrá:

$$\log CMC = 1,85 - 0,3 (17)$$

$$CMC = 5,64 \times 10^{-4} M$$

El resultado obtenido refleja que el surfactante sintetizado corresponde al linoleato de sodio. Además, se debe destacar que la CMC de este surfactante es un orden de magnitud inferior a las correspondientes a surfactantes con grupo polar carboxilato de sodio con longitud de cadena más corta (Rosen 2004), que evidencia un carácter lipofílico mayor del linoleato de sodio, y por tanto mayor tendencia a la asociación en medio acuoso.

Adicionalmente, se debe destacar que el valor experimental de la CMC obtenido en este trabajo es superior a los reportados por Tookey y col. (1958) y Gebicki y Allen (1969); que oscilan entre $2,25 \times 10^{-4}$ M y

$1,7\text{-}2,9 \times 10^{-4}$ M respectivamente, partiendo de linoleato de sodio comercial. La discrepancia entre estos resultados y el presentado aquí, obedece posiblemente a la presencia de una pequeña fracción de los alcoholes penten-3-ol y hexen-3-ol en el producto obtenido por saponificación, que forman parte de la constitución química de la fracción de aceite de tocte empleada para tal fin (Figura 3; Tabla 3). Estas especies químicas al ser lipofílicas aumentan la solubilidad del linoleato de sodio en el agua, por lo que su tendencia a la asociación disminuye, y por tanto la proporción necesaria para formar micelas es ligeramente superior.

4 CONCLUSIONES

Por primera vez se reporta la constitución química del aceite de tocte (*Juglansneotropica*Diels), caracterizada por la presencia alquenos, aldehídos, parafinas, terpenos y ácidos grasos (fundamentalmente ácido linoleico), que le confieren a esta especie vegetal un importante valor alimenticio y comercial que trasciende de su uso como materia prima de la industria maderera, debido a la presencia de especies químicas saponificables de interés para la industria química y alimenticia.

La caracterización del surfactante obtenido por saponificación demostró que la especie sintetizada corresponde al linoleato de sodio, cuya concentración micelar crítica ($5,3 \times 10^{-4}$ M) es similar a la reportada en estudios anteriores.

REFERENCIAS

- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM, 2001, Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation, *J.Nutr.*, 131, pp.2837–2842.
- Badillo V, Schnee L, Benítez C, 1985, Clave de las familias de Plantas Superiores de Venezuela. Editorial Espasand Editores, Caracas.
- Becher P, 1972, Emulsiones: Teoría y Práctica, Editorial Blume, Madrid.
- Carvalho M, Ferreira PJ, Mendes VS, Silva R, Pereira JA, Jerónimo C, 2010, Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglansregia* L, *Food Chem Toxicol*, 48, pp. 441–447.
- Davidson A, Mildwidsky B, 1978, Synthetic Detergents, Halsted Press, New York.
- Fernández-López J, Aleta N, Alías R, 2000, Forest Genetic Resources Conservation of *Juglansregia* L. IPGRI, Rome.
- Gebicki JM, Allen AO, 1969, Relationship between Critical Micelle Concentration and Rate of Radiolysis of Aqueous Sodium Linoleate, *Journal of Physical Chemistry*, 73, pp. 2443-2445.
- Hurtado P, Jurado B, Ramos E, Calixto M, 2015, Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglansneotropica*Diels (nogal peruano), *Rev. Soc. QuímPerú*, 81, pp. 283-291.
- Kola O, Duran H, Ozer M, Fenercioglu H, 2015, Fatty acid profile determination of cold pressed oil of some nut fruits, *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 92, pp.107-111
- Martinez M, Labuckas DO, Lamarque AL, Maestri D, 2010, Walnut (*Juglansregia*L.): genetic resources, chemistry, by-products, *J Sci Food Agric.*, 90, pp. 1959–1967.
- Ospina P, Hernández R, Aristizábal F, Patiño J, Salazar J, 2003, El cedro Negro: Una Especie Promisoria de la Zona Cafetera, *Cenicafé, Boletín técnico* N° 25, Caldas- Colombia.
- Quintero-García OD, Jaramillo-Villegas S, 2012, Rescate y germinación in vitro de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglansneotropica*Diels), *Acta Agron.*, 61, pp. 52-60.
- Rave-Oviedo SY, Montenegro-Ríos M, Ligia J, Molina- Rico LJ, 2013, Caída y descomposición de hojarasca de *Juglansneotropica*Diels(1906) (*Juglandaceae*) en un bosque montano andino, Pijao (Quindío), Colombia, *Actu. Biol.*, 35, pp. 33-43.
- Rosen MJ, 2004, Surfactants and Interfacial Phenomena, Tercera Edición. Editorial: Wiley-Interscience, New York.
- Roth I, 1966, Anatomía de las plantas superiores. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

- Salager JL, Bourrel M, Schechter R, Wade W, 1970, Mixing Rules for Optimum Phase-Behavior Formulations of Surfactant/Oil/Water Systems, SPE Journal, 19, pp. 271- 278.
- Schwartz AM, Perry JW, Berch J, 1977, Surface Active Agents and Detergents, Vol. II R. Krieger Pub. Co., New York.
- Tookey HL, Wilson RG, Lohmar RL, Dutton HJ, 1958, Coupled oxidation of carotene and linoleate catalyzed by lipoxidase, J. Rid. Chem., 230, pp. 65-72.