Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Nuevo método para investigar la presencia de tuyona - de ajenjo u otros aceites esenciales - en bebidas alcohólicas, basado en la cromatografía de su 2-4-Dinitrofenilhidrazona

Cortina, Beatriz Raquel

1954

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Cortina, Beatriz Raquel. (1954). Nuevo método para investigar la presencia de tuyona - de ajenjo u otros aceites esenciales - en bebidas alcohólicas, basado en la cromatografía de su 2-4-Dinitrofenilhidrazona. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0798_Cortina.pdf

Cita tipo Chicago:
Cortina, Beatriz Raquel. "Nuevo método para investigar la presencia de tuyona - de ajenjo u otros aceites esenciales - en bebidas alcohólicas, basado en la cromatografía de su 2-4-Dinitrofenilhidrazona". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1954. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0798_Cortina.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

NUEVO METODO PARA INVESTIGAR LA PRESENCIA DE TUNGA - DE ARENGA U OTROS ACEITES ESENCIALES - EN BEBIDAS ALCOHOLICAS, BASADO EN LA CROMATOGRAFIA DE SU 2-4-DINITROFENILHIDRAZONA

TESIS: 798

Tesis presentada por

Beatriz Raquel Certina

para obtar al título de Doctora en Ciencias Químicas

- 1954 -

Tesis 798

FCEFN-BA.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Resumen de la Tesis

"NUEVO METODO PARA INVESTIGAR LA PRESENCIA DE TUYONA (DE AJENJO U OTROS ACEITES ESENCIALES) EN BEBIDAS ALCOHOLICAS BASADO EN LA CROMATOGRAFIA DE SU 2-4 DINITROFENILHIDRAZONA"

Dirigida por el Dr. A.L.Montes

Res. de Tesis 798

- 1954 -

FCEFN-BA.

A- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

I) El problema higiénico-social del ajenjo y sucedáneos en el exterior y en el país.

II) Aceites esenciales que contienen tuyona y otros componentes carbonílicos, de uso vinculado al ajenjo.

III) Características físico-químicas y farmacológicas de las tuyonas, pinocanfona; fencona, carvona, anetol y anisaldehido.

IV) La cromatografía en sus aplicaciones generales y analíticas en especial. Antecedentes sobre su aplicación en el estudio de los aceites esenciales.

B- TRABAJO EXPERIMENTAL

I) Aplicación de la Reacción de Legal.

II) Preparación de 2-4-dinitrofenilhidrazonas de las tuyonas y otros componentes carbonílicos de aceites esenciales y su cromatografía.

Preparación de series "tipo" para determinaciones cuantitativas.

III) Aislación de los aceites esenciales de las bebidas alcohólicas para investigar tuyona y técnica aplicada para obtener los derivados y efectuar la cromatografía.

IV) Cromatografía de los derivados obtenidos del ajenjo, salvia officinalis, tanaceto, hisopo, hinojo, anís, anetol y sus mezclas.

V) Sensibilidad del método propuesto. Incompatibilidades y alcance.

VI) Conclusiones.

----------0----------

FCEFN-BA.

I) El ajenjo (Artemisia Absinthium) es considerado la más perniciosa de todas las bebidas, no sólo por sus efectos fisiológicos (provoca epilepsia y tuberculosis) sino también por la seducción irresistible que produce en el bebedor.

Diferentes autores están de acuerdo en asignar esa acción tóxica del ajenjo a un compuesto integrante del aceite esencial: la tuyona.

Existen otros aceites esenciales, agrupados bajo el nombre de"bebidas epileptógenas", tales como :hisopo, romero, hinojo y salvia, que provocan transtornos semejantes a los de tuyona.

El vermouth posee diversas sustancias vegetales que integran su composición aromática, entre ellas se encuentra principalmente el ajenjo.

Teniendo en cuenta la peligrosa acción del ajenjo, los gobernantes de muchas naciones y especialmente de Francia, se preocuparon en tratar de prohibir su consumo. Aparecieron así numerosas leyes y decretos, y una de las más importantes es la Ley francesa del 17 de julio de 1922.

La prohibición se extendía también a los licores similares, entendiéndose por tales, a todas las bebidas cuyo sabor y olor dominantes son semejantes al anís y que dan por adición de siete volúmenes de agua destilada, una turbidez.

En nuestro país se dió a conocer en 1935 la Ley Nº 12.148 que en su artículo 46 establece: "queda prohibida la fabricación, venta o posesión del ajenjo o bebidas similares que lo contengan".

En los últimos años, en Alemania, se ha llamado también la atención sobre la toxicidad de esas esencias afin de clasificarlas correctamente en la farmacopea.

Considerando la importancia de evitar el uso de esos tóxicos, hemos tratado de estudiar, en esta Tesis, una nueva técnica que por su sensibilidad, permita hallarlos aún en pequeñísimas cantidades.

II) La tuyona se encuentra extensamente distribuída en forma de dos isómeros: alfa-tuyona, en aceite de tuya y en salvia officinalis; beta-tuyona, en aceite de tanaceto y en ajenjo.

El hisopo: posee principalmente l-pinocanfona (50%).

El hinojo: sus constituyentes fundamentales son anetol y estragol en una proporción del 70 a 90%.

El anís: el 80 al 90% de su composición está formada por anetol.

La salvia: componentes predominantes: tuyona y alcanfor.

El tanaceto: posee principalmente beta-tuyona, alcanfor y borneol.

III) Tuyona: naturalmente presenta dos diastereoisómeros en equilibrio dinámico. Le corresponde un P.E.=75°. Para aislarla existen diferentes métodos: formación de semicarbazona y descomposición con anhídrido ftálico; preparación del compuesto bisulfítico y luego regenerarla con álcali; formación de derivados bromados obtención de hidrazonas. Por oxidación dan ácido tuyacetónico.

Pinocanfona: obtenida por destilación fraccionada del aceite de hisopo. Posee un P.E.=212°.

Fencona: cetona relativamente estable e inerte, poco atacada por hidrácidos; el ácido nítrico puede producir su degradación parcial.

Carvona: es rápidamente atacada por agentes oxidantes; da derivados halogenados; por acción de la luz produce un compuesto llamada alcanfor-carvona.

Anetol: muy insoluble en agua; por acción de la luz y el aire forma una masa viscosa, amarilla.

Anisaldehido: se obtiene por oxidación del anetol, se caracteriza por su bajol

IV) Las primeras experiencias en el análisis cromatográfico, se debieron a Tswett (1906), actualmente se cree que existieron antes otros investigadores.

Sucede un período de latencia hasta 1931 y desde allí comienza su aplicación a numerosos trabajos, usando diversas técnicas, con resultados excelentes.

Su adaptación a los aceites esenciales es relativamente reciente y se trata de un asunto bastante complicado, pues se encuentran componentes diferentes.

El Dr.A.L.Montes, en diversos trabajos llegó siempre a muy buenos resultados.

El empleo del "chromatostrip"y "chromatobar" han resuelto varios problemas.

La cromatografía sobre papel, fundamento de este trabajo, es un método muy cómodo, sencillo y que como se verá pemite llegar a buenas conclusiones.

----------0----------

I) Legal, sobre un destilado especial usa como ractivo una solución de nitroprusiato de soda al 10%, que si bien da un resultado positivo con la tuyona no evita las interferencias del hisopo e hinojo.

II) El extracto etéreo de esencia se trata con una determinada cantidad de solución alcohólica-sulfúrica de 2-4-dinitrofenilhidrazina. El precipitado de 2-4-dinitrofenilhidrazona se separa al día siguiente y se disuelve en dos ml.de mezcla benceno-ligroína.

Para los cromatogramas se usan tiras de papel Whatman 120, de 15/220mm. y se dejan ascender las soluciones por capilaridad hasta 8cm.; una vez secas las tiras se colocan en tubos conteniendo 2ml. de ligroína y el desarrollo llega hasta los 18cm. en atmósfera saturada de disolvente.

Las series de tiras "tipo" se obtienen procediendo de la misma manera que antes, pero trabajando con diferentes concentraciones.

III) Se probaron varios métodos para la aislación de las esencias pero sólo se obtuvo buenos resultados,cuando se trata el licor con éter de petróleo liviano y solución de ClNa (saturada); se agita y se separa el extracto etéreo.

IV) El mismo proceso de aislación y cromatografía de tuyona, se aplica a las demás esencias. Se obtienen cromatogramas semejantes a los de tuyona con ajenjo,tanaceto, salvia officinalis e hisopo. Se prepararon diez mezclas con las diferentes esencias.

V) El método propuesto da una apreciación correcta de variacones menores de 0,005g%ml. en el contenido de tuyona.

Como por esta técnica no puede diferenciarse la tuyona de la pinocanfona (hisopo) se efectuó una cromatografía en columnas de ácido silícico y bentonita. Se determinó el Rf y como resultados finales se obtuvo: Rf tuyona:0,47; Rf hisopo:0,31.

VI) La cromatografía de las 2-4-dinitrofenilhidrazonas es un método sencillo, de gran sensibilidad.La única interferencia obviando las de fencona,carvona y anisaldehido es la de pinocanfona que se pone de manifiesto por determinaciones del Rf.

Adolfo L. Juvonte ---------0--------- Beatriz B. Catena

A MIS PADRES:

Lleve esta dedicatoria de la última labor estudiantil, el resumen de la gratitud que siempre guardé para aquellos que hicieron posible mi existencia y mi graduación tanto anhelada, la que ofrezco como agradecimiento a todos sus sacrificios. A mi querida madre un recuerdo especial por su constante aliento y apoyo cariñoso. A Dios, inspirador de todos mis actos, le doy gracias por la enorme satisfacción de compartir con ellos momentos de tanta alegría.

TRABAJO DE TESIS DIRIGIDO POR EL

PROFESOR Dr. ADOLFO L. MONTES

Quiero reconocer aquí la deuda de gratitud contraída por mí con el Dr. Adolfo L. Montes por haberme suministrado el plan de este trabajo y guiado en el transcurso del mismo. Poniendo de manifiesto una vez más sus relevantes condiciones científicas.-

SEÑORES PROFESORES:

Al cumplir con este requisito reglamentario, lo hago con la satisfacción de haberlo realizado en la Cátedra de Bromatología y Análisis Industriales. Además he tratado de estudiar un problema que interesa a las dependencias Fiscales, por medio de una técnica sencilla en su aplicación y de resultados excelentes.

Por consiguiente, tengo el agrado de dirigirme a los Señores Profesores con el objeto de elevar a vuestra consideración el presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas.-

- I N D I C E G E N E R A L -

Página

A.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

I) El problema higiénico-social del ajenjo y sucedáneos en el exterior y en el país. 1

II) Aceites esenciales que contienen tuyona y otros componentes carbonílicos, de uso vinculado al ajenjo. 11

III) Características físico-químicas y farmacológicas de: Tuyona- Pinocanfona- Fenona- Carvona- Anetol- Anisaldehido. 15

IV) La Cromatografía en sus aplicaciones generales y analíticas en especial. Antecedentes sobre su aplicación en el estudio de los aceites esenciales. 34

B.- TRABAJO EXPERIMENTAL

I) Aplicación de la Reacción de Legal 46

II) Preparación de 2-4-dinitrofenilhidrazonas de las tuyonas y otros componentes carbonílicos de aceites esenciales y su cromatografía. Preparación de series "tipo" para determinaciones cuantitativas. 49

III) Aislación de los aceites esenciales de las bebidas alcohólicas para investigar tuyona y técnica aplicada para obtener los derivados y efectuar la cromatografía. 52

IV) Cromatografía de los derivados obtenidos del ajenjo, salvia officinalis, tanaceto,

Página

hisopo, hinojo, anís, anetol, y sus mezclas 56

V) Sensibilidad del método propuesto. Incompatibilidades y alcance. 58

VI) Conclusiones. 63

Bibliografía. 64

———————o———————

A - ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

I) El problema higiénico-social del ajenjo y sucedáneos en el exterior y en el país

Mucho se ha escrito con respecto a la toxicidad de la Artemisia Absintium,tanto,que a principios de este siglo fué un tema, a menudo usado por historiadores y novelistas.

Su consumo como licor de ajenjo (bebida preparada a base de esencia de Artemisia Absintium fundamentalmente) fué tan abusivo en Francia,que en determinado momento llegó a temerse por la salubridad de la población.

Laborde (1) en una exposición ante la Academia de Medicina de París,manifestó: "todos los higienistas, todos los médicos, todos los químicos, han considerado la cuestión del ajenjo como un caso particular del absintismo. Todos están de acuerdo en declarar que el ajenjo es la más perniciosa de todas las bebidas,no solamente por sus efectos fisiológicos,sino por la seducción irresistible que ella produce sobre el bebedor, al cual le vuelve loco y criminal,provoca la epilepsia y tuberculosis".

Tan grave fué la preocupación delGobierno Francés ante el consumo ilimitado de dicha bebida, que en el año 1902 (2) el Presidente del Consejo de Ministros de Francia planteó la preocupación del Estado,a la Academia de Medicina de París, la que encargó el estudio del problema a una comisión compuesta por: Brenardel, Lancereaux, Cornil, Magnan, Gabriel Pouchet,Hotel Joffro y Laborde.

Basta enunciar dichos nombres para darse cuenta que esa comisión contaba en su seno con los representantes más caracterizados de la cultura científica francesa, de la época, y los más capacitados para emitir una opinión terminante y respetable, sobre un asunto tan complejo por sus diferentes aspectos clínicos, anatomo-patológicos, químicos y sociales.

Dicha comisión realisó una serie de experimentaciones fisiológicas y basándose también en el resultado de observaciones clínicas,

encontró que el ajenjo provocaba dos clases de síntomas, ya sea cuando se ingerían grandes dosis, provocaba delencias serias pero pasajeras, o bien cuando el uso era contínuo y moderado, daba lugar a enfermedades crónicas.

El primer caso,llamado "absintismo agudo" (3): es una intoxicación que se traduce por la ebriedad y por fenómenos convulsivos bastantes semejantes a la histero-epilepsia; es decir,fenómenos que en su mayor parte interesan al sistema nervioso, tales como:vértifos, dificultad en la marcha y ligera exuberancia de palabras.

Este complejo sintomático es ,sin duda alguna,debido a la acción del alcohol, viniendo luego los efectos de las esencias. Entonces, los sujetos caen con rapidez en accesos clónicos. La fase tónica muy corta, se manifiesta por la pérdida de conocimiento en la caída, por rigidez de los músculos de la región posterior del cuello, dando lugar a una especie de opistótonos muy semejante al que se observa en el tétano y en el envenenamiento por estricnina.

La segunda fase se traduce por sacudidas clónicas desordenadas y ordinariamente simétricas de los miembros, con torsión del tronco y de la pelvis hacia adelante. Cada acceso es seguido de un período de calma relativa, después del cual las convulsiones desaparecen,durando el ataque más o menos una hora, terminando luego.

Pasado todo esto, el enfermo continúa fatigado durante cierto tiempo,en él, presenta algunos trastornos de la sensibilidad general. Por muchos días persiste una ligera anoxeria y algunos trastornos digestivos, para regresar a la normalidad. En algunos casos son tan intensas las convulsiones, que pueden terminar en la muerte.

El "absintismo crónico" permite observar vértigos,dificultad en la marcha,locuacidad, facies alcohólicas, extremidades frías, tristeza y melancolía,trastornos del funcionamiento gastrointestinal, alteraciones nerviosas de la sensibilidad y de la motricidad, hiperalgesias, disestesias, anestesias, desórdenes sensoriales.

Estos fenómenos varían según el hábito del sujeto: rápidamente, en los individuos que hacen uso abusivo del ajenjo; y lentamente en los que beben con cierta moderación.

Los diversos autores están de acuerdo en asignar la acción tóxica del ajenjo a un compuesto integrante del aceite esencial: la tuyona; así Florey (4) ha efectuado experiencias acerca de su acción convulsionante, observando que después de la administración de la tuyona, se produce primero un descenso de la presión sanguínea (debido a la acción directa sobre el músculo cardíaco) seguido de un ascenso por su acción vasomotora.

Por su parte, Proper (5) trabajando sobre perros observó que la administración intravenosa de la esencia de ajenjo produce más fácilmente convulsiones epilépticas, que en inyección occipital o introducida directamente en la región cortical del cerebro. Explica dicho fenómeno, indicando que la sustancia activa es llevada por la sangre circulante, repetidamente a las células cerebrales, produciendo en cada ciclo una convulsión distinta.

Lincoln (6) examinando el cerebro de gatos y conejos, luego de haber sufrido convulsiones epilépticas, producidas por la administración de tuyona, ha encontrado que las lesiones están localizadas en la corteza cerebral.

No solo el ajenjo produce convulsiones por ingestión, existen también otras esencias que provocan esos transtornos, y se las agrupa como bebidas epileptógenas.

Entre ellas pueden mencionarse: hisopo, romero, hinojo y una variedad de salvia. Según algunos autores la salvia, es más tóxica que el ajenjo.

La cantidad de sustancia necesaria para producir convulsiones en animales difiere según la esencia, así por ejemplo se necesitan: salvia 10mg.; ajenjo 25mg.; hisopo 31mg.; romero 62mg.; hinojo 83mg(7)

Son también dignas de especial atención las esencias que utilizan en la elaboración del vermouth. En primer término las sumidades

de ajenjo desecadas, luego corteza de naranjas amargas, corteza de quina, acacia, etc. y para perfumarlo se usan líquidos extractivos alcohólicos de nuez moscada, claves de especias, risoma de lirio de Florencia y otros. Su tenor espirituoso es variable llegando hasta el 30 %.

Si se realiza un detenido estudio de las fórmulas y recetas destinadas a la elaboración del vermouth, se ve que en su mayoría están integradas por los mismos componentes vegetales, variando únicamente su cantidad, siendo dable destacar que en muchas de ellas interviene la Artemisia Absintium.

En su país de origen el nombre genérico de Vermuth correspondía al ajenjo y el verthwein (vino vermouth) al vino aromatizado con ajenjo y otras hierbas. Pero, fué en Italia donde el vermouth tomó carta de ciudadanía, radicándose en Turín la más grande industria iniciada en 1786 por Antonio Benedetto Carpano (8) con cuyo nombre es conocido hoy un tipo especial de vermouth. A partir de entonces y sobre todo desde el año 1838 no solo se difundió por toda Italia y Europa, sino que también llegó a América, creciendo continuamente su demanda.

Hoy son numerosísimos los establecimientos, distribuídos en todo el mundo, que se dedican a la preparación de este producto, tratando de imitar las condiciones del típico vermouth de Torino.

Elaborado el vermouth en forma "clásica" es sin duda, una de las bebidas más complejas que se hayan creado. De idea de ello la diversidad de sustancias vegetales que integran su composición aromática.

En el cuadro siguiente menciono las características más sobresalientes de los vegetales que principalmente se utilizan en la preparación del extracto para la elaboración del vermouth.

Las partes empleadas, de los mismos, son: Sumidades floridas, hojas, almendra (semilla), orquídeas semillas, hojas y flores, corteza, hojas y flores; raíces; flores y frutas; según el orden establecido en el cuadro mencionado.

Nombre vulgar	Nombre científico	Composición química
orégano	Origanum vulgare	carvacrol-alcaloides
coca	Erytroxilos coca	alcaloides de la coca
nuez moscada	Myristica fragans	resina-ac.esen.-almidón
vainilla	Vainilla flanifolia	vainilina-goma-grasa
hinojo	Foenículum vulgare	azucar-ac.esen.-ac.fijo
hisopo	Hyssopus officinalis	aceite esencial
canela	Cinnamomum zeylanic	azúcar-ald.cinámico-cug.
ajenjo	Artem.Absinthium	absintina-tuyona
genciana	Gentiana lutea	taninos-glucosa-grasa
lúpulo	Humulos lupulos	mircno-humulius

Muy extenso sería mencionar todos los componentes aromáticos del vermouth, tarea que no corresponde a este trabajo, pero por lo menos he querido señalar los principales, pues me servirán de antecedentes, en el estudio legislativo que haré a continuación.

Teniendo en cuenta la perniciosa acción que ejerce el ajenjo sobre las personas que lo ingieren, fué una constante preocupación de los gobernantes, el tratar de restringir primero, y prohibir más tarde su consumo. Nacieron así las campañas de lucha contra el alcoholismo y el consumo de ajenjo, especialmente en aquellos países donde su consumo estaba muy arraigado en las costumbres populares.

Una de las primeras medidas adoptadas tendientes a prohibir el uso del ajenjo fué sancionada en Bélgica, por la Ley del 25 de septiembre de 1906 (9) prohibiendo la venta del ajenjo (como licor) y bebidas similares que lo contengan, siguiéndole luego Holanda por la Ley del 6 de septiembre de 1909; Suiza, por la Ley del 24 de junio de 1910; y Rusia por Ley del año 1914.

En Francia, donde su consumo había alcanzado cifras elevadas, comenzó una activa campaña tendiente a limitarlo y apareció la Ley del 30 de enero de 1907 por la cual se cobraba una sobretasa de 30 francos por hectolitro de alcohol, destinado a la elaboración de bebidas no deseables (ajenjo y similares).

Pero fué radicalmente eliminado del consumo, al ser declarada la primera guerra mundial, merced a las siguientes sanciones: Por Decreto del 16 de agosto de 1914 que prohibía la venta del ajenjo en todo el país; luego, por Decreto del 5 de octubre del mismo año se extendió la prohibición a los productos similares de ajenjo, pero recién alcanzó verdadera jerarquía su prohibición, al sancionarse la Ley del 16 de marzo de 1915 (10).

Esta última Ley prohibe la fabricación y venta (al por mayor o menor) y de ese modo la circulación del ajenjo y licores similares, considerados ya por el artículo 15 de la Ley del 30 de enero de 1907 y el artículo 17 de la ley del 26 de diciembre de 1908.

Pero se tenía duda sobre el cumplimiento regular de ese decreto, pues los países aliados no lo consideraban valedero, mientras durasen las hostilidades.

Por esta causa se dió una nueva Ley el 17 de julio de 1922, que establece:

Artículo 1°: "Se prohibe la fabricación, la venta por mayor y menor, así como la circulación del ajenjo y licores similares, vistos por el artículo 15 de la Ley del 30 de enero de 1907.

Un decreto fija los caracteres que permitirá reconocer los licores comprendidos dentro de la presente Ley.

Las contravenciones al primer punto del presente artículo serán castigadas, a requerimiento de la administración de contribuciones indirectas; esas penas fiscales ya previstas en el artículo 1° de la Ley del 28 de febrero de 1872 y en el artículo 19 de la Ley del 30 de enero de 1907, establecen una multa que oscila entre 16 y 500 francos.

Las infracciones a la presente Ley serán afectadas y constatadas como materias de fraudes y falsificaciones".

Artículo 2°: "La presente Ley es aplicable a Argelia, a las colonias y a los protectorados".

Completando los términos del Decreto del 24 de octubre de 1922,

tomado para la aplicación de la Ley del 17 de julio de 1922, deberán considerarse como licores similares, a todas las bebidas cuyo sabor y olor dominante son semejante al anís y que dan, por adición de cuatro volúmenes de agua destilada, a 15°C una turbidez que no desaparece completamente por el agregado de otros tres volúmenes de agua destilada.

También deberán ser igualmente considerados como licores similares, las bebidas aniseadas que no dan turbidez por la adición de agua en las condiciones ya fijadas, pero que poseen una esencia estónica y especialmente las siguientes esencias: Ajenjo, tanaceto y carvena; así como los espíritus aniseados que presentan un grado alcohólico superior a 40° con menos de 150 gr. de azucar por litro.

La Ley prohibe de una manera absoluta la fabricación del ajenjo y similares destinados a la consumición.

El 15 de diciembre de 1922 el Ministro de Agricultura, ordena una circular, cuyo punto de vista es más general y señala el modo de operar en la adición de los siete volúmenes de agua.

Idéntica medida fué tomada en Estados Unidos de Norte América y Estados Unidos del Brasil (11).

En nuestro país las primeras reglamentaciones se basarón en la ley francesa del 30 de enero de 1907 y así por Ley N° 9470 (12) del año 1914, se estableció un recargo impositivo del 70 % (con respecto a otras bebidas alcohólicas); por Ley N° 9647 rigió un impuesto diez veces mayor al de las demás bebidas y finalmente mediante la Ley N° 11.252 se elevó el impuesto del ajenjo a $ 9.— por litro.

En el año 1935 se sancionó la Ley N° 12.148 (13) la que inspirada en la Ley N° 1922 (francesa), en su artículo 46 establece: "Queda prohibida la fabricación, venta o posesión del ajenjo o bebidas similares que lo contengan".

Siendo necesario fijar una norma general para la aplicación de ese precepto y atento a lo informado por la Dirección de las Oficinas Químicas Nacionales y por la Administración General de Impuestos

Internos:

El Presidente de la Nación Argentina (A.P. Justo) decreta:

Artículo 1º: "A los efectos establecidos por el Art. 46 de la Ley Nº 12.148 se clasificarán como similares del ajenjo, las bebidas alcohólicas cuyo olor y saber dominantes sean los del anís y que den por adición de cuatro volúmenes de agua destilada a 15ºC, gota y lentamente, un enturbiamiento que no desaparezca completamente por una nueva agregación de tres volúmenes de agua destilada".

Artículo 2º: "Se considerarán igualmente como similares del ajenjo, las bebidas anisadas que no den enturbiamiento por adición de agua, en las condiciones fijadas en el artículo anterior, pero que contengan una esencia estéfica".

Artículo 3º: "Quedan incluídas en dicha prohibición las bebidas cuyos nombres tengan similitud con la palabra ajenjo o sus similares, en idioma nacional o extranjero, o que tengan referencias directas o indirectas a tales productos".

Artículo 4º: "No estarán comprendidas en ellas las bebidas de anís (aguardientes anisado, anís o licor de anís, aniseth) aún cuando fuera positiva la prueba de entrubiamiento a que se refiere el Art. 1º, siempre que fueran incoloras y no alcanzadas por lo que estipulan los Art. 2º y 3º?

Artículo 5º: "La Dirección de Oficinas Químicas Nacionales será la encargada de la clasificación de tales productos con el objeto de determinar si están o no comprendidos en la mencionada disposición legal.

Queda igualmente facultada para fijar los métodos oficiales de análisis a los fines de este Decreto".

Artículo 6º: "Los fabricantes o importadores deberán presentar a la Administración General de Impuestos Internos, dentro de los quince días de la fecha, una lista de los productos que por cualquier circunstancias pueda presumirse que se hallan comprendidos en la prohibición, acompañado sus muestras en envases de venta y deter-

minado su análisis tipo. Al mismo tiempo dejarán de producirlos y venderlos. Conjuntamente con esta lista declararán sus existencias en este momento para su intervención inmediata.

Si la Oficina Química los clasifica como de elaboración o expendio prohibido, se eliminarán del registro oficial sin más trámite y se derramarán las existencias que el licorista no optará por destilar y recuperar el alcohol, acreditándose el impuesto de bebida alcohólica pagado, si corresponde.

Artículo 7º: "Una vez eliminados por la Administración de sus padrones todos los productos que la Dirección de Oficinas Químicas incluya en la prohibición , publicará su nómina en la prensa diaria por el término de cinco días, para los poseedores de ellos en el comercio declaren sus existencias dentro de los quince días siguientes al de la última publicación, pudiendo devolverlos al fabricante dentro de los diez días subsiguientes, y en caso contrario se procederán a su derrame. Vencido ese plazo de declaración, se aplicará a todas las existencias no declaradas lo dispuesto en el artículo 47 de la Ley Nº 12.148".

Artículo 8º: "La falta de cumplimiento, por parte de los contribuyentes o tenedores, a cualquiera de las obligaciones fijadas en este Decreto motivará el sumario correspondiente contra los responsables".

Por tanto y como conclusión a toda la legislación anterior, se sabe que en nuestro país está prohibido el empleo del ajenjo en la elaboración de bebidas alcohólicas, ya sean espirituosas o aperitivas (caso del vermouth).

En el Reglamento Alimentario de Salud Pública, año 1952, en el artículo 619-5 se considera cuál debe ser la composición de los vinos compuestos (vermouth, vinos quinados, etc.) estableciendo que:

"Vinos compuestos son los elaborados con no menos de 75 % en volumen de vino, adicionados de alcohol, sustancias amargas, estimulan

tes o aromáticas autorizadas, azúcar o mosto concentrado. Podrá emplearse el caramelo como colorante.

Se entenderá por vermouth dulce, o Tipo Torino, el que contenga no menos de 150 gr. de azúcar por litro y 15 a 17° centesimales de alcohol; vermouth seco o Tipo francés, el que contenga menos de 150gm de azúcar por litro y 18° centesimales o más de alcohol.

Los vinos quinados deberán contener no menos de 0,12 gr. de alcaloides totales de la quina por litro, calculados en sulfato de quinina, provenientes de la maceración o infusión de quina calisaya o del agregado de tintura de quina".

En el presente Art. se ve claramente que sólo podrán usarse esencias "autorizadas", sin embargo se sospecha que la Artemisia Absinthium, se emplea en la obtención del vermouth.

En base a estos antecedentes ya se deduce la importancia extraordinaria que tiene el estudio de métodos cada vez más sensibles, para poder detectar los componentes de las esencias que figuran en las bebidas.

Pero en los últimos años, en Alemania, se ha llamado la atención de la toxicidad de las esencias mencionadas anteriormente (ajenjo, tanaceto, salvia), con el fin de modificar su clasificación en la farmacopea oficial, puesto que figuran como sustancias indiferentes (14), siendo por el contrario capaces de provocar la muerte.

Luego, la investigación de esas esencias no debé circunscribirse solamente a su aplicación en las bebidas, sino que se ha abierto un nuevo campo de gran importancia y que es la farmacopea.

Teniendo en cuenta la imperiosa necesidad de evitar el uso de estos tóxicos, he tratado de estudiar, en este trabajo, una nueva técnica que por su sensibilidad y alcance, permita hallarlos aún en pequeñísimas cantidades.

———o———

II) Aceites esenciales que contienen tuyona y otros componentes carbonílicos, de uso vinculado al ajenjo

La tuyona se encuentra en la Naturaleza extensamente distribuída.

Forma el principal constituyente de diferentes e importantes aceites volátiles.

Así se halla: alfa-tuyona en aceite de tuya (Thuja occidentalis) y en aceite de salvia (Salvia officinalis); y beta-tuyona en aceite de tanaceto (Tanacetum vulgare L.) y en ajenjo.

También ha sido identificada en numerosos aceites esenciales de menos importancia.

De estos aceites, el que mejor se investigó, fué el ajenjo.

El ajenjo es una esencia que toma su nombre de la denominación británica de "wormwood". La planta de donde se extrae es la Artemisia Absinthium, hierba perenne y originaria deEuropa y Norte América. Se cultiva en Nueva York, Michigan, Nebraska y Wisconsin. De sus hojas y flores especialmente, se ha extraído un esencia en la proporción de 0,4 a 0,6 %, al que diversos autores le asignan una composición química similar, según la variedad del vegetal.

Así Charabot (15) de dos muestras de aceite esencial obtenidas por él mismo, por destilación de plantas cultivadas, halló la siguiente composición:

	Muestra Nº 1	Muestra Nº 2
Peso específico a 15/15°C.:	0,9307	0,9253
Esteres ..... :	9,7 %	13,1 %
Alcohol tuyílico libre .. :	7,6 %	10,3 %
Alcohol tuyílico combinado:	9,0 %	9,2 %
Alcohol tuyílico total .. :	16,6 %	19,5 %
Tuyona ..... :	43,1 %	35 %

Además, pequeñas cantidades de felandreno, cadineno, vestigios de pineno y otro compuesto, que posiblemente sea azuleno.

Reure (16) ha examinado dos muestras de aceite esencial, obtenidos por destilación de plantas sin cultivar, hallando la siguiente composición:

	Muestra Nº 1	Muestra Nº 2
Esteres ..... :	9,0 %	5,5 %
Alcoholes combinados:	7,0 %	4,3 %
Alcoholes libres .. :	71,9 %	76,3 %
Tuyona ..... :	8,4 %	3,0 %

Sostiene además que el alcohol tuyílico aparece como formado a expensas de la tuyona, durante el crecimiento de la planta.

El dispensatory da como composición del aceite esencial de enjeo: tuyona, alcohol tuyílico en parte esterificado con ácido acético, isovalerianico y palmítico; felandreno; cadineno; y posiblemente pineno y una porción aceitosa azul.

Paolini y Lamónaco (17) de plantas frescas, cultivadas cerca de Roma y en Perugia han obtenido 0,46 % de un aceite-verdoso, del que formulan la correspondiente composición química:

a) Tuyona, cerca del 40 %, mezcla del isómero alfa y beta(dextrógiro).

b) Alcohol tuyílico, aproximadamente 48 % libre y como éster acético, valeriánico y palmítico; mezclado con otros agentes químicos, donde predomina el alcohol beta-tuyílico (dextrógiro).

c) Felandreno.

d) Cadineno.

e) Un aceite azulado de composición no definida.

El contenido de esencia en la planta es muy variable, estando condicionado a varios factores: variedad del vegetal; grado de desarrollo; clima y terreno, en el cual se le cultiva; época de recolección; manipulaciones; estacionamiento; desecación; etc.

Nabak (18) y Madus-Schindler (19) trabajando sobre plantas en los diferentes períodos vegetativos, han encontrado distintas cantidades de esencias, llegando a la conclusión de que el condicion-

to máximo, se obtiene en el período de la floración.

El hisopo, cuyo nombre científico es el de Hyssopus Officinalis L., es originario de Hungría y zona del Mediterráneo.

Su constituyente fundamental es la l-pinocanfona, correspondiéndole aproximadamente un 50 %. Otros componentes que también han sido identificados en él son: alfa y beta pineno, canfeno y levo-pinocanfeol.

El hinojo, pertenece a la familia denominada: Foeniculum vulgare Mill, variedad F. capellaceum.

Muchos son los constituyentes que se han hallado, entre ellos figuran: alfa-pineno; canfeno; alfa-felandreno; dipenteno; dextro-fenchona; aldehido y cetona anísica; ácido anísico; alcohol fenchílico; los más importantes son anetol y estragol en una proporción de 70 al 90 %.

El anís, se extrae de los frutos: 2 a 3,5 % de la Pimpinella anisum.

Entre el 80 al 90 % de su composición está formada por anetol; los otros componentes de menor importancia son: aldehido anísico, cetona anísica, estragol cimeno, fenchona y ácido anísico (20).

La salvia, se obtiene de las hojas (1, 5-2, 5%) de una planta existente en los Balkanes y cuyo nombre científico es Salvia Officinalis.

En su composición predominan las tuyonas y alcanfor, que varían entre un 20 y 61,2 %.

También la constituyen: dextro y alfa-pineno; salveno; cineol; borneol y ácido tuyacetónico.

El tanaceto: Tanacetum vulgare L. (familia Compositae) o comunmente llamado tanaceto, es una esencia de fuerte olor aromático y gusto amargo, que se extrae especialmente de las flores de una hierba perenne. Crece fácil en Europa y en Estados Unidos de Norte América.

La destilación de este aceite se realiza principalmente al Sur de Michigan y Norte de Indiana, que son zonas de gran importancia industrial.

El aceite de tanaceto es un líquido de color amarillo, que se oscurece rápidamente por efecto del aire y de la luz.

Gildemeister y Hoffmann dieron a conocer las siguientes propiedades físico-químicas:

Peso específico a 15°C:	0,9213	a 0,9309
Poder rotatorio ..... :	-4°30'	a +15°34'
Indice de refrac.a 20°C:	1,45622	a 1,47073
Número éster .....:	48,5	a 108,3
Número ácido .....:	1,2	a 4,7

Solubilidad .....: es soluble en 2 a 2,4 y más de alcohol al 70 %.

Investigando la composición química del mismo, Bruylants (21) encontró: a) Beta-tuyona: isómero dextro:

b) Levo-alcanfor y borneol: el primero fué identificado por Vohl, después de haber oxidado el aceite con ácido crómico.

c) Alcohol tuyílico: si bien no ha podido ser aislado se considera su presencia como probable.

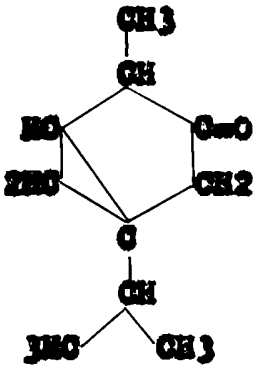
d) Terpenos: pineno y canfeno son posibles.

———————o———————

III) Características físico-químicas y farmacológicas de:

Tuyona - Pinocamfona - Fenona - Carvona - Anetol - Anisaldehido

Tuyona: Es un aceite movible, poco coloreado, de olor característico.



Existe en la naturaleza en forma de dos diastereoisómeros: levo o alfa-tuyona y dextro ó beta-tuyona, esta última es también la "tanacetona" de Semmler (22).

Estos dos isómeros no son ópticamente enantiomorfos, son estereoisómeros del mismo tipo que la mentona e isomentona, pues sólo se diferencian en la configuración espacial del átomo de Cl-. No obstante, bajo la influencia de álcalis sufren inversión.

Los isómeros puros se los nombra como leva- y dextro-tuyona y los productos naturales, se designan como alfa- y beta-tuyona.

Werner y Bogert manifestaron la fácil aislación de la alfa-tuyona natural a partir del aceite de las hojas de "Thuja Occidentalis" por un simple fraccionamiento; mientras que Rose y Livingston consiguieron una fracción de esta cetona, partiendo del aceite de hojas de la "Thuja Plicata".

Otros trabajos emplearon diversos métodos químicos:

Así, Wallach y Böcker aislaron el isómero alfa- del aceite de tuya, fracción de punto de ebullición: 200° a 204°C, por preparación de la semicarbazona y descomposición de la misma con anhídrido ftálico.

El isómero beta- puede ser extraído de aceites que contienen un alto porcentaje de tuyona, ya que tiene la ventaja de que forma con bisulfito de sodio un compuesto característico por su escasa solubilidad: $C_{10}H_{16}O.NaHSO_3$ del cual la tuyona puede ser regenerada por tratamiento con álcali.

Para la separación de beta-tuyona del aceite de tanaceto, Semmler

sugirió agitar 200cc. de aceite de tanaceto más 200cc. de una solución saturada de bisulfito de sodio más 75cc. de agua y 300cc. de alcohol, durante dos semanas.

Una parte del compuesto bisulfítico permanecerá líquido por largo tiempo pero puede cristalizar por enfriamiento de la mezcla. La masa cristalina, es filtrada, por succión lavando primero con alcohol-éter, luego sólo con éter y finalmente se descompone con CO_3Na_2. Posteriormente se destila, obteniéndose una 47% de beta-tuyona.

Puede existir como impureza algún aldehído, se elimina tratando con nitrato de plata amoniacal, y se destila nuevamente.

Otros investigadores como Gildemeister y Hoffman, sugieren el derivado bisulfítico amónico, cuya preparación sería la siguiente: Mezclar 200g. de aceite y 300cc. de alcohol con 200cc. de una solución concentrada de SO_3HNH_4 y 75cc. de agua, dejarlo durante dos semanas y agitar frecuentemente.

El precipitado se descompone con solución de soda y se extrae la tuyona regenerada, por destilación.

Wilson, trabajó con cantidades muy pequeñas de tuyona, por ejemplo 5mg., y ensayó la reacción de la semicarbazida.

Las alfa- y beta-tuyonas obtenidas por los métodos anteriores son en verdad, mezclas de levo- y dextro-tuyona. Para la purificación de esos derivados, se pueden realizar diferentes técnicas:

a) Tanto alfa- como beta-tuyona pueden caracterizarse por la formación de sus derivados tribromados: $C_{10}H_{13}OBr_3$.

Wallach aconseja: Disolver en un gran recipiente 5g. de tuyona en 30cc. de éter de petróleo y adicionar 5cc. de Br. 2. Después de unos segundos, se produce una rápida y violenta reacción, acompañada por desprendimiento de gran cantidad de ácido bromhídrico. Cuando la reacción es completa el tribromo-derivado precipita en forma de masa cristalina. Se enfrían los cristales y se lavan con alcohol frío, pues están impregnados de aceite, luego se recristalizan con éter-acético caliente.

El tribromo-puro funde a 121°-122°, según Werner y Bogert (22).

Otro método usa etilato o metilato de sodio, produciéndose un etil-éter:ClO-HIl-Br(OH)(OC2H5) de P.F.=144°-145° y un metil-éter : ClO-Hll-Br(OH)(OCH3) de P.F.=156°-157°.

b) Alfa- y beta-tuyona también pueden ser distinguidas por la preparación de sus semicarbazonas, de acuerdo con Wallach:

Alfa-tuyona (levo-tuyona) da una semicarbazona cristalina que - funde a 186°-188° (usualmente 184°5-186°) y poder rotatorio (D - 14)= =+59°30'; y una semicarbazona amorfa que funde a 100°-110°.

Beta-tuyona (dextro-tuyona) produce dos semicarbazonas, una que cristaliza en hexágonos, P.F.=174°-175° y otra, en romboedros, P.F.= 170°-172°; esta última es la más estable de las dos modificaciones.

La técnica para la obtención de este derivado, a partir de la mezcla y el estudio de las propiedades ópticas, por métodos petrográficos, fueron realizados por Wilson y Keenan (23) quienes encontraron:

Poder rotatorio (D-18)=+215°46'

Poder rotatorio (D-13)=+221°28'

La variación notable de las propiedades demuestra que se está en presencia de mezclas,pero dichos autores consideran que se puede llegar a productos puros por medio de pacientes recristalizaciones.

Short y Read (24) encuentran valores similares a los hallados - por Wallach,para los puntos de fusión y rotación específica de las semicarbazonas de levo- y dextro-tuyona puras; ellos son:

	l-tuyona pura	d-isotuyona pura
Punto de fusión. .....:	186°-188°	172°
Poder rotatorio (D-14):	+42°0'(en ClHCR)	+220°0(en ClHCH)

c) La oxidación, también permite distinguir las dos formas alfa- y beta.-

d) La formación de hidrazonas fué realizada por numerosos químicos, entre ellos: Macbeth y Price (25); Strain (26); Werner y Bogert (27); Short y Read (28); Ruzicka y Koolhaas (29).

Los datos obtenidos fueron los siguientes:

Formas derivadas		P.F.	Pod.Rot.(D)
?	2-4-dinitrofenilhidrazona	116°-117°	-
?	"	106°-107°	-
alfa-tuyona-destilada	"	106°-107°	-
l-tuyona-óptic.pura	"	117°	+44°0'
d-isotuyona-ópt.pura	"	116°17	+161°0'
beta-tuyona	"	113°-114°	-
beta-tuyona-natural	"	114°-115°	-
beta-tuyona	p-nitrofenilhidrazona	148°-150°	-
beta-tuyona-natural	"	148°-150°	-

Strain, consideró que el compuesto carbonílico de origen, podía ser regenerado a partir de las hidrazonas por tratamiento con: metilglioxal y dioxetílico con agua o bien usando soluciones acuosas de ácido acético glacial.

Eris (30) en lugar de obtener la fenilhidrazona, utiliza un método muy rápido y práctico para reconocer la presencia de tuyona en el aceite; adiciona 0,3 % de yodo sólido con lo que tiene inmediatamente una coloración verdosa, pero sucede que esa misma coloración la dan los aldehidos y entonces evita esta interferencia añadiendo al destilado un 10 % de sulfato de cinc.

Una vez aislados y caracterizados los isómeros, se estudiaron las propiedades:

Alfa-tuyona:

Wallach y Böcker dieron las siguientes propiedades:

Indice de refracción (D-22):1,4503 Densidad: 0,912

Poder rotatorio (D).....:-10°14' P.E.....: 200°-201°

Paolini calentó una mezcla de semicarbazona y anhídrido ftálico en un baño de vapor durante media hora y obtuvo un poder rotatorio igual a +10°23'.

Werner y Rogert (11); Rose y Kingston; Godchot y Short y Read, manifestaron ligeras diferencias en esas constantes.

Las propiedades obtenidas fueron las siguientes:

Indice de refracción (D-25):	1,4546	Densidad (20):	0,9152
" " " (D-20):	1,4530	" (15):	0,9190
" " " (D-17):	1,4521	P.E.....:	198°-203°
Poder rotatorio (D-15)....:	-13°3'	$P.E._{40}$.....:	103°-104°
" " (D-20)....:	-11°35'	$P.E._{8}$.....:	72°-74°

Beta-tuyona:

Producida en gran escala por Schimmel y Co., la ebullición es del mismo orden que el isómero alfa- y además posee las siguientes características:

Indice de refracción (D): 1,44962 - 1,45422
Poder rotatorio (D).....: +68°16' - 70°58'
Densidad (15).....: 0,9209 - 0,9217

Es soluble en aproximadamente diez volúmenes de alcohol al 60% y en 2,5 a 3 volúmenes de alcohol al 70 %.

Para beta-tuyona regenerada a partir de la semicarbazona, fué encontrada una rotación de +76°10'.

El trabajo de Short y Read, consideraba que tanto la alfa- como la beta-tuyona, ya sean productos naturales o químicamente derivados son mezclas de dos estereoisómeros en equilibrio dinámico:

l-tuyona(pod. rot.:-19°54') ⇌ d-isotuyona(pod. rot.:+72°30')
35%——equilibrio dinámico——65%

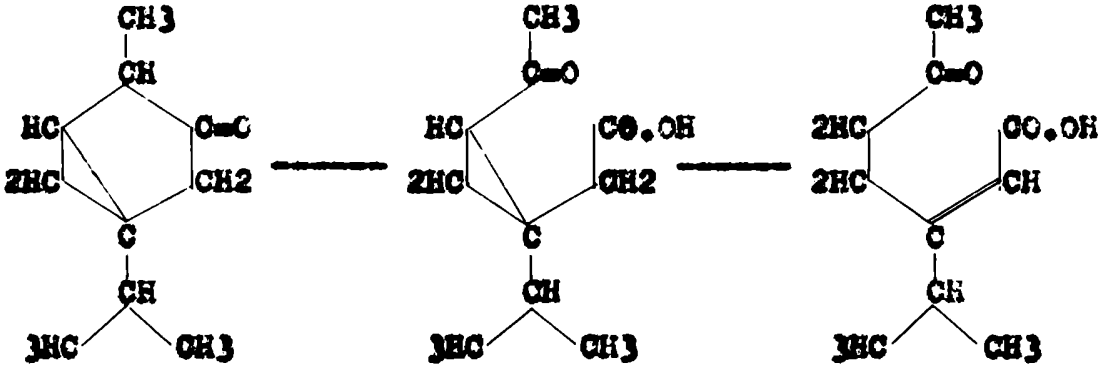
Para estos productos puros :(obtenidos por oxidación de alcoholes"tuyílicos" con ácido crómico) l- y d-tuyona, establecieron:

	l-tuyona	d-tuyona
Indice de refracción:	1,4490	1,4500
Poder rotatorio(D)..:	-19°56'	+72°28'
Densidad.....:	0,9109	0,9135
P.E.....:	74°5	76°
2-4-dinitrofenilhidrazona		2-4-dinitrofenilhidrazona
Poder rotatorio(D)..:	+44°0'	+161°0'(en Cl_3CH)

	semicarbazona	semicarbazona
Poder rotatorio(D)	+42°0'	+222°08'
P. F.	186°-188°	172°

Chugaev y Chesno (32) estudiaron las características rotatorias de los aceites esenciales y sus constituyentes, observando un elevado coeficiente de dispersión para beta-tuyona (2,05) y sugirieron el uso de esa constante para caracterizar la cetona.

Aún en soluciones saturadas la tuyona es fácilmente oxidada por soluciones de permanganato de potasio, a alfa- y beta-ácidos. Los prefijos alfa- y beta- correspondientes a los ácidos, no se refieren sólo a los productos derivados de alfa- y beta-tuyona pues ambos ácidos pueden derivar también de otras cetonas.



alfa o beta-tuyona alfa-ácido ópt.activo beta-ác.óptic.inactivo

Tiemann y Semmler demostraron que a bajas temperaturas y con soluciones diluídas de permanganato de potasio, sólo se forma el ácido tuyacetónico que posee un P.F.= 75°-76°.

Este ácido alfa- (C10-H16-O3) da una semicarbazona de P.F.=174; según Thomsen.

El ácido beta- se obtiene destilando al vacío el alfa- y tiene un P.F.= 78°.

La oxidación con hipobromito de sodio da un ácido dicarboxílico estable: alfa-tuyadicarboxílico P.F.= 141°-142° que forma un anhídrido; y beta-tuyacarboxílico de P.F.= 116°-117°.

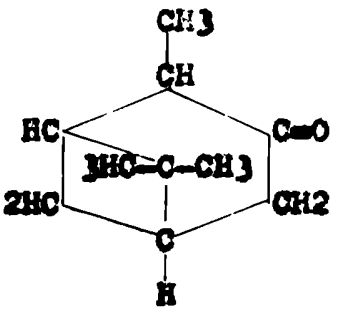
A parte de la oxidación, tienen lugar otras reacciones, que muestran la inestabilidad del ciclo propano en la tuyona. Semmler halló que cuando se calienta a 200° bajo presión, la tuyona se isomeriza a carvotanacetona: C10-H16-O.

Ante los hidrácidos, la tuyona es estable, por lo menos en frío y en soluciones etéreas.

Soluciones acuosas de ácido clorhídrico y otros ácidos minerales isomerizan la tuyona dando "isotuyona" de Wallace, con formación de algo de para-cimeno.

---------O---------

Pinocanfona: Conforme a lo establecido por Schimmel & Co. (33) y Gildemeister-Köhler (34) la levo-pinocanfona se encuentra en el aceite de hisopo (Hisopo Officinalis) en una proporción aproximada al 45%. La variedad dextrógira no siempre se encuentra en productos naturales. Se puede obtener por destilación fraccionada del aceite de hisopo.



Recientes investigaciones realizadas por Schmidt (35) indican que la pinocanfona y su estereoisómero la isopinocanfona son comparables a la tuyona ⟷ isotuyona, pues existen siempre en equilibrio dinámico, el que puede ser afectado por ácidos, álcalis y catalizadores.

Sin embargo esos isómeros de igual dirección de rotación, presentan diferencias en la formación de oximas y en su comportamiento ante el bromo. Por ejemplo, en diez horas un 60% de pinocanfona puede transformarse en oxima, mientras que en el mismo tiempo sólo se transforma un 30% de isopinocanfona; esta reacción se usa para separar ambos estereoisómeros.

La levo-pinocanfona puede ser caracterizada cuando se trata con bromo y ácido acético glacial, a 0°C; primero se forma un compuesto cristalino cuya fórmula es: C10-H14-O-Br2, forma activa de P.F.=96°.

Si se somete a una destilación se obtiene el derivado bromado de la isopinocanfona, cuyo P.F.= 113°-114°.

La cetona puede ser regenerada por reducción del compuesto bromado, con cinc en medio acético. Se tiene así un aceite con olor semejante al alcanfor y tuyona.

Gildemeister y Köhler (36) y Dulou (37) dan las siguientes propiedades para la l-pinocanfona natural, extraída del hisopo:

Indice de refracción (D-22) : 1,4740
Indice de refracción (D-20) : 1,47421
Poder rotatorio.....: -13°42'
Densidad (15).....: 0,9662

Densidad (22).....:0,960

P.E.(765).....:95°

P.E.(22).....:212°-213°

Estudiando el estereoisómero de la pinocanfona encontraron(38):

	P.F.	P.E.	Densidad	Pod.rotat.(D)	Ind. de refrac.
pinocanfona(W.):	líq.	211°	0,963	± 0°	1,47270
cis-l-pinoc. ..:	-	212°	0,966	-17°0'	1,47431
cis-d-pinoc. ..:	-35°	212°	0,966	+17°54'	1,47456
cis-dl-pinoc. .:	líq.	-	-	±0°	-
trans-l-pinoc. :	-20°	211°	0,964	-22°48'	1,47255
trans-d-pinoc. :	-	211°	0,964	+22°30'	1,47260
trans-dl-pinoc.:	líq.	-	-	±0°	-

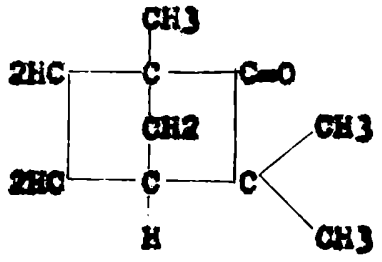
Estos estudios fueron ampliados por Schmidt quien se dedicó especialmente a la influencia que, álcalis, ácidos y catalizadores, tienen sobre esas cetonas y así halló:

	pinocanfona	isopinocanfona
Indice de refracción :	1,47279	1,47495
P.E.....:	211°	214°
Densidad (15).....:	0,9643	0,9688
Poder rotatorio (D)..:	+23°57'	+11°0'
Refracción molecular :	44,27(calculada)	44,17(observada)
Semicarbazona.....:	227°-228°	219°-220°
Oxima.....:	55°-56°	125°

Esta esencia no se usa en nuestra industria.

———————o———————

Fenocona: La dextro-fenocona se encuentra en los aceites de hinojo (Foeniculum vulgare) y de Lavandula Stoechas; la leve-fenocona es componente del aceite de tuya (Thuja Occidentalis). Se trata de un aceite que posee un olor alcanforado y un sabor ligeramente amargo.



La dextro-fenocona se obtiene a partir de la fracción del aceite de hinojo que hierve a 190°-195°. Esta fracción se calienta con tres veces su peso en ácido nítrico concentrado, hasta desprendimiento de vapores rojizos, la mezcla se trata con agua, el aceite se separa y se destila. Con este método la fenocona se halla impurificada por el alcanfor.

Para evitar las impurezas, Wallach (39) consigue una completa separación de fenocona y alcanfor, tratando con semicarbazida. La formación de fenocona-semicarbazona requiere varios días.

La leve-fenocona proviene de la fracción del aceite de tuya comprendida entre 190°-200°, se trata esta con permanganato de potasio y agua, y se destila la mezcla. Luego el destilado se calienta durante una hora con ácido nítrico concentrado.

Para identificar la fenocona, Wallach propuso el siguiente método:

Disolver 10g. de semicarbazida y 10g. de acetato de sodio en 20cc. de agua y añadir la solución de 10g. de fenocona en 30cc. de alcohol. Guardar la mezcla durante dos semanas y luego destilar.

El alcohol y la fenocona libre pasan al destilado, mientras que la semicarbazona queda en el residuo, una parte como masa compacta y otra como cristalizada, muy soluble en agua caliente. La semicarbazona en solución alcohólica cristalizada en prismas rómbicos de P.F.= 182°-183° ya sea l- o d-isómero.

La forma dl- posee un P.F.=172°-173° y carece de esa capacidad

de cristalización.

Otra forma de caracterizar la fenocona: por la preparación de su oxima, ha sido estudiada por Delépine (40), Wallach (41), Hükel y Sachs (42), Ruzicka (43) y Kompye-Klami (44).

La siguiente tabla indica los puntos de fusión de las oximas:

	dextro-	levo-	di-
alfa- :	167°	165°	158°-160°
beta- :	123°	123°	129°

La fenocona se distingue de otras cetonas , además de otras propiedades, por poseer un punto de fusión relativamente bajo.

Fischer (45), Hükel (46), Wallach (47), Bouchard y Lafont (48) von Rechenberg (49), Ruzicka (50) y otros investigadores, dieron a conocer las siguientes propiedades:

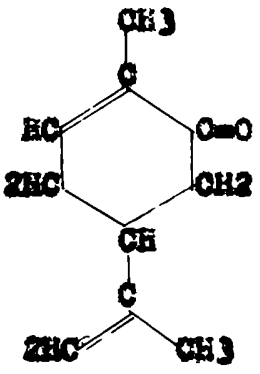
	dextro-	levo-	di-
Indice de refracción (D-20):	1,4623	-	1,4702
P.E.:	193°-194°	193°	193°
P.E.(100):	121°	-	-
P.E.(20):	82°3	-	-
P.E.(10):	68°3	-	72°-73°
P.F.:	5°-6°	6°03	-18°a -16°
Densidad:	0,9449-0,9465	0,948	0,9501
Poder rotatorio (D-20):	+66°54'	-66°56'	-
Poder rotatorio (D-16):	+69°48'	-	-

Las propiedades químicas de la fenocona indican que es una cetona relativamente estable o inerte, pues no es afectada por los hidrácidos, bisulfito ni por permanganato de potasio frío. El ácido nítrico, actuando durante un cierto tiempo, puede provocarle una degradación parcial.

Se usa en pequeñas cantidades para la preparación de aceites esenciales.

———————o———————

Carvona: Esta importante cetona se encuentra en varios aceites esenciales, ya sean sus formas activas o racémicas.



La dextro-carvona es el mayor constituyente (50 - 60 %) del aceite de semillas de Alcaravea y Eneldo (Anethum graveolens). La levo-carvona es el principal componente de los aceites "spearmint" y "kuromoji". Dl-carvona se encuentra en la esencia de Jengibre.

Se trata de un aceite poco coloreado, que posee el olor típico de las semillas de Alcaravea.

Para poder aislar esta cetona de los aceites esenciales, se tiene en cuenta que tratando el aceite con una solución neutra de sulfito de sodio, se forma una sal de un ácido disulfónico, cuya fórmula es: C10-H16-O7-S2-Na2, que es muy soluble en agua.

Luego la carvona es liberada tratando con Na.OH y finalmente se destila.

Otro método de aislación consiste en hacer pasar una corriente de ácido sulfhídrico, sobre una solución alcohólica de la cetona, resulta: (C10-H14-O)2 H2S y de este compuesto se extrae la carvona por medio de un álcali.

Existen varios métodos que permiten caracterizar la carvona, entre ellos encontramos:

I) Formación de semicarbazonas:

a) dextro-carvona da dos semicarbazonas, cuyos puntos de fusión son: 162° y 142°; y los siguientes poderes rotatorios (D-20): +113°6' (en alcohol metílico); (D-20): +113°8' (en piridina).

b) levo-carvona da sólo una semicarbazona estable de alto punto de fusión.

c) dl-semicarbazona funde a 134°-136°.

II) Según Baeyer (51) la carvona da una fenilhidrasona, bien característica de P.F.=109°.

III) Las oximas de las carvonas fueron muy bien estudiadas:d- o l-carvona-oxima tienen P.F.= 72° y poder rotatorio= +39°43' (D-17); dl-carvoxima funde a 92°-93°.

Para la preparación de carvoxima, Wallach (52) recomienda disolver 50g. de carvona en 250cc. de alcohol y añadir a esta solución,agitando, una solución caliente de 50g. de clorhidrato de hidroxilamina en 50cc. de agua. Se obtiene un líquido claro, al que se le agregará una solución caliente de K.OH, disueltos en 40cc. de agua. Inmediatamente el líquido se torna amarillo y precipita cloruro de potasio. Enseguida, el líquido se derrama en agua fría.

La mayor parte de carboxima precipita en forma de cuerpos sólidos (copos) y se filtra. Elocompuesto se hace recristalizar en alcohol caliente.

IV) La d-2-4-dinitrofenilhidrasona posee un P.F.= 189°, según Allen(53).

La carvona presenta propiedades muy interesantes:

Congela a muy baja temperatura.

Su reducción, por algún producto hidrogenado, puede usarse para un método indirecto de identificación. Es necesario tener en cuenta la técnica que se aplica para reducir, pues según ella podrá cambiarse la naturaleza del signo óptico. Por ejemplo: si l-carvona se trata con alcohol y sodio se obtiene l-dihidrocarvol; mientras que una hidrogenación catalítica causa siempre inversión en la actividad óptica, así de l-carvona se tiene d-carvomentol.

Wallach (54) y más recientemente Nagasawa (55) realizaron importantes estudios sobre este problema.

Esta cetona es rápidamente atacada por agentes oxidantes, por ejemplo, con permanganato de potasio la degradación es profunda y el producto principal a que se llega, es el ácido hidroterpenílico :

$C_8H_{12}O_5$ cuyo P.F.=190°-192°, reconocido por Tiemman y Semmler(56).

Los compuestos sulfíticos fueron estudiados especialmente por Gildemeister y Hoffman (57) quienes hallaron las siguientes propiedades:

	d-carvona	l-carvona
Indice de refracción (D-20):	1,49952	1,4988
P.E.:	230°	231°
Densidad (15):	0,9645	0,9652
Poder rotatorio (D0:	+59°57'	-59°40'

Investigaciones recientes consideran un poder rotatorio algo mayor: ± 62°.

Ambos isómeros son solubles en 17 volúmenes de alcohol al 50 % y en 4 volúmenes al 60 %.

Con derivados bromados de la carvona, trabajó Wallach, quien encontró una mezcla de cristales, formada por los d- y l-isómeros de P.F.= 120°-122° y dl-forma de P.F.= 114°; en el seno de un líquido tetrabromado, probablemente con estereoisómeros.

Aumentando la cantidad de bromo, los cristales tetrabromados,dan un pentabromado: d- y l- de P.F.=142°; dl- de P.F.=124°-126°.

Todos los derivados halogenados de esta cetona podrán ser convertidos nuevamente en ella, si se colocan ellos en medio acético y se los trata.

Con ácido clorhídrico, la carvona da un monocloruro; con ácido bromhídrico produce un :bromuro-d-carvona; si se calientan estos halogenuros se obtiene carvacrol.

Abe (58) efectuó una combinación de ácido cianhídrico, sulfhídrico y amoníaco con carvona, obteniendo como resultado cristales de derivados de tioamida.

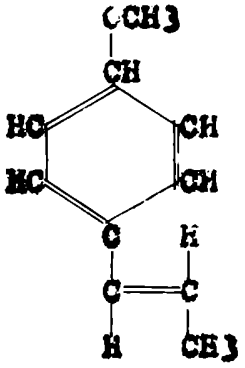
Estos compuestos se forman lentamente y sólo podrán utilizarse en el estudio de la cetona, si se tiene mucho tiempo.

Cuando se expone a la luz durante varios meses, la carvona se

transforma en un compuesto llamado : alcanfor-carvona.

La carvona se usa como aromatizante en diversas clses de comidas y bebidas; además en la preparación de numerosos productos farmaceuticos.

Anetol: Es el principal componente de varios aceites volátiles,



provenientes de las semillas de plantas que pertenecen a la familia de las Umbelíferas, por ej. anís e hinojo.

Se trata de una masa cristalina blanca, de olor y gusto bien característico.

Algunos aceites poseen esta esencia en gran cantidad, que puede ser aislada por un simple enfriamiento.

El anetol puede ser caracterizado de diferentes maneras:

a) Underwood, Baril y Teone (59) obtuvieron dibromuro-2-monobromoanetol, siguiendo este proceso: Disolver 0,37g. de anetol en 4cc. de éter absoluto enfriado con hielo. Después de ocho minutos, agregar gota a gota 0,84g. de bromo disueltos en éter absoluto. Evaporar el éter. Se extrae el residuo sólido con 1cc. de alcohol y recristaliza en 18cc. de éter de petróleo.

Se obtiene un compuesto cuyo P.F.= 108°.

b) Kramli y Bruckner (60) trataron de formar el derivado nitroso, para ello agregaron a una solución etérea de anetol una de nitrito de sodio acidificada con sulfúrico y obtuvieron anetol-p-nitroso de P.F.= 126°.

Siendo el anetol una sustancia tan difundida en la naturaleza, muchos químicos entre ellos: Gildemeister y Hoffman (61); Sanderson y Jones (62); Eykman (63); y Lobo (64); estudiaron sus propiedades, dando los siguientes valores:

Indice de refracción (D-25): 1,559-1,561

Indice de refracción (D-18): 1,56149

P.F.....: 22°5-23°

P.E.....: 232°-234°

P.E.(751).....: 233°

Densidad(25).....: 0,986

Solubilidad...: soluble en 2 ó 3 volúmenes de alcohol al 90 %; insoluble en agua.

Bajo la influencia de la luz y del aire o el calor, el anetol, se transforma en una masa viscosa de color amarillo, sabor amargo y gusto desagradable.

La causa de estos cambios es aún dudosa, según Varda (65) se debe a la polimerización del anetol; en cambio Hoering y Grélert (66) consideran que se produce la oxidación del anisaldehido a ácido anísico y otros productos de oxidación, entre estos se encuentran: "4-4'dimetoxiestilbeno" llamado "fotoanetol".

Este compuesto es insoluble y a él se debe la turbidez que acompaña a una solución fresca de anetol, dejada un cierto tiempo.

Cuando se lo recristaliza en ácido acético glacial o benceno, se obtiene "di-p-metoxiestilbeno" de P.F.= 215°. Estos cristales son fluorescentes.

Campbell (67) estableció que si se calienta anetol en ausencia de aire, se produce su dimerización dando:1-3di-p-metoxifenol-2-metilpropano.

Los siguientes valores fueron seleccionados por los laboratorios de Fritzsche Brothers Inc.:

	anetol original	expuesto a la luz y aire
% de anisaldehido	0,7%	25%
Solubilidad.....	1,5 a 2 vol.de alc.90%	miscible con 80% de alc.
Densidad.....	0,986	1,114
Nº ácido.....	0	1,4
Sabor.....	dulce	amargo

El anetol por acción de los ácidos forma varios polímeros.

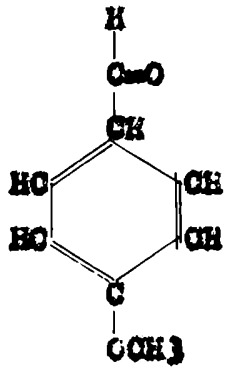
Crnderff, Terrasse y Morten (68) lo tratan con cloruro de cinc, mientras que Puneddu (69) usa cloruro férrico; en ambos casos se obtiene "metanetol" o "dianetol" de P.F.=132°, cuya estructura fué estudiada por Baker y Enderby (70); Goodall y Haworth hallaron "isoa-

netel" hirviendo con metanol y ClH.

Balbiano y Paolini (71) tratando anetol con acetato mercúrico, encuentran un glicol. Schultz y Treibs (72) al oxidar anetol con oxígeno molecular a 150°, obtienen acetaldehido, ácido anísico y acético, libre y esterificado, anhídrido carbonico.

Finalmente se puede decir que esta sustancia, anetol, se la utiliza para sabor a toda clase de productos.

Anisaldehido: Se obtiene por oxidación del anetol y por ello se encuentra generalmente en aceites esenciales anejos, que poseían esa sustancia.



Se trata de un aceite ligeramente amarillo, de olor bien característico.

Se lo aisla por medio del compuesto bisulfítico.

Para caracterizar este aldehido se usan diferentes métodos:

a) Wilson y Keenan (73) hallaron la semicarbazona de P.F.= 210°.

b) Hebert (74) estudia la p-nitrofenilhidrazona de P.F.=253°, descomponiéndola con ácido acético glacial.

c) Campbell (75) investiga la 2-4-dinitrofenilhidrazona.

Gildemeister y Hoffman (76), Jaeger (77) y von Auwers (78), estudian las propiedades del anisaldehido, dando a conocer las siguientes:

Indice de refracción (D-20)	1,571 - 1,575
P.F.	2°5
P.E.	247°
P.E.(5)	106°-107°
Densidad (15)	1,127
Solubilidad	soluble en 7 a 8 volúmenes de alcohol al 50% y en 300 volúmenes de agua, dando cierta opalescencia.

Expuesto al aire, se oxida dando ácido p-anísico, P.F.=184°2.

El anisaldehido se usa especialmente en la industria de jabones y perfumes.

———————o———————

IV) La Cromatografía en sus aplicaciones generales y analíticas en especial. Antecedentes sobre su aplicación en el estudio de los aceites esenciales

Universalmente se acepta, que las primeras experiencias referentes al análisis cromatográfico fueron realizadas por el botánico ruso Tswett (80) quien en 1906 publicó sus trabajos sobre la separación de pigmentos de plantas.

Sin embargo, investigaciones recientes (81) (82) establecen que ya con anterioridad a Tswett se habían realizado diversos trabajos aplicando la nueva técnica.

Así en 1850, F.F. Runge analiza mezclas de colorantes sobre papel secante y se interesa por el ascenso capilar que ciertas disoluciones pueden efectuar sobre madera.

En 1861, Schönbein, para investigar la presencia de ozono en un gas, hace uso de tiras de papel impregnadas en diferentes disolventes y encontró que los distintos componentes alcanzaban diversas alturas en las tiras que habían sido sumergidas en ellos.

Los trabajos de Schönbein, fueron seguidos por un discípulo Goppelsröder (83) quien realizó múltiples investigaciones en este campo, las que fueron publicadas en 1906.

Posteriormente el análisis capilar fué bastante relegado con el florecimiento de los métodos columna.

No obstante los buenos resultados obtenidos, esta técnica tuvo una aplicación comparativamente escasa y el período de latencia duró aproximadamente veinticinco años y alcanza hasta los trabajos sistemáticos de Kuhn, Winterstein y Lederer en 1931 (84) acerca de

los carotenos-hidrocarburo cristalino considerado durante más de un siglo como una sustancia homogénea- cuyo fraccionamiento consiguieron en escala preparativa.

Estas experiencias pusieron de relieve las considerables posibilidades de la técnica.

En la actualidad, se ha tendido a la modificación de aparatos, métodos y denominaciones, pero el fundamento es el mismo que utilizó primitivamente Tswett.

Si bien la denominación de cromatografía es la que ha prevalecido.

Actualmente y teniendo en cuenta especialmente las sustancias incoloras, se han propuesto términos más concretos y específicos. Así por ejemplo, para la cromatografía sobre papel, aparte de la denominación de "análisis capilar" que aún subsiste, ha sido propuesta la de "papirografía" (85).

En realidad, la nomenclatura del conjunto de estas técnicas es todavía un problema y sería de desear que se estableciese en la brevedad posible, una correcta división y denominación.

La Cromatografía, se puede considerar que depende de un proceso de partición, englobable en el grupo de las separaciones por difusión que utilizan el principio de purificación en contracorriente(86).

Es fundamentalmente el proceso de adsorción lo que la caracteriza, entre todos los métodos de fraccionamiento.

Existe la misma relación entre la cromatografía y los simples procesos de separación en que el adsorbente es agitado con la solución, que entre la destilación ordinaria y la fraccionada con columna de fraccionamiento.

Del mismo modo que la destilación fraccionada es equivalente a millares de destilaciones corrientes, la cromatografía equivale a una contínua y ordenada agitación del adsorbente seguida de filtración y nueva iniciación del proceso.

La sensibilidad de los métodos cromatográficos para separar sustancias y en especial de la cromatografía sobre papel, difícilmente se alcanza con otros procesos analíticos.

Esta es una de las principales causas por las que estas técnicas, han tenido numerosas aplicaciones.

Sus objetivos fundamentales son:

a) Separación de mezclas en sus constituyentes.

b) Determinación de la homogeneidad de las sustancias químicas

c) Comparación de sustancias que se consideran idénticas.

d) Purificación de sustancias.

e) Concentración de materiales a partir de disoluciones diluídas.

f) Reconocimiento e inspección de productos técnicos.

g) Separación cuantitativa de uno o más constituyentes de mezclas complejas.

h) Determinación de la estructura molecular.

i) Regeneración de sustancias a partir de complejos de adición

De todos estos objetivos los más importantes son los dos primeros.

Teniendo en cuenta las numerosas aplicaciones de la cromatografía y para situar adecuadamente la cromatografía sobre papel, método seguido en la presente tesis, conviene esbozar una clasificación aproximada de la misma y así, pueden citarse los cinco grupos siguientes:

1) Los métodos de cromatograma líquido han encontrado su mejor aplicación en di- y triterpenos y esteroides (hormonas sexuales y corticales). Se basan en la extracción por lavado y fraccionado de cada uno de los componentes de la mezcla adsorbida, que de esta manera se eliminan en filtrados separados.

2) Las técnicas que usan los llamados cambiadores de iones como material de soporte, consisten fundamentalmente en la liberación de algún constituyente de la superficie sólida que pasa al disolvente.

Más que un simple proceso de adsorción física, se trata de una yuxtaposición de acciones físicas y químicas.

Los primeros intercambiadores usados fueron inórgánicos, tipo zeolítico, luego comenzaron a usarse, con gran éxito, resinas sintéticas (87).

Los intercambiadores catiónicos se han usado mucho en la separación de las tierras raras, en la aislación de los productos de la desintegración atómica y en la resolución de varias mezclas de sustancias inorgánicas.

Los intercambiadores aniónicos han sido empleados con éxito en la aislación de los ribonucleótidos, en la aislación de aminoácidos, etc.

3) El grupo de métodos derivados de la denominada cromatografía de frentes (88) inventada por Tiselius en 1940.

Una de sus aplicaciones más importantes resulta el estudio de superpolímeros y otras macromoléculas (89).

Su fundamento general consiste en forzar a una solución a pasar a través de un adsorbente en condiciones tales que resulta posible la contínua caracterización del líquido emergente mediante un

dispositivo que registra los índices de refracción.

Presenta tres variantes, según se realice sin desarrollador(análisis frontal); empleando el desarrollo mediante un disolvente (análisis de elución), o haciendo uso de una sustancia que por ser fuertemente adsorbida actúa como desplazante de las restantes (desarrollo por desplazamiento).

En la actualidad, éstos métodos se denominan globalmente "análisis por adsorción".

4) En 1941, Martín y Synge (90) introdujeron un grupo de técnicas de gran importancia las llamadas de reparto cromatográfico)Partition Chromatography) que fueron primeramente usadas en la separación de aminoácidos acetilados.

En esta técnica la columna sólida es un soporte semiinerte para la fase líquida estática, mientras que la fase líquida móvil fluye a través del adsorbente.

En este tipo de cromatografía tiene lugar un número considerable de particiones consecutivas de la sustancia entre las dos fases líquidas.

Las columnas utilizadas originariamente fueron de gel de sílice, luego se introdujeron las de almidón.

5) En conexión con las investigaciones que dieron lugar a la cromatografía de partición indicada en el apartado anterior, fué desarrollada la "cromatografía bidimensional sobre papel".

La cromatografía que usa papel de filtro (91) como soporte encuentra sus más remotos antecedentes en los trabajos precursores de Schönbein y Goppelsroder.

La más original característica de esta cromatografía consiste en la posibilidad de efectuarla en forma bidimensional, con los resulta-

dos de dos particiones cromatográficas sucesivas, sobre el mismo sustrato, se acumulan, permitiendo con sus efectos diferentes una más perfecta separación de la mezcla analizada.

El uso del papel como soporte tiene muchas ventajas. En primer lugar es barato, fácil de estandardizar, y ocupa poco espacio. Por otra parte los cromatogramas obtenidos pueden conservarse de manera permanente ya sea fotografiándolos o mediante un fijador.

Varios libros existen actualmente, constituyendo un considerable material bibliográfico que puede usarse en este campo.

Un libro clásico y de gran valor actual es la de L/Zechmeister y L/von Cholnoky "Die Chromatographische Adsorptionsmethode Grundlagen, Methodik, Anwendungen"(1938).

Libros más recientes: L.Zechmeister "Progress in Chromatography" (1950); H.H.Strain "Chromatographic Adsortion Analysis"(1945);T.I. Williams "Introduction to Chromatography" (1946).

La Biochemical Society publicó en 1949, dirigido por A.T.Williams y R.L.M. Synge, "Partition Chromatography" dedicado especialmente a la cromatografía sobre papel.

También en el mismo año, en la serie francesa de "Actualites scientifiques et industrielles" se dió a conocer en dos fascículos una revisión, muy importante de Lederer.

Para el caso particular de los aceites esenciales figuran los trabajos de Plattner y Pfau que tratan la cromatografía sobre alúmina de los compuestos de los azulenos con trinitrobenceno, disueltos en ciclohexano (92); el de Blockman y Volpers sobre separación por cromatografía sobre alúmina de aldehídos y cetonas de aceites esenciales (93); de H.H. Strain sobre separación de las 2-4-dinitrofenilhidrazonas de beta-ionona y alcanfor; y dos muy recientes que aplican nuevas

técnicas (94) y (95) las que fueron llevadas al laboratorio por el Dr. Adolfo L. Montes y su alumno de tesis Dr. Jorge Labat.

Para la separación de alcoholes y fenoles por una parte y de aldehidos y cetonas por otra, se tenía: El trabajo de J.W. White, quién separó alcoholes de bajo peso molecular usando mezlas de 3-5-dinitro benzoatos y las investigaciones de J.D. Roberts y Ch. Green que aplicaron la cromatografía a la separación de 2-4-dinitrofenilhidrazonas de aldehidos y cetonas, también de bajo peso molecular.

La aplicación de estas técnicas en los aceites esenciales era mucho más complicado, ya que ellos se encuentran compuestos de naturaleza químicas muy variada: Alifáticos, terpénicos y aromáticos.

El primer problema: Alcoholes y fenoles, lo encaró el Dr. Adolfo L. Montes con el alumno Ernesto Clavet. El reactivo usado fué el cloruro de 3-5-dinitrobenzoilo; como material de relleno, se utilizó ácido silícico mezclado con rodamina C, material fluorescente que sirve para ubicar las zonas donde el producto, en este caso incoloro, era absorbido, pues en esas regiones desaparece la fluorescencia; como disolvente para el percolado y para el desarrollo se usó hexano normal y para la elución éter etílico puro.

El segundo problema: Aldehidos y cetonas, fué estudiado también por el Dr. Montes quien trabajó con 2-4-dinitrofenilhidrazina pura en solución sulfúrica hidroalcohólica, según la técnica de Scholtens (96) usando para el caso del alcanfor calentamiento sobre baño de agua por dos horas a reflujo.

El material de relleno más adecuado para estas separaciones, resultó ser una mezcla de dos partes en peso de ácido silícico Lopal (pasa totalmente por tamiz N° 50 de malla de 297 micrones) purísimo y una de betonita de las siguientes características: Pasa por tamiz N° 200 de malla de 74 micrones y sus componentes son: SiO_2 56 %; Al_2O_3

13,42 %; Fe_2O_3 3,22 %; OCa 2,08 %; OMg 4,75 % y H_2O 23,46 %.

El tamaño mejor para la columna fué de 2,5 cm. de calibre y 25 cm. de altura efectiva.

La elección de un primer disolvente y del desarrollador permitieron establecer las siguientes consideraciones:

a) Se prueba primero la solubilidad de los derivados sobre una pequeña cantidad, usando la mezcla, o bensol y según el resultado que se observe, se procede:

Si las 2-4-dinitrofenilhidrazonas son fácilmente solubles en la mezcla de benceno y ligroína (de 60° a 90° C) adicionada de 4% de éter etílico, como sucede para las de mentona, citral, alcanfor, etc. se trata con seguridad de compuestos alifáticos o terpénicos: entonces se disuelve la mezcla en un volumen adecuado de disolvente, mezcla y percola.

Para el desarrollo se ensaya primeramente ligroina y sinó se observa separación de bandas se sigue con ligroina que contenga 20% de éter etílico, hasta obtener una buena separación;

b) Si se observa solubilidad parcial en la mezcla, es probable la presencia de productos aromáticos o heterocíclicos; entonces conviene disolver en benceno y luego ir agregando ligroina (con 4 % de éter etílico) hasta que se produzca una ligera opalescencia y enseguida más bensol hasta que la solución sea límpida.

Se percola y desarrolla luego con ligroina que contenga 20% de éter etílico, con lo que se logrará la separación de los derivados de compuestos terpénicos o alifáticos.

Luego conviene ensayar con bensol por si hubiera más de un compuesto aromático o heterocíclico.

c) Si se observa sólo ligera solubilidad en el disolvente mezcl-

se tratará de derivados de compuestos aromáticos o heterocíclicos; entonces se disuelve en benceno y se desarrolla con el mismo disolvente.

La solución debe ser diluida pues sino al caer sobre el material de relleno puede provocar la precipitación del soluto.

Para la elución siempre se ha usado éter etílico y la recristalización se ha hecho en alcohol etílico purificado.

Se han resuelto así diez mezclas binarias y una ternaria, entre ellas se pueden mencionar, las de : Mentona y carvona; mentona y furfural; carvona y alcanfor; piperonal, carvona y mentona; etc.

La mezcla de alcanfor y fenocna no pudo ser separada.

Nuevas técnicas:

En el año 1949 Meinhard y Hall (97) publicaron un trabajo sobre cromatografía radial superficial de iones inorgánicos, efectuada sobre porta-objetos recubiertos con sustancia absorbente. Anteriormente Flood (98) y Heph (99) idearon aumentar la fuerza adsorbente del papel de filtro impregnándolo con distintas sustancias. Es decir, que la celulosa del papel no era ya el material adsorbente, sino que desempeña el rol mecánico de sostén. Esta técnica, a pesar de abrir nuevas posibilidades al método cromatográfico sobre papel, estaba limitada por el pequeño Número de absorbentes que podían usarse y es así que en 1951 Kirchner, Miller y Keller reemplazaron el papel por tiras de vidrio, inspirándose en el método de Meinhard y Hall pero modificándolo en este sentido: El absorbente, mezclado con un agente ligante se aplica sobre tiras de vidrio que luego son activadas y desarrolladas en tubos de prueba, de un modo análogo al introducido por Rockland y Dunn en el estudio de aminoácidos sobre papel.

Esta técnica, para la cual se ha propuesto el de "chromatostrip"

es la que se ha hecho preponderante, en el trabajo del Dr. Labat.

El "chromatobar": En la columna cromatográfica clásica el material absorbente se coloca dentro de un tubo cilíndrico de vidrio. Se presenta así una dificultad para aplicar los distintos reactivos químicos que se emplean en el revelado de sustancias incoloras. Esta dificultad se elimina en parte por extrusión del material absorbente fuera de la columna de vidrio, operación algo engorrosa.

Por este y otros inconvenientes Miller y Kirchner han ideado eliminar totalmente la envoltura de vidrio, construyendo una barra rígida constituida por el material absorbente y yeso de París, que se sostiene por una varilla de vidrio concéntrica.

A su vez la barra se apoya sobre un dispositivo llamado "distribuidor de solventes" que es un vaso de precipitados con tres orificios con tres orificios en el fondo y provisto de tres patas de vidrio que actúan como sostén. El vaso se llena con el mismo material absorbente y sobre este se apoya la columna. Se facilita así una distribución y ascenso uniforme del solvente.

La sustancia a cromatografiar se pulveriza en la base de la barra que junto con el distribuidor, se colocan dentro de una probeta más alta que la barra pero menos que la varilla de vidrio. En el fondo de la probeta se coloca el solvente que asciende por capilaridad, primero a través del distribuidor y luego alcanza la barra.

Es evidente que si bien esta técnica evita los inconvenientes mencionados surgen otros muy importantes.

Así la preparación de la columna es larga y dificultosa; además como el yeso fragua rápidamente y se trabaja con moldes, frecuentemente se forman zonas de distinta cohesión. El método de secado y activación lleva dias horas.

Por todas estas razones se aconseja recurrir al "chromatostrip" como operación previa para estudiar las posibilidades cromatográficas de una mezcla dada, ensayar solventes y otras condiciones antes de pasar a la barra. Esto no es lícito suponerlo a priori, porque el compertamiento de una sustancia puede ser distinto en la tira, donde se usa almidón como agente ligante, que en la barra donde se emplea yeso.

Se considera que las ventajas del "chromatobar" con respecto a la columna clásica, las presenta también la banda cromatográfica, siendo su preparación más rápida y simple.

Por último, entre las aplicaciones más recientes de la cromatografía, o mejor dicho de la "papirografía" se tiene la determinación del alcanfor, en forma cuali-cuantitativa, llevada a cabo por el Dr. A.L.Montes y los Drs.José Braun y Juan C. Pantolini.

Este nuevo método ha sido ideado para resolver un problema de selección de plantas, albaca alcanforósa (Ocimun kilimandscharicum Guerke) por su rendimiento en alcanfor.

Partiendo de muestras de alcanfor, previamente separadas, se encontró que la determinación del mismo, podría hacerse por diferentes métodos, a saber:

1) Gravimétricos: a) como 2-4-dinitrofenilhidrazona: de la Farmacopea Británica; de la Association of Agricultural Chemists de U. S.A. y de Kusita y Nakahara. b) como semicarbazona: de Asoham.

2) Volumétricos: Por oximación, de Bryant & Smith o su modificación por el Dr. Montes y el Dr. Grandolini.

Fueron considerados como mejores los de la Farmacopea Británica y de la A.O.A.C. pero su aplicación directa no fué posible, ya por la gran dilución en que se encontraba el alcanfor que obligaba a trabajar con mucho líquido y por ende una cantidad grande de precipi

tado o también por la presencia de incompatibilidades reaccionantes con el sulfato de 2-4-dinitrofenilhidrazina o retenidas por el precipitado.

No obstante, por ser ese el reactivo mejor para el alcanfor, fué el utilizado.

Luego se eliminaron las incompatibilidades, casi por completo, gracias a la mayor solubilidad del derivado correspondiente al alcanfor, en una mezcla de éter de petróleo (P.E. 70° a 90°C) y benceno.

Las impurezas que pasaban en la solución con el derivado, se eliminaban en la cromatografía ascendente en las tiras de papel, ya que el compuesto pasee una velocidad de corriente mucho mayor que el de las impurezas.

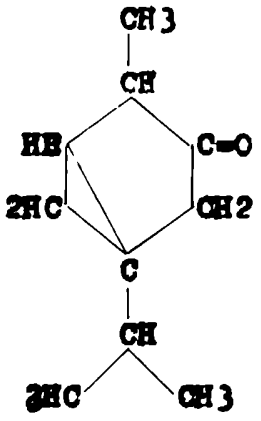
Para finalizar con estos antecedentes, queda por ver el presente trabajo, el que iré desarrollando según el plan propuesto.

---------O---------

B - TRABAJO EXPERIMENTAL

I) Aplicación de la Reacción de Legal

Observando la fórmula de la tuyona, veremos que presenta como grupo característico -CO y como por Química Orgánica sabemos que las sustancias que encierran el grupo =CH2-CO no incluído en un ciclo y en las que la valencia libre de CO está saturada por un hidrógeno o por un radical hidrocarbonado, es decir,un gran número de aldehidos y cetonas,al ser tratadas con nitroprusiato de sodio,hidróxido de sodio y ácido acético,dan una coloración rojo intensa.



Esta reacción ha sido señalada por vez primera por Legal (100) siendo de gran sensibilidad para el grupo =CH2-CO.

Délage (101) sostiene que con una dilución de tuyona del 1/10.000 al 1/1.000 se obtienen coloraciones que van del rosado al púrpura intenso.

Con ello parecería fácil reconocer con certeza los rastros de tuyona en una bebida que se ha preparado a base de ajenjo.

Sin embargo, ello no ocurre en la práctica,ya que debe trabajarse con muestras de composición muy compleja. Como consecuencia de ello y ante la prohibición del empleo del ajenjo en casi todo el mundo,se han propuesto numerosos métodos con el fín de establecer si en la elaboración del producto a analizar,se ha empleado o no dicho vegetal.

En el laboratorio,según la técnica que figura en el "Traité theorique et practique des Fraudes et Falsifications" vol.1 (1925), fué aplicada la reacción de Legal no sólo a la investigación de tuyona sino a otras esencias,hallándose resultados muy interesantes.

El proceso de caracterización fué el siguiente.

Se tratan 100cc. de licor de esencia con 25cc. de agua y se destila en presencia de algunos trozos de piedra pómez (impiden que la ebullición sea violenta).

Se recogen 100cc. del destilado,en matras aforado,y se adiciona 1 cc. de anilina pura y 1cc. de ácido fosfórico concentrado. Se observa la aparición de flóculos blancos. Se calienta durante una hora con refrigerante ascendente,se deja enfriar (la solución se halla perfectamente limpia). Se le añaden 20cc. de agua destilada y se destila recogiendo nuevamente 100cc. Todo este tratamiento, sirve para eliminar los aldehidos.

El destilado pasa a una ampolla de decantación y se le adicionan 60cc. de éter etílico;se agita y luego se añaden 20cc. de agua destilada.

Se decanta la solución etérea y se recoge en un vaso de precipitado,donde se agregan 10cc. de alcohol a 95° y se abandona hasta el día siguiente. Entonces, el residuo ya está preparado para efectuar la reacción de Legal.

Se lo extrae con un poco de alcohol (10 cc.)y se lleva a un Erlenmeyer pequeño;se le añade 1cc. de solución reciente de nitroprusiato de soda al 10% y 0,5cc. de lejía de soda al 5%,se agita y se deja medio minuto,luego se adiciona 1cc. de ácido acético glacial.

Al agregar la soda notó que aparecía un color rojo grosella y luego del agregado del ácido acético una coloración rojo púrpura,que se atenúa y se torna rojo grosella,la que persiste por espacio de cinco minutos,desapareciendo más tarde.

La aparición de ese color indicaba la presencia de tuyona.-

Si bien esta reacción es positiva con solución alcohólica de esencia de ajenjo al 1%,ello no ocurre utilizando diluciones superiores

1gr. de esencia en 5[illegible]ml. de alcohol, donde no aparece la coloración, o sólo aparece una tonalidad amarillenta.

Teniendo en cuenta la poca sensibilidad y el exceso tiempo de duración del color rojo, se ha ensayado una modificación introducida por Duparc y Monnier, que consiste en agregar al líquido alcohólico 5cc, de una solución al 10% de SO4Zn, antes del agregado del nitroprusiato de sodio con lo que se obtiene mayor estabilidad.

Según los autores con ese agregado, se forma una laca que hace estable la coloración, por espacio de 24 horas.

Resultados: siguiendo la misma técnica anteriormente mencionada, hallé:

a) Tuyona	: reacción de Legal	:	positiva
b) Hinoja	: " " "	:	positiva
c) Hisopo	: " " "	:	positiva
d) Anetol	: " " "	:	negativa

Conclusión:

Por intermedio de esta reacción no podrá distinguirse la tuyona, de la pinocamfona (componente fundamental del hisopo) ni de la fenchona (constituyente esencial del hinojo).

---------o---------

II) Preparación de 2-4-dinitrofenilhidrazonas de las tuyonas y otros componentes carbonílicos de aceites esenciales y su cromatografía. Preparación de series "tipo" para determinaciones cuantitativas.

Para obtener las 2-4-dinitrofenilhidrazonas,compuesto básico de este trabajo,se trata el extracto etéreo de la esencia (25ml.) con el reactivo,cuya preparación segun Shriner y Fuson es la siguiente:

En un Erlenmeyer pequeño se agregan a 0,4g. de 2-4-dinitrofenilhidrazina pura,2ml. de ácido sulfúrico concentrado y luego gota a gota,agitando3ml. de agua destilada hasta solución completa.

Ocurre que a pesar de trabajar con reactivo para análisis,posee ciertas impurezas,que forman un precipitadoamarillento al agregar el agua.

Como el ácido concentrado y agua dan una reacción fuertemente exotérmica,la solución se calienta,entonces en esas condiciones de temperatura se añaden 10ml. de alcohol de 95°. Conviene dejar el preparado toda una noche y al día siguiente filtrarlo.Se obtiene una solución de color anaranjado fuerte y si se diluye aparecen cristales en forma de agujas cuyo P.F.-134°C.

Una vez obtenido el reactivo,se colocan 5ml.de éste,juntamente con 5ml.de alcohol de 95° y los 25 ml. del extracto etéreo en un vaso de precipitado de 50 ml;se deja evaporar el éter.

Observe que lo más conveniente es dejar que el éter se evapore a temperatura ambiente,pues si por el contrario se usa baño de agua hirviente,arrastra pequeñísimas cantidades de esencia, lo que realmente puede distinguirse en el diferente dosaje que presentan las series cromatográficas N°1 y N°2.

Una vez que todo el éter ha desaparecido,la solución alcohólica comienza a enturbiarse,se lleva a la heladera donde se deja una noche, para obtener una buena precipitación de 2-4-dinitrofenilhidrazona.

Al día siguiente se separa el precipitado del líquido,para lo cual no conviene la filtración pues se trata de pequeñas cantidades; por lo tanto es preferible una absorción.Para ello utilicé un dispositivo como se puede ver en el esquema 1. En el extremo inferior del tubo acodado,se coloca un rollito de papel de filtro que no debe estar ni muy apretado que no deje pasar el líquido, ni muy abierto que pase el precipitado,el justo límite sólo se adquiere con la práctica.

Cuando el precipitado,de color netamente anaranjado,está bien seco,se trata con 2ml. de mezcla de éter de petróleo(fracción que destila entre 70° y 90°C) con benceno puro,en la relación de 2 a 1; inmediatamente se solubiliza todo el derivado correspondiente a la tuyona y el de todas las sustancias que he utilizado y de cuya cromatografía hablaré más adelante.

La solución obtenida se pasa a un tubo de ensayo de 20/200 mm. y se deja ascender la solución, por capilaridad hasta una altura de 8cm. previamente marcada sobre la tira.

Es fácil seguir el corrimiento del líquido por su color anaranjado.

Luego,se sacan las tiras de los tubos y se dejan secar por lo menos 2 horas,después de ese tiempo desarrolla el cromatograma. Para esto se vuelve a sumergir el extremo coloreado de la tira en 2ml. de ligroína,llenando así a la misma fracción de éter de petróleo usada anteriormente,colocados en un tubo de ensayo de 20/200 mm.

Para que el desarrollo se efectúe en una atmósfera saturada de disolvente y para que este no se evapore,con la consiguiente apari-

ción de manchas en el cromatograma,conviene cubrir el tubo con otro de mayor diámetro,ajustándolo con algodón.

Este y otros detalles,como por ejemplo evitar cualquier suciedad por pequeño que sea en las tiras de papel;tratar de tocarlas lo menos posible,sostenerlas por los bordes;demuestran que si bien la cromatografía es una operación sencilla,es necesario cuidar todos los detalles de técnica.

Otra advertencia práctica,es que el papel no debe tocar las paredes del tubo,para ello se hace pender la tira desde una ranura hecha en un tapón de goma.

El esquema 2 muestra la disposición de los tubos y la tira.

Se deja ascender el líquido hasta una altura marcada a los 18cm.

Se retira la tira y se deja secar a temperatura ambiente.

Para preparar las <u>series de tiras "tipo"</u> se trabaja de la misma manera especificada anteriormente,pero con concentraciones de tuyona,previamente calculadas aplicando volumetría,ya que se parte de soluciones de concentración 0,4 gr./litro en la serie N°1 y de 0,2 gr./litro en la serie N°2.

Se tiene así:

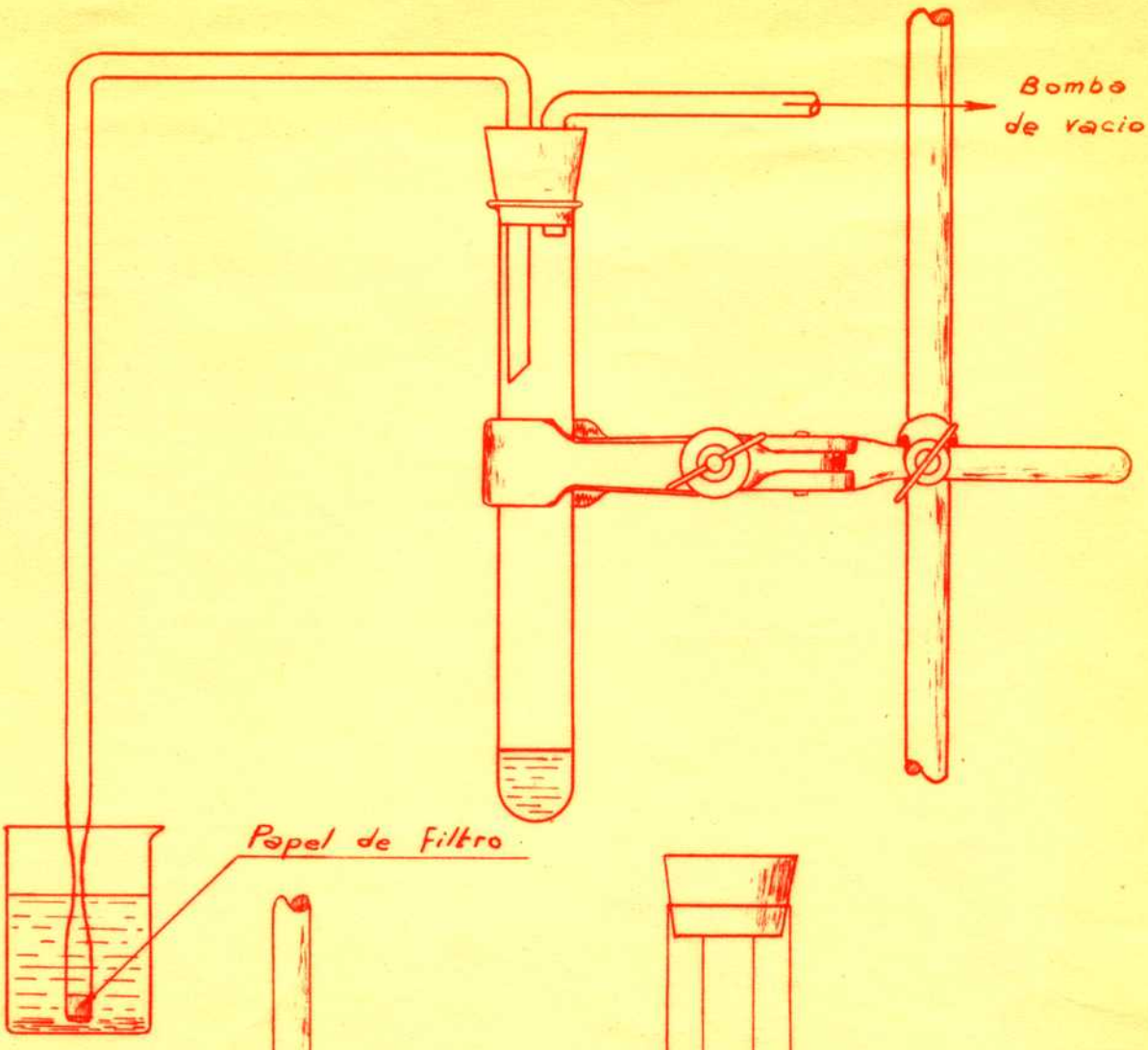
Serie N°1 (mg.%ml.) : 2 - 5 - 10 - 15 - 20 -

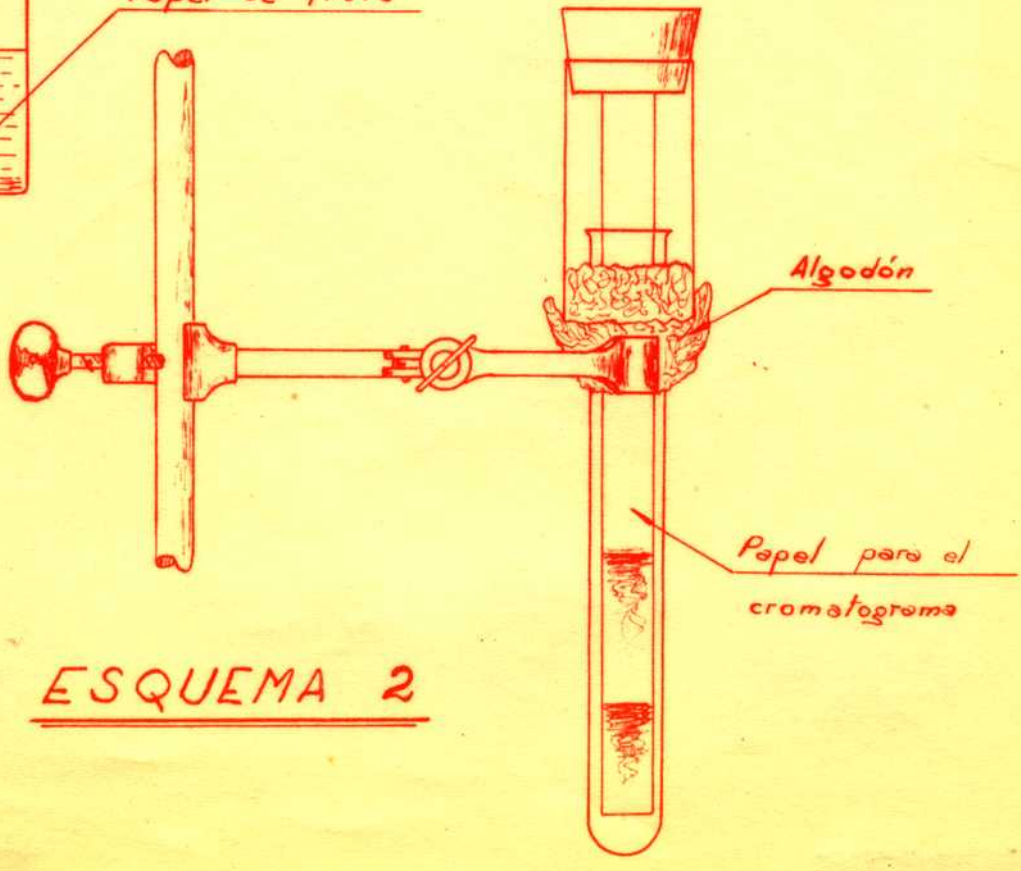
Serie N°2 (mg.%ml.) : 1 - 2 - 5 - 10 - 15 - 20 -

En ellas,(ver copias que adjunto a continuación) puede notarse especialmente en las tiras correspondientes a 5mg.% y 20mg.% la diferente distancia recorrida por la solución, por el simple hecho ya mencionado antes y que repito,haber dejado evaporar el éter a temperatura ambiente en la serie N°2.

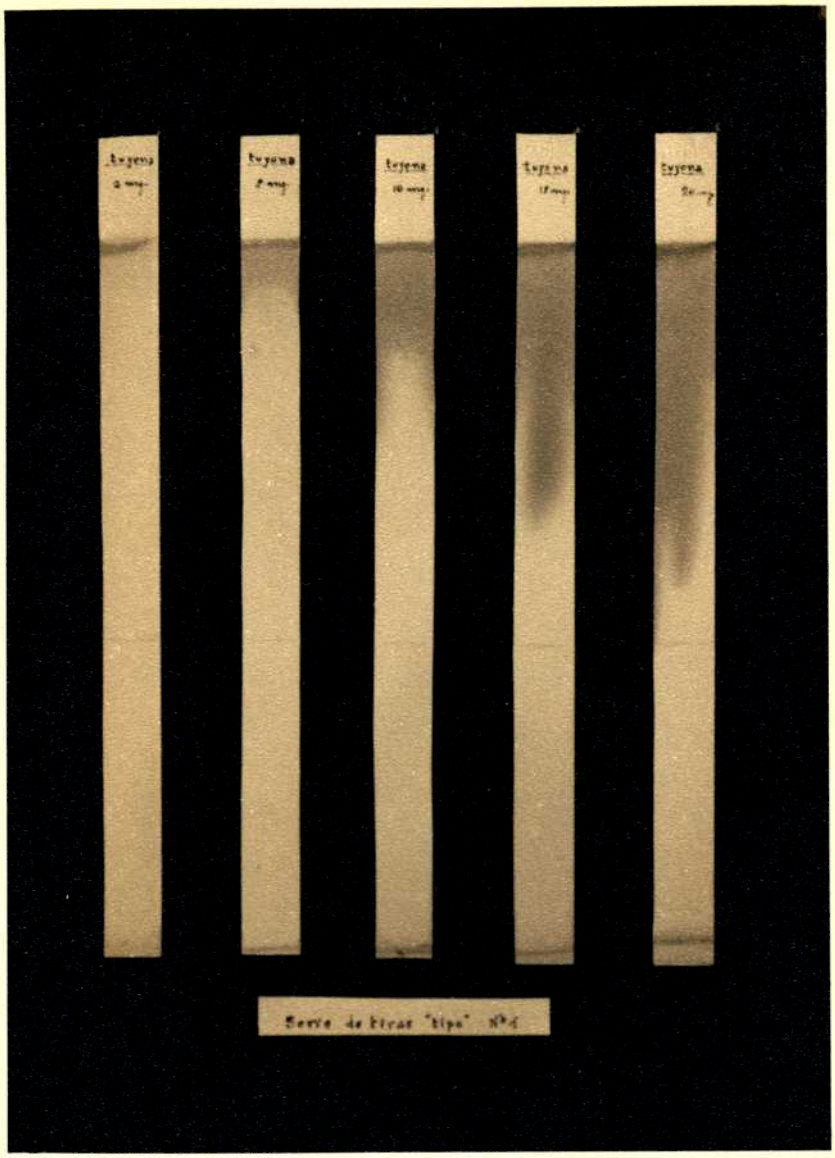
De la comparación con la serie de tiras "tipo" se podrá deducir el contenido de tuyona en cada muestra,teniendo en cuenta la cantidad de esencia utilizada. ----------0----------

ESQUEMA 1

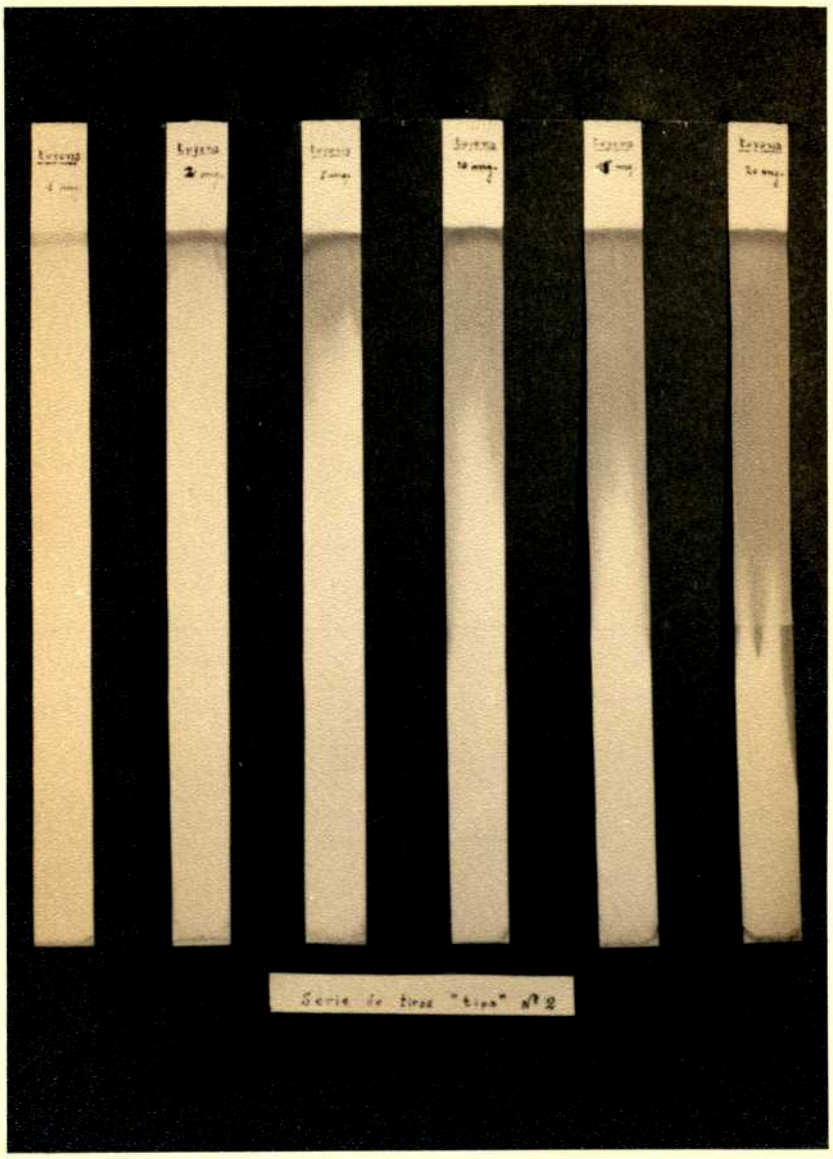




ESQUEMA 2



Serve de tiras "tipo" Nº 6


Serie de tiras "tipo" nº 2

III) Aislación de los aceites esenciales de las bebidas alcohólicas para investigar tuyona y técnica aplicada para obtener los derivados y efectuar la cromatografía

Al hablar, en el punto anterior, de la formación de 2-4-dinitrofenilhidrazonas, mencioné que el reactivo actuaba sobre extracto etereo de la esencia y cómo se llega a obtener ese extracto será el tema de esta parte.

En primer lugar, se preparan las soluciones tipo licor de cada una de las siguientes esencias: anís, hinojo, anetol, hisopo, salvia officianalis, tanaceto, carvona, tuyona, ajenjo y ajenjo salvaje. Para la obtención de estas bebidas, se pesa una cantidad determinada de esencia y se le añade 1 litro de alcohol de 40° (practicamente para obtener alcohol de 40° a partir de alcohol de 95°, se ponen 400cc. de este alcohol y se completan hasta 950cc. con agua destilada) incluyendo 200g. de azúcar.

Con el ajenjo debía preparar una solución de 0,5g./l. pero como la cantidad de esencia que tenía era muy escasa, extraje previamente con éter, luego dejé evaporar en un vaso de precipitado, previamente tarado, y finalmente por diferencia obtuve el peso del ajenjo.

Se prepara también, una solución hidroalcohólica de bisulfito de sodio, para ello se tiene en cuenta la siguiente proporción: por cada 200cc. de una solución saturada de SO_3HNa más 75cc. de agua, más 50cc. de alcohol de 95°.

Una vez que ya estan preparadas las soluciones, se trata de aislar las esencias: una de las técnicas utilizadas ya se ha visto al explicar la reacción de Legal; otra consiste en someter, primeramente a la destilación 100cc. de bebida en el aparato de Sallecon. En las primeras des-

tilaciones recogí 70cc. y luego completaba a 100cc. con agua destilada,en matraz aforada.

Comprobé que en esa forma se perdía mucha esencia,pues quedaba retenida en el aparato,entonces,en lugar de usar 100cc.de bebida trabajé con 50cc. diluidos con 100cc. de agua y recogí 100cc. de destilado.

No obstante,debí seguir agregando diferentes cantidades de agua, al balón de destilación,hasta que obtuve un destilado que me dió negativa la reacción con 2-4-dinitrofenilhidrazina,es decir que no formaba precipitado.

Del líquido total obtenido como destilado,se separan 50cc. que se tratan con 500cc. de la solución hidroalcohólica de bisulfito,esta mezcla se agita constantemente durante media hora y luego a intervalos.

Debía probar,que tiempo era el más conveniente para la formación del compuesto bisulfítico,primero con tuyona y luego aplicar la técnica seguida con ésta en las demás esencias.

Así comencé por dejarlos un día y fuí aumentando el período de contacto hasta llegar a los quince días.

Una vez que el,compuesto bisulfítico se formó,se extraen con cloroformo las esencias no reaccionantes,y efectuada la separación,las mezclas bisulfíticas se tratan con hidróxido de sodio al 30% hasta reacción alcalina al tornasol,para liberar los productos carbonílicos de la combinación bisulfítica.

Los productos carbonílicos se extraen con éter de petróleo liviano(fracción que destila entre 40°C y 60°C) usando 15cc. y 10cc.c/vez.

El extracto etéreo obtenido es el que se hace reaccionar con 2-4-dinitrofenilhidrazina y que de acuerdo con los estudios realiza-

debe aparecer un precipitado anaranjado de 2-4-dinitrofenilhidrazona, una vez evaporado el éter.

Pero, a pesar de las numerosas veces que repetí las experiencias, con el mayor cuidado en las técnicas, no logré en ningún momento el precipitado deseado.

Observé que si diluía la solución aparecía una turbidez que se acentuaba a medida que transcurría el tiempo y al cabo de unas horas daba lugar a la formación de agujas rojas. Separé tales cristales y una vez secos determiné su punto de fusión que resultó ser 184°C; esto con elusión de esto se tiene que tales agujas no eran más que el reactivo cuya insolubilidad se debía al agua agregada.

Teniendo que toda esta técnica aplicada no diera resultado por las pérdidas de esencia en la destilación apliqué una nueva,en la que utilizaba las bebidas sin destilar.

Se toman 50cc. de la bebida y se agregan 50cc. de solución saturada de cloruro de sodio (aumenta el coeficiente de partición) y 25cc. de éter de petróleo liviano,agitar por unos minutos y se decanta.

La solución éter-petrólica obtenida,se agita esporádicamente durante un día,con la solución hidroalcohólica de bisulfito de sodio.

Al cabo de ese período se separa la capa etérea,que se abandona.

La parte bisulfítica se alcalinisa con hidróxido de sodio al 10%. Se trata luego,con 20, 10 y5cc. de éter etílico. Los extractos etéreos se lavan.

Se evapora a temperatura ambiente el éter, agregando cuando queda aproximadamente 1cc.,alcohol etílico y se lleva a 25cc.

De la solución alcohólica obtenida se toman 5cc. los que se tratan con 5cc. de 2-4-dinitrofenilhidrazina,calentando a reflujo primero y después enfriando,para obtener el precipitado.

Nuevamente no hallé resultados satisfactorios ya que el precipitado final no apareció.

Entonces llegué a la conclusión de que las técnicas que usan la formación de compuestos bisulfíticos no pueden ser utilizadas con cantidades tan pequeñas de sustancias, ya que la máxima concentración era del orden de 20mg.%.

Así, tras una serie de investigaciones negativas, se llegó a un método que dió buenos resultados, y que sencillamente consiste en: tras bajar con 50cc. de licor y añadirles una solución saturada de cloruro de sodio y 25cc. de éter de petróleo liviano, se agita durante unos minutos y luego se decanta, obteniéndose el extracto etéreo que llegó a dar el tan esperado precipitado de 2-4-dinitrofenilhidrazona.

---------O---------

IV) Cromatografía de los derivados obtenidos del ajenjo,salvia officinalis,tanaceto,hisopo,hinojo,anís,anetol,y sus mezclas.

Todo el proceso que expliqué en puntos anteriores,para aislación y cromatografía de la tuyona,se aplica a las demás bebidas,ya mencionadas,y también a mezclas obtenidas con diferentes concentraciones de ellas.

En los cromatogramas de las esencias,que adjunto,puede observarse que con los derivados de anís,anetol e hinojo,no aparece la mancha anaranjada que caracteriza al compuesto de tuyona.

Por el contrario,se obtienen cromatogramas semejantes a los de tuyona,con los derivados de ajenjo,salvia officinalis, tanaceto e hisopo.

Según datos bibliográficos,las tres primeras esencias (de estas últimas) poseen en su composición cantidades variables de tuyona, pero en el caso del hisopo no existe tal componente,sino la pinocanfona,no obstante la reacción es semejante a la de tuyona.

Por este motivo,traté de aplicar métodos que permitan distinguir hisopo y tuyona,cuyos resultados se verán al tratar incompatibilidades del proceso seguido.

La carvona da un cromatograma rojo,completamente diferente a los anteriores.

Las mezclas,cuyos cromatogramas pueden verse a continuación,fueron preparadas de la siguiente manera:

1) 100 cc. de solución de anís + 50cc. de soln. de hinojo.

11) 100cc. " " " anetol +50cc. de " " salvia officin.

111) 100cc. " " " anís + 50cc. " " " hisopo.

1V) 100cc. " " " anetol + 50cc. " " " tuyona (0,6g/l).

V) 150cc. de solución de anetol + 50cc. de solu. de ajenjo salv.

VI) 150cc. " " " anís + 50cc. " " " carvona.

VII) 100cc. " " " " + 50cc. " " " hinojo +
50cc. " " " hisopo.

VIII) 150cc. " " " anetol + 50cc. " " " ajenjo.

IX) 100cc. " " " anís + 50cc. " " " hinojo +
50cc. " " " tanaceto.

X) 100cc. " " " anetol + 25cc. " " " carvona +
25cc. " " " ajenjo.

Para poder apreciar más,la sensibilidad del método cromatográfico,daré la concentración de cada uno de los componentes de estas mezclas,de acuerdo con el volumen utilizado.

I) 0,033g. de anís + 0,017g. de hinojo.

II) 0,033g. de anetol + 0,017g. de salvia officinalis.

III) 0,033g. de anís + 0,017g. de hisopo.

IV) 0,037g. de anetol + 0,0075g. de tuyona.

V) 0,037g. de anetol + 0,012g. de ajenjo salvage.

VI) 0,037g. de anís + 0,0062g. de carvona.

VII) 0,025g. de anís + 0,0125g. de hinojo + 0,0125g. de hisopo.

VIII) 0,037g. de anetol + 0,0062g. de ajenjo.

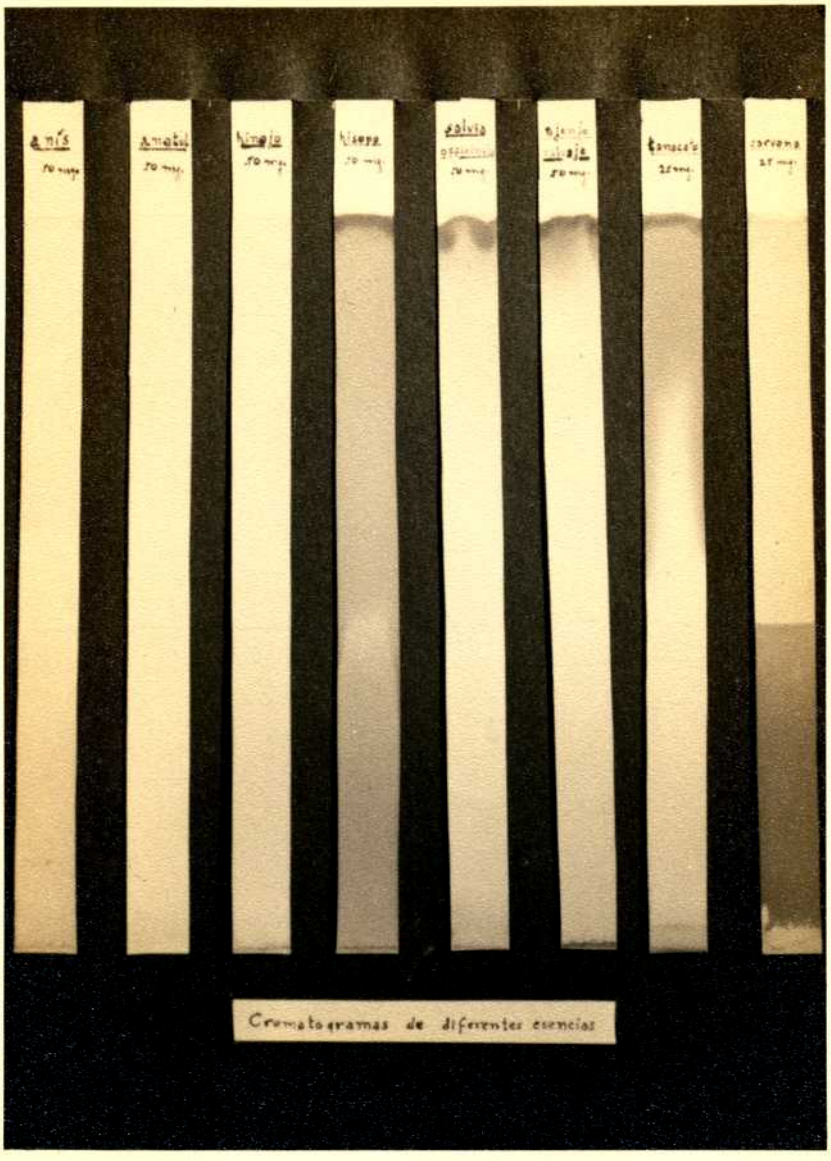
IX) 0,025g. de anís + 0,0125g. de hinojo + 0,0062g.de tuyona.

X) 0,033g. de anetol + 0,0041g. de carvona + 0,0041g.de ajenjo.

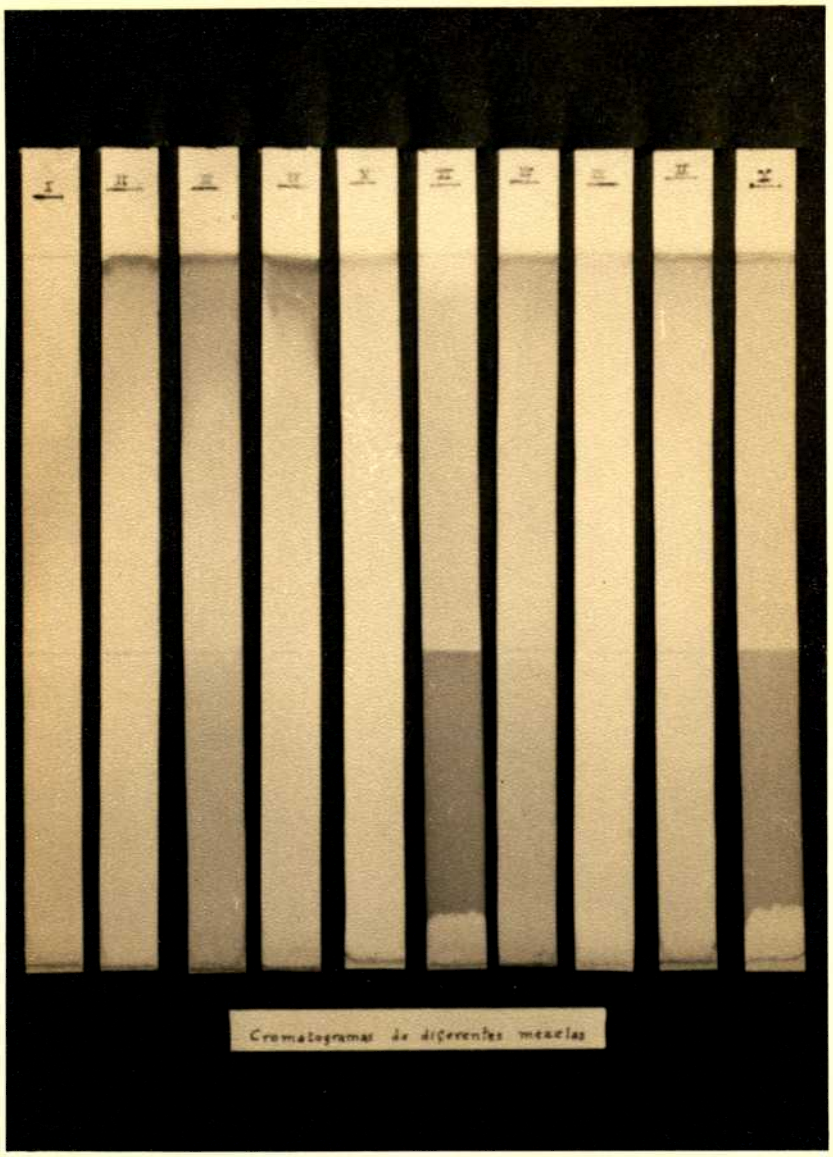
En todos los casos trabajo con el mismo volumen(50cc.)

Se puede apreciar que el calor dado por el derivado de la tuyona y del hisopo no se enmascara ante la presencia de otras esencias,pudiéndose por lo tanto,identificarlos facilmente en cualquier mezcla, aún en cantidades del orden de 6mg.

---------0---------



Cromatogramas de diferentes esencias



Cromatogramas de diferentes mezclas

V) Sensibilidad del método propuesto

Incompatibilidades y alcance

El método propuesto da una apreciación correcta de variaciones menores de 0,005g.% en el contenido de tuyona y con él se puede detectar hasta 1ug.%,como se ha visto ya,en una de las series "tipo".

Pero este procedimiento no será aplicable cuando la tuyona esté acompañada de hisopo (pinocamfona) pues ambos son capaces de dar 2-4-dinitrofenilhidrazonas,de propiedades similares.

Si bien no se puede distinguir por este método,tuyona e hisopo, en cambio permite señalar que el hinojo no da ninguna mancha en el cromatograma,y por lo tanto el alcance de esta reacción es superior a la ya mencionada de Legal.

El color de los cromatogramas obtenidos se conserva sin variaciones durante semanas,permitiendo el uso de la serie de "tipos"para numerosas determinaciones.

Con el fín de hallar diferencias, entre los compuestos de hisopo y tuyona que permitieran separarlos,se hicieron otras experiencias.

Apliqué entonces,la técnica aconsejada por Iris,quien investiga tuyona adicionándole 0,3% de yodo metálico y para evitar la influencia de los aldehidos,trata previamente el destilado con 10% de SO4Zn.

El color verde característico de la tuyona en esta reacción,apareció también al tratar el hisopo,con lo que se demostraba que por medio del yodo metálico no sería posible investigar tuyona en presencia de hisopo.

A instancias siempre del Dr. Montes realicé otras investigaciones que se basaron en la determinación del Rf, por consiguiente ha-

blará en primer término de este factor y luego se halla:

Las moléculas de soluto migran a través de una columna de absorción con una velocidad que se determina por el flujo del solvente y por la relación de las moléculas en solución a aquellas absorbidas. Sobre esta base la distancia recorrida por las bandas de soluto, está también relacionada a la distancia recorrida por el solvente.

Así se tiene:

$$\frac{\text{Cant. de soluto no absorbida}}{\text{Cant. de soluto absorbida}} = \frac{\text{Dist. recorrida por el soluto}}{\text{Dist. recorrida por el solvente}} = R$$

La constante R se determina de varias maneras según el tipo de absorbente.

Con absorbentes de superficie activa R se determina de acuerdo al límite frontal de las bandas no simétricas y se representa por RF

En muchas investigaciones los valores de RF se han publicado sin referencia a la temperatura, el pH, o la concentración de la solución o líquido de lavaje. Sin embargo todas estas condiciones influyen en la velocidad de migración por tanto deben establecerse junto a los valores R (102).

Además algunos autores miden la distancia recorrida por el soluto hasta el límite frontal de la banda y otros, hasta el centro de gravedad de la misma.

Bate-Smith han estudiado las condiciones necesarias para obtener valores seguros de RF trabajando sobre papel:

a) Debe trabajarse con la misma partida de papel, que previamente a de estabilizarse.

b) Debe controlarse la temperatura.

c) El tiempo de corrido debe ser constante.

d) Paralelamente debe trabajarse con una sustancia control; si los valores de éstos difieren en más que 0,02 la corrida debe descartarse y usar solventes frescos.

Los primeros ensayos de determinación del Rf con los derivados de tuyona e hisopo, los hice sobre tiras de papel, semejantes a las utilizadas en todos los cromatogramas.

Obtenidas las 2-4- dinitrofenilhidrazonas de las esencias mencionadas,las disolví en la conocida mezcla de ligroína y benceno.

Como el Rf es función de la concentración,no conviene trabajar con soluciones, sino depositar unas gotas en el extremo de la tira, dejar evaporar el solvente y luego desarrollar el solvente fresco.

Las gotas deben depositarse a una distancia del extremo de la tira,tal que al colocar esta en el tubo de prueba,el solvente no moje la mancha,sino luego de haber ascendido capilarmente,por lo menos un centímetro.

En ambos casos usé ligroína para los desarrollos.

Una vez listas las tiras se le marcan dos trazos a 3 y 18 cm. de la base,respectivamente. En la primera se depositan cuatro gotas de la solución esterobencénica del derivado en estudio. Se deja evaporar el solvente y se coloca la tira en el tubo de prueba que contiene 2 ml. de ligroína.

Cuando éste ha alcanzado la traza superior se detiene el desarrollo.

Por observaciones realizadas al trasluz fuí verificando a lo largo de los 18cm. que tanto el compuesto de tuyona y del hisopo, no presentaban diferencia de difusión con la ligroína.

En consecuencia,esta determinación del Rf carecería de valor para distinguir las dos esencias.

Un segundo ensayo fué llevado a cabo de la siguiente manera:

En lugar de trabajar con tiras de papel,usé columnas de 0,8cm. de calibre y 18cm. de altura. El material de relleno utilizado,por considerarse el más adecuado,resultó ser una mezcla de dos partes en peso de ácido silícico Lopal y una bentonita,cuyas características ya han sido transcriptas al estudiar,la aplicación de la cromatografía a los aceites esenciales.

Para soportar este material,se coloca en la base de la columna una capa delgada de algodón;para distribuirlo y asentarlo,se golpea la base de la columna sobre madera,suave y repetidas veces hasta observar que el nivel del relleno no baja apreciablemente.

Ya lista la columna,agregué a una, 2,5ml. de extracto,obtenido esa cantidad de disolvente para disolver una cantidad conocida de tuyona; y a la otra,el mismo volumen correspondiente al derivado del hisopo; ambos hallados en las mismas condiciones.

Cuando el disolvente llega a 10cm. en ambos tubos, controlé la distancia recorrida por el soluto,dando los siguientes valores: 2-4-dinitrofenilhidrazona de hisopo: 0,9cm.

Aplicando la fórmula para hallar el Rf, se tiene:

Rf tuyona : 0,14

Rf hisopo : 0,09

Una vez secas las columnas,traté de lograr una distancia mayor entre las bandas y para ello agregué a cada una 2ml. de ligroína. Cuando el disolvente alcanzó los 10cm. ya tenía un corrimiento mayor, el que aplicado al cálculo del Rf resultó:

Rf tuyona : 0,19

Rf hisopo : 0,15

La diferencia como puede apreciarse es mayor,no obstante, realicé una nueva operación:

Secas las columnas añadí a ambas 2ml. de una mezcla formada por una parte de benceno y tres partes de ligroína.

Al llegar nuevamente a los 10cm.,el disolvente,la 2-4-dinitrofenilhidrazona-tuyona alcanzaba una altura de 4,7cm.,mientras que la 2-4-dinitrofenilhidrazona-hisopo,llegaba a 3,1cm.

Los Rf correspondientes,fueron:

Rf tuyona : 0,47

Rf hisopo : 0,31

Estos resultados permitían distinguir perfectamente el compuesto de tuyona y el de hisopo, lo que resulta interesantísimo en las investigaciones del ajenjo.

---------o---------

VI) Conclusiones

La aplicación de la cromatografía al problema analítico de la investigación y determinación de la tuyona en bebidas alcohólicas, obviando las interferencias de otros componentes carbonílicos, nos permite concluir que:

1) El método basado en la extracción de la esencia, precipitación de las 2-4-dinitrofenilhidrazonas y cromatografía en papel, es de aplicación relativamente sencilla.

2) La sensibilidad del método permite trabajar sobre 2,5 ml. a 50 ml. (concentración 0,4 g./l.) de bebida sin destilación previa.

3) La única interferencia que se mantiene (son omitidas las de fenona, carvona y anisaldehido) es la de la pinocanfona (de la esencia de hisopo), pero puede ponerse de manifiesto por determinación del RF en pequeñas columnas de ácido silícico - bentonita, sin mayores complicaciones.

Por lo tanto estimamos que el método cromatográfico propuesto puede resultar útil en la investigación de ajenjo o esencias que contienen tuyona (salvia officinalis y tanaceto, por ejemplo) y también del hisopo, que es posible distinguir de aquel, en bebidas o extractos alcohólicos secos o azucarados.

---------o---------

Bibliografía

(1) Laborde A. "Annales des Falsifications" (1915) pág.99

(2) "Annales des Falsifications" (1915) pág.28

(3) Trivisonno N. "Toxicología" (1929) pág.348

(4) Florey H., J. Path. Bact. (1925) pág.640

(5) Pooper H.I. - "Chem.Abstracts" - (1944) pág.1826

(6) Lincoln C. - "Arch. Neurol. Psychiat." (1939) pág.460

(7) Wiley - "Alcoholic beverages" pág.388

(8) A. Strucchi - "Il Vermouth di Torino"

(9) "Annales des Falsifications" (1911) pág.177

(10) "Traité theorique et practique des Fraudes et Falsifications" - Monier F., Chesney, et Roux E. - París 1925 - vol.I pág.859

(11) "Annales des Falsifications" (1927) pág.53

(12) Revista de los Impuestos Internos (1935) pág.9

(13) Leyes, Decretos y Resoluciones - pág.67

(14) Kwasniewski V. - "Pharm. Zentrahalle",1950, 89, 379; C.A.,45,1991a

(15) Charabot E. Compt. Rend. (1900) pág.930

(16) Roure A. de Parry E.S. - "La Química de los Aceites Esenciales y Perfumes Artificiales" (1921)

(17) Paolini y Lemánaco - "Annales des Falsifications" (1915)pág.157

(18) Babak A. - "American Perfumer" (1910) pág.192

(19) Dr. A. La Manna - "Productos Aromáticos"

(20) Madus G. y Schindler H. - "Arch. Pharm." pág.276 a 290

(21) Ber. 11 (1878) 149

(22) J. Org. Chem. 3 (1939) 578

(23) J. Assocn. Off. Agr. Chem. 13 (1930) 396

(24) J. Chem. Soc. (1938) 2016

(25) J. Chem. Soc. (1935) 151

(26) J. Am. Chem. Soc. 57 (1935) 758

(27) J. Org. Chem. 3 (1939) 578

(28) J. Chem. Soc. (1938) 2016

(29) Helv. Chim. Acta 15 (1932) 948
(30) Finnemore - "Essential oils"
(31) J. Org. Chem. 3 (1939) 582
(32) Chem. Abstracts 24 (1930) 5933
(33) Ber. Schimmel & Co. April (1908) 120
(34) Wallach Festschrift (1909) 421
(35) Ber. Schimmel & Co. (1941) 50
(36) Ibid.
(37) Bull. inst. pin. (1934) 173
(38) Ber. Schimmel & Co. (1934) 99
(39) Liebigs Ann. 353 (1907) 215; 369 (1909)
(40) Bull. soc. chim. (4); 35 (1924) 1330
(41) Liebigs Ann. (1890) (1891) (1893) (1901) (1908)
(42) Ibid. 498 (1932) 166
(43) Ber. 50 (1917) 1374
(44) Ber. 68 B (1935) 2001
(45) Bull. soc. chim. Belg. 49 (1940) 129
(46) Liebigs Ann. 549 (1941) 180
(47) Ibid. 263 (1891) 131
(48) Compt. rend. 126 (1898) 756
(49) "Einfache und Fraktionierte Destillation" 2d. Ed. Nilitis (1923) 251,291.
(50) Ber. 50 (1917) 1375
(51) Ber. 27 (1894) 810
(52) Liebigs Ann. 275 (1893) 118
(53) J. Am. Chem. Soc. (1939) 1961
(54) Chem. Abstracts 34 (1940) 219; 33 (1939) 811
(55) Liebigs Ann. 275 (1893) 114
(56) Ber. 34 (1901) 2109
(57) "Die Atherischen Ole" 3d. Ed. Vol.I, 595
(58) Chem. Abstracts 33 (1939) 3360

(59) J. Am. Chem. Soc. 52 (1930) 4090
(60) Chem. Abstracts 33 (1939) 4971; 35 (1941) 4356
(61) "Die Atherischen Öle" 3d. Ed. Vol.I,604
(62) J. Soc. Chem. Ind. 42 (1923) I. T.
(63) Ber. 23 (1890) 862
(64) Jen. 3 (1943) 410
(65) Chem. Zenthr. I (1891) 788
(66) Ann. Chem. Soc. 52 (1930) 739
(67) J. Chem. Soc. (1941) 672
(68) An. Chem. 19 (1897) 858
(69) Gazz. chim. ital. I, 50 (1920) 149
(70) J. Chem. Soc. (1940) 1094
(71) Ber. 35 (1902) 2997
(72) Ber. 77 B. (1944)
(73) J. Assoc. Official Agr. Chem. 13 (1930) 390
(74) Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.,6 (1934) 454
(75) Analyst 61 (1936) 392
(76) "Die Atherischen Öle" 3d. Ed. Vol.I, 532
(77) Z. anorg. Chem. 101 (1917) 142
(78) Liebigs Ann. 408 (1915) 240
(79) Guenther Ernesto - "The essential oil" Tomo 2 - pág.425, 442, 418, 412, 508, 398.
(80) Tswett,M. - Ber. Dtsch. Ges. 24, 235 (1906)
(81) Weil H. y Williams T. - Nature 167, 906, 1951
(82) Goppelsroeder F. - "Anregung zum Studium der Capillaritäts und Adsorptionserscheinungen beruhenden Capillaranalyse" Basel (1906).
(83) Kuhn R., Winterstein A. y E. Lederer Z. physiol. Chem. 197,141 (1931).
(84) Arden T. V. y col., Nature, 162, 691 (1948)
(85) "Cromatografía sobre papel" V. Villar Palasi (1952)

FCEFN-BA.

(86) Nachod F. C. (editor técnico) - "Ion Exchange,Theoryland A-

(87) Tiselius, A. Ark. Kemi Min. och. Geol. 41 B nfn. 22 (1940)

(88) Claesson S., Ann. N. Y. Acad. Sci. 49, 183 (1948)

(89) Martin A. J. y R. L. M. Synge, Biochem J. 35, 1358 (1941)

(90) Consden R.; Gordon A. y A. J. P. Martin, - Biochem J. 38, 224 (1944).

(91) Fleetner y Pfau - Helv. Chim. Acta; 20, 230 - 231 (1937)

(92) Bloekmann y Velpers - Analyst 71;251/63; (1946)

(93) Kiehner J. G.; Miller J. M. y Keller G. - "Separation and identification of some terpenes by a new chromatographic technique"; Analytical Chemistry 23 Nº3, 420/5 (1951)

(94) Miller J. M. y Kirchner J. G. - "New tips of chromatographic column" - Analytical Chemistry 23 Nº3, 428/30 (1951)

(95) Scheltema C. - "Perf. and Ess. Oil" Rec. 38 Nº7,235/7 (1947)

(96) Dr. A. L. Montes - "Productos Aromáticos"

(97) Meinhard J. E. y Hall H. F. - Annal. Chem. 21- 185 -(1949)

(98) Flood H. - Z. Anal. Chem. 120; 127 (1949)

(99) Heph P. P. J. Am. Chem. Soc. 785 (1940)

(100) Karrer P. - "Tratado de Química Orgánica" (1937) pág.801

(101) Delage J. C. - "Annales des falsifications" (1923) pág.412

(102) Strain H. H. -"Analytical Chemistry" (1949)

(103) Bate Smith E. C. - "Symposia Biochem Soc." 3 - 62 - (1949)

Adolfo L. Fuentes

Beatriz Cortina