

Tesis de Posgrado

Cromatografía de aceites esenciales y sus componentes

Frydman, Benjamín Jaime

1956

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:

Frydman, Benjamín Jaime. (1956). Cromatografía de aceites esenciales y sus componentes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0901_Frydman.pdf

Cita tipo Chicago:

Frydman, Benjamín Jaime. "Cromatografía de aceites esenciales y sus componentes". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1956. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0901_Frydman.pdf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
CROMATOGRAFIA DE ACEITES ESENCIALES
Y SUS COMPONENTES

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química:

Benjamín J. Frydman

RESUMEN

Se ha aplicado el análisis cromatográfico a la resolución y análisis de los aceites esenciales. Ante la necesidad de establecer métodos de cromatografía de los aceites esenciales y tomando en cuenta los trabajos ya existentes sobre componentes de aceites esenciales en este terreno, se ha procurado establecer una técnica que permita la resolución cromatográfica de éstos. El análisis cromatográfico directo de aceites esenciales se ha visto impedido por las características de los aceites esenciales pues son casi irresolubles por la cromatografía de adsorción en columna y la cromatografía de partición en papel. Por eso en los últimos diez años se resolvió la cromatografía de las esencias separando distintas fracciones de ellas, carbonílicas, fenólicas, terpénicas etc. y cromatografiándolas por separado. En este trabajo se ha encarado la cromatografía directa de los aceites esenciales y se ha resuelto con éxito. Se adoptó la técnica de la placa adsorbente "chromatoplate" empleada para componentes de esencias y se adaptó de forma que resultó eficaz para la cromatografía de aceites esenciales. Se cromatografiaron primero componentes puros, luego mezclas ternarias y cuaternarias de éstos y por último aceites esenciales. Se cromatografían las esencias en una placa de vidrio recubierta de material adsorbente. Se aplicó a cuarenta aceites esenciales. La placa es de 3 mm. de espesor, el tamaño

Rev de Teni: 901

es de 20 cmts. x 11 cmts. La mezcla adsorbente se prepara así: 30 grs. de ácido silícico, se tamizan por 200 mallas, se mezclan con 3 grs. de almidón en polvo, se le agrega la mezcla 15 mml. de solución de rodamina 6 G al 0,1 o/oo en agua y luego 39 ml. de agua. Si no se piensa emplear luz U.V. en la placa se agregan directamente a la mezcla 54 ml. de agua. Se empasta a baño maría a 85 °C agitando. En corto tiempo la mezcla se espesa. Agitando se retira del baño y se deja enfriar. Se le agrega 10 ml. de agua. Se recubre la placa con una capa de 0,5 mm. de la mezcla. La placa se lleva a estufa a 110°C y se deja exactamente 30 minutos. Aún caliente se somete al vacío de 0,5 l mm. sobre HOK durante una hora. Se rompe el vacío con aire seco. El desarrollo de 15 cmts. tarda 90 minutos. Para disolver la sustancia se usó éter etílico. Como solvente se usó hexano normal y 15% acetato de etilo. Se revelan los componentes con:

- a) Los carbonílicos con solución clorhídrica de 2,4 dinitrofenilhidrazina en frío, luego con calor a 105°C durante 10 minutos y luego a la luz U.V. La rodamina da fluorescencia amarilla y en el lugar donde hay sustancias activas a la luz U.V. se ven manchas violáceas.
- b) Los terpénicos no carbonílicos aprovechando su sensibilidad a los ácidos y al calor y su adsorción a la luz U.V.
- c) Los compuestos alcohólicos y con ligaduras no saturadas de las esencias se oxidan con ácido crómico recubriendo la gota con solución de ácido acético saturada con ácido crómico y se revelan con los métodos a) y b).
- d) Se introduce un revelante nuevo para los aceites esenciales, el Sudan 3. Además cada componente se identifica por un Rf.

FOFNA


-3-

Este método es muy exitoso en la resolución de los aceites esenciales. Su rapidez, su alto poder de resolución evidenciado en los numerosos componentes revelados, y la valiosísima idea que proporciona sobre los grupos funcionales de los componentes de esencia (carbonílicos, terpénicos, alcohólicos, con ligaduras no saturadas) así como la ventaja principal de ser una cromatografía directa de los aceites, nos permite ser optimistas sobre su utilidad en el campo de la química analítica.

BN Friedman

Buenos Aires, 7 de diciembre de 1956.-

Presentada en la fecha.


DR. JUAN CARLOS G. RODRIGUEZ
PRESIDENTE

Buenos Aires, 10 de diciembre de 1956.-

Pase a la Comisión Examinadora Grupo VI, para que -
tenga a bien considerar la tesis presentada por el ex-alumno de
la carrera del Doctorado en Química, D. Benjamín Jaime Frydman.

nt.-

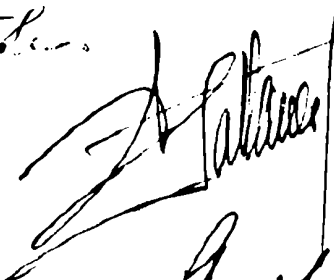
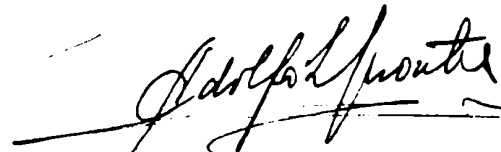
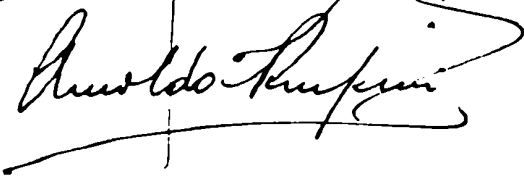



DR. ARISTIDES J. B. ROMERO
SECRETARIO


DR. JOSE BABINI
Decano - Interventor

Buenos Aires, 10 de Diciembre de 1956.

La Comisión Examinadora a su vez ha
considerado la presente tesis y resuelve aceptar
la misma.

TESIS: 901

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

CROMATOGRAFIA DE ACEITES ESENCIALES Y
SUS COMPONENTES

Tesis presentada para optar al
título de
Doctor en Química

por

Benjamín J. Frydman

1956

- TESIS: 901

CEMA

A MIS PADRES

Agradezco al estimado Dr. Adolfo L. Montes su competente dirección y su inapreciable apoyo en el presente trabajo, así como también el haber puesto a mi disposición su valiosa colección de aceites esenciales y sus componentes.

INDICE

	Pag.
A. Introducción Histórico Bibliográfico	
A manera de prólogo	▪ 1 -2
Composición de los aceites esenciales	▪ 3 -4
Métodos y teorías del análisis cromatográfico	▪ 5- 11
Cromatografía de sustancias incoloras	▪ 12- 14
Cromatografía aplicada a los componentes de esencia	▪ 15- 16
B. Parte Teórica	
Ensayos con papel	▪ 17- 18
Teoría del "chromatostrip"	▪ 19- 20
Teoría y aplicación de los ensayos utilizados	▪ 21- 25
Propiedades de los aceites esenciales y sus componentes	▪ 26 - 32
C. Parte Experimental	
Preparación de la placa adsorbente	▪ 33- 34
Preparación de los cromatogramas	▪ 35- 36
Resultados obtenidos	▪ 37 -50
Conclusiones	▪ 51- 52
Bibliografía	▪ 53- 54

A.- I N T R O D U C C I O N

Historica - Bibliografica

A manera de Prólogo

Este trabajo, de cromatografía directa de aceites esenciales, es la última parte de una serie de trabajos realizados por distintos investigadores en el país y en el extranjero en los cuales trataron de adaptar el análisis cromatográfico al estudio de aceites esenciales. Queremos significar con lo dicho, que este trabajo, en ensayo directo de la adsorción cromatográfica sobre los aceites esenciales, es el último eslabón en una larga serie de ensayos y métodos hechos sobre los componentes de los aceites esenciales. En los últimos 8-10 años en que se trató de resolver la constitución de los aceites esenciales se aplicó la cromatografía a sus componentes, tratando de lograr métodos para la perfecta resolución e identificación de componentes puros de aceites esenciales y de sus mezclas. Por supuesto que tales esfuerzos, realizados por excelentes analistas han dado sus frutos y la química analítica se ha visto enriquecida de métodos exactos y precisos para la identificación de los complejos componentes de los aceites esenciales. Este trabajo no es pues un trabajo aislado ni un análisis cromatográfico más, sino que viene a llenar el último capítulo de la aplicación de la cromatografía al estudio de los aceites esenciales; que es la cromatografía de los aceites esenciales mismos.

El análisis cromatográfico de los componentes de los aceites esenciales y de sus derivados (hidrazonas, dinitrobenzatos, etc.) a través de decenas de trabajos, publicaciones, tesis, etc., ya ha alcanzado una muy buena precisión y se hace un imperativo diríamos el aplicar sus métodos y reacciones adaptándolos al análisis de los aceites esenciales mismos.

La cromatografía de los aceites esenciales no ha sido hasta ahora desarrollada como lo fué la cromatografía en otros campos de los compuestos orgánicos o biológicos (aminocidos, pigmentos

clorofilianos, glúcidos, proteínas, ácidos orgánicos, nucleósidos y nucleótidos, alcaloides, vitaminas, aminas biológicas, etc) porque las mismas características de los aceites esenciales los hacían inaptos para ser cromatografiados. Este tipo de sustancias, así también como las ceras y grasas, fueron calificadas por Watson, que tanto hizo en la cromatografía de pigmentos clorofilianos, como los "venenos de la cromatografía". Por lo tanto se encaró el análisis por senderos laterales, se cromatografiaron componentes, se separaron fracciones carbonílicas al estado de 2-4 dinitropenilhidrazonas y se cromatografiaron, se cromatografiaron 3-5 dinitrobenzatos de alcoholes y fenoles, etc. Pero todos estos excelentes trabajos ya han preparado el terreno para acometer la cromatografía directa de aceites esenciales.

Esto es lo que nos hemos propuesto en el siguiente trabajo, bajo la experta dirección de ese infatigable investigador en el campo de los aceites esenciales que es el Dr. A.L.Montes, verdadero "pionero" del análisis de aceites esenciales en el país y en el exterior; y que junto con otro trabajo de A.Troparevsky también bajo la guía del Dr. A.L.Montes, tratan de sentar bases generales y métodos standard en la cromatografía directa de aceites esenciales.

Composición de los aceites esenciales

Haremos una pequeña reseña histórico-bibliográfica de como surgió y se desarrolló el análisis cromatográfico en nuestro campo para situar mejor nuestro trabajo; pero ante algunas palabras sobre los aceites esenciales mismos. Nos referimos siempre al excelente libro Productos Aromáticos del Dr. A.L.Montes, donde este tema, tan profuso en definiciones erróneas y conceptos mal aplicados, está expuesto con claridad y exactitud.

Los aceites esenciales o esencias vegetales son productos de naturaleza química compleja, volátiles, muy difundidos en el reino vegetal (se conocen más de mil doscientas especies y variedades aromáticas de 76 familias distintas), en los que puede predominar por la intensidad de su aroma alguno de sus componentes poco aromáticos; o puede ser su perfume resultante de la combinación de los aromas de varios componentes.

Según el método de extracción empleado (por disolventes, por prensado, por enflorado, etc) se obtienen de los vegetales productos que varían en su composición y que además del aceite esencial pueden contener otros componentes del vegetal, como ceras, aceites fijos, colorantes, etc.

Los aceites esenciales pueden hallarse preformados en los vegetales (es el caso de la mayoría) o formando parte de heterósidos de los que son liberados por hidrólisis, o bien son producidas constantemente y en pequeñas cantidades (tal es el caso del jazmín y nardo)

La composición de los aceites esenciales es compleja; adoptamos la clasificación general de Montes para las 450 aproximadamente, compuestos conocidos:

1°) el más importante y característico: el de los terpenos, acíclicos o cíclicos, monoterpénicos, sesquiterpénicos, mono o

bicíclicos, tales el limoneno, el felandreno, el pineno, el canfeno, el geraniol, el citral, el linalol, el citronelal, el cineol, el mentol y la mentona, la carvona, el alcanfor, el vetiverol, santalol, el cedrol, el cedreno, etc.

2°) Los de núcleo benzénico, también muy importantes, que para algunos aceites esenciales constituyen los componentes predominantes (por ej. en los de canela, clavo de olor, tomillo, anís, etc.) Entre otros: el benzaldehído, el cinamaldehído, el alcohol fenilético, la vainillina, el piperonal, el timol, el anetol, el eugenol, el p-cimeno, el ácido benzoico, el ácido cinnámico, etc.

3°) Los alifáticos de cadena recta, que en general son componentes menores, siendo particularmente importantes los ácidos. Por ej: Aldehído decílico, metilheptenona, ácidos fórmico, acético, caproico, etc.

4°) Incluiría este grupo componentes sulfurados, nitrogenados y heterocíclicos, así como también los aún no identificados: entre ellos podemos citar: el isotiocianato de alilo, los sulfuros de alilo, sulfuro de butilo y propenilo, sulfuro diero-tílico, antranilato de metilo, indol, furfural, etc.

Para establecer la identidad de todos estos compuestos y resolver la composición de los aceites esenciales se trabajó desde la alquimia hasta nuestros días.

El estudio sistemático de los componentes fué iniciado por J.B. Dumas (1800-1884) y luego M. Berthelot (1827-1907) W. Tilden (1842-1926), Otto Wallach (1847-1931), O. Aschan, S. Bertram, L. Ruzicka.

Métodos y teorías del análisis cromatográfico

Antes de detallar la aplicación de la cromatografía al análisis de aceites esenciales, daremos una idea sobre las bases del método de adsorción cromatográfica.

El análisis cromatográfico (1) se comporta en su realización como una adsorción fraccionada que permite una separación completa de sustancias muy semejantes entre sí en solución, operando siempre con cantidades muy pequeñas de muestra del orden del mg. y hoy en día del orden de las gammas.

La cromatografía puede emplearse en lugar de la destilación fraccionada en aquellas sustancias que no pueden destilarse sin descomposición, es decir sustancias difícilmente volátiles y por lo tanto la cromatografía se asemeja mucho a una rectificación en que el proceso de selección se repite varias veces automáticamente. Esta teoría de asemejar el cromatograma a una columna de destilación fraccionada fué desarrollada por Martin y Synge (2) (en 1941) y luego por Weiss (3), Offord (4), DeVault (5) y Glueckauf (6).

La cromatografía clásica es la cromatografía en columna, ideada por Tswett en 1906 (7) para separar los pigmentos clorofiliana (xantofila y carotina) y la clorofila A y B. El principio se base en lo siguiente: la solución conteniendo la mezcla a absorber se filtra a través de una sustancia adsorbente pulveriforme contenido en un tubo de vidrio, adaptado verticalmente a l frasco aspirador. En dicha operación las sustancias disueltas se van precipitando una tras otra en la columna, dando l sucesión de anillos superpuestos.- Si las sustancias son coloradas aparecen una sucesión de anillos coloreados: de ahí el nombre original de cromatografía. La segunda operación es el "desarrollo", es decir después que la solución problema se di-

vidió en zonas, se vierte disolvente puro o mezcla de disolventes, y las distintas zonas van bajando, se separan y en general aumentan de número.- Ahora se siguen a continuación dos técnicas para aislar los componentes de cada banda. Se puede proceder por elución: se continúa pasando a través de la columna el eluyente y cuando ésta arrastra el color de una banda se recoge aparte, así se recojen separadamente las bandas.

Los eluyentes se diferencian de los solventes en que son en general líquidos polares (alcohol, éter, agua) que eliminan las sustancias adsorbidas. La otra técnica consiste en sacar del tubo la columna del material adsorbente sin romperla y separar mecánicamente (por corte) las bandas coloreadas. Estas bandas se eluyen separadamente.

La bibliografía más moderna sobre este tipo de cromatografía son las obras de Strain (8); Williams (9) y Lederer (10).

Otro tipo general de método es la cromatografía sobre papel o cromatografía de partición.

Aunque lleva el mismo nombre que la anterior se basa en otro principio. Se funda en los procedimientos del análisis por capilaridad y por adsorción establecidos por Goppelsroeder (11) y Freundlich (12). Estas técnicas primitivas (se usan para separar pequeñas cantidades de colorantes) fueron desarrolladas y perfeccionadas por Consden, Gordon, Martin (13) y hoy logran separar sustancias del orden de 1-50 %.

Se basa en que sobre una tira de papel de filtro, los componentes de una mezcla se desplazan a diferente velocidad a lo largo de la tira, cuando por esta se hace correr por capilaridad un disolvente dado, que es en general un solvente saturado de agua.

Es casi una regla general que si la sustancia es más

Se base en que sobre una tira de papel de filtro, los componentes de una mezcla se desplazan a diferentes velocidades a lo largo de la tira, cuando por esta se hace correr por capilaridad un disolvente dado, que es en general un solvente saturado de agua. Es casi una regla general que si la sustancia es muy soluble en el solvente (p.ejemplo: una sust. grasa y como solvente eter de petróleo), no se produce la retención y separación de la sustancia y hay que usar entonces un solvente en que la sustancia sea poco soluble (p.ej. H₂O saturada de eter de petróleo, etc.) El agua en el papel forma una fase líquida estática y el solvente una fase líquida móvil, es decir que el papel hace las veces de l soporte inerte para el agua.

La diferente velocidad de corrimiento de los componentes de la mezcla en el mismo, está condicionada, a los respectivos coeficientes de partición entre el agua y el solvente.

Esta técnica, permite ubicar las sustancias a) por métodos de revelación y b) por una constante propia (el R_f.)

a) Cuando el solvente ha recorrido una distancia fija desde el origen en que se colocó la sustancia; se revela el cromatograma fuzdesdeciéndola con la solución de un reactivo apropiado que produzca una reacción coloreada con los componentes de la mezcla cromatografiada. Si se trata de una sustancia pura aparecerá una sola mancha en el papel, pero si la sustancia era mezcla de varias otras aparecerán manchas a distintas distancias del lugar en que se depositó la gota.

b) El R_f se define como la relación entre la distancia recorrida por la mancha (desde el lugar en que fué depositada la gota) y la distancia total recorrida por el solvente (medida también desde el lugar en que se colocó la gota).

El valor del R_f es constante para una sustancia dada

en condiciones determinadas y puede decirse que a igualdad de Rf corresponde una identidad de sustancias y diferentes sustancias dan diferentes Rf.

Esta técnica de cromatografía en papel, cuando sirve, es excelente, rápida y precisa. Se realiza en general por 2 técnicas principales: descendente, el solvente avanza desde arriba hacia abajo en las tiras de papel suspendidas por su parte inferior de un recipiente con el solvente; o ascendente: el solvente sube por capilaridad desde abajo hacia arriba por el papel sumergido en su parte inferior en el solvente. Ambas técnicas se hacen en una caja herméticamente cerrada y saturada de vapores del solvente. La técnica ascendente se prefiere hoy por su mejor poder de resolución. Esta cromatografía en papel ha sido aplicada con mucho éxito a la resolución de alcaloides (14); a proteínas, glúcidos, aminoácidos, nucleótidos, etc. (15); pero esta técnica sencilla fracasa con importantes grupos de sustancias.

Grandes grupos de alcaloides (de la nicotiana, xánticos como cafeína, teobromina, etc. alcaloides del curare etc.) como así también las aminas biológicas (colina, colamina, etc.) las vitaminas (del grupo riboflavina, etc.) y los aceites esenciales no se pueden resolver por la cromatografía en papel. En lo que respecta a estas sustancias, excepto los aceites esenciales, ha sido resuelta su cromatografía por Roger Munier (16) y este enumera los métodos a utilizar en su magnífico trabajo y que son hoy universalmente usados.

En cuanto a los aceites esenciales se ha resuelto con la técnica del "chromatostrip" ideada por Kirchner Miller y Keller (17), y muy mejorada posteriormente, lo que le confirió verdadero valor.

Enumeraremos las dificultades que R. Minier enumera en su trabajo al aplicar ésta técnica a sustancias que no se adaptan a ella. Son las mismas que encontramos en este trabajo al querer aplicar la cromatografía en papel a los aceites esenciales y que detallaremos más adelante.

a) El R_f de las sust. es igual a 1. Es decir la isoterma de partición está tan desplazada hacia el solvente orgánico que la sustancia aparece en el frente del solvente. No hay separación.

b) Las manchas son alargadas en forma de cuña redondeada. Es este un inconveniente muy importante. Las manchas de las distintas sustancias en la cromatografía en papel deben ser pequeñas, redondas y de concentración uniforme (sin "colas o elongaciones"). Esto es importante al determinar el "centro de gravedad" de la mancha para determinar su R_f y además para lograr buena separación entre las manchas. Se explican las manchas alargadas admitiendo que la sustancia al detenerse logra un determinado equilibrio con las fases inmóviles y móviles. En las sustancias que consideramos su constante de disociación está entre 10^{-2} y 10^{-9} y como es una constante pequeña coexisten las formas B^+ y BH en las bases. Estas 2 formas no llegan a un equilibrio de disolución con la fase móvil y por eso dan trazos largos. Las sustancias muy disociadas $k=10^{-2}$ (bases de amonio cuaternarias) o muy poco disociadas $k=10^{-9}$ que solo presentan un tipo iónico, dan manchas muy buenas y redondas. c) El R_f de las manchas depende de la concentración de la sustancia. Inconveniente grave pues en caso de productos naturales como los nuestros nunca se sabe la concentración de las sustancias y si su R_f es mayor o menor con la mayor o menor concent. no podremos identificarlas.

R. Minier obvió estos inconvenientes creando "fases

móviles "ácidas" o "alcalinas"; es decir disolviendo en el solvente orgánico saturado de H₂O un ácido fuerte orgánico (ac. acético, etc.) o aún inorgánico (HCl 22° Bé, PO₄ H₃, etc.), o bien un álcali (NH₃ p. ej.); logrando así evitar la disociación de las sust. cromatografiadas en B⁺ y BOH (Método llamado Phase solvante acide, o bien impregnó los papeles con sales (papiers sales) inorg. como PO₄ H₂ K; o Cl⁻ K⁺] y en la fase solvente HCl) de modo de crear un sistema bufferizante que regula la ionización y da perfectos resultados. Para un estudio exhaustivo de estos nuevos métodos de cromatografía y sus inconvenientes (el fenómeno de "demixión") hay que remitirse a los trabajos originales (15); (16); (14); pues aún no hay libros sobre este tema.

Otro camino ha seguido la cromatografía de los aceites esenciales. Hubo varios ensayos de distintas formas de cromatografiar los componentes y derivados de los aceites esenciales sin abandonar el papel. El más interesante fué el de impregnar el papel con SiO₃H₂ (18), para aumentar su capilaridad (métodos de fase invertida); la teoría de esta técnica está explicada en (19). Era una transacción entre la cromatografía de adsorción y de partición. Se impregna el papel con SiO₄Na₄, se trata con HCl, se lleva a estufa. No ha dado óptimos resultados y por el contrario es trabajosa y incierta. Si el papel con SiO₃H₂ se resquebraja al manipularlo, ya no sirve.

En cambio, el retorno a la cromatografía de adsorción ha dado buenos resultados. Empezaremos más adelante los trabajos de cromat. en columna sobre componentes de aceites esenciales. La técnica ideada (17) consistía en recubrir una tira de vidrio con una sustancia adsorbente en una capa finísima. Se tenía una tira adsorbente que se cromatografiaba como una tira de papel. Se llamó "chromatogrip". Sus autores la usaron con buen éxito para diversas sustancias. Tenía el inconveniente que va-

riaba el Rf de tira en tira. Standardizando el método se llegó a asegurar una reproductibilidad en el Rf de 4 unidades. Este método fue luego mejorado por Montes y Labat (20). Finalmente; Reitzema (21) reemplazó las tiras por una placa "chromatoplate" que permite alrededor de 4 cromatografías independientes a la vez, eliminando así la variación del Rf (se logra coincidencia de Rf de 0,05 unidades). Esta técnica fue la que adaptamos y modificándola convenientemente (según se explica luego en la parte teórica), la aplicamos a la cromatog. de aceites esenciales.

Cromatografía de sustancias incoloras

Diremos ahora unas cuantas palabras en lo que respecta a cromatografía de sustancias incoloras. Esto en lo que se refiere a cromatografía de adsorción; pues en nuestro trabajo nos hemos visto obligados a tener que detectar sustancias que no se hacían visibles por ningún reactivo empleado, o por sustancias carbonílicas que aún dando 2-4- dinitrofenilhidrazones coloreadas cuando se encuentran en gran cantidad en pequeñas cantidades ("trace ketones" en los trabajos americanos) no son revelables. En cromatografía en papel las reacciones se combinan de tal forma que siempre la mancha o el fondo del papel se colorean. Sino hay que recurrir en general a un densitómetro.

En la antigua cromatografía de adsorción en columna se efectuaba de varias maneras.

1°) Se cortaba arbitrariamente la columna en varias partes después del desarrollo y se hacía la elución separadamente.

2°) Se lavaba la columna después del desarrollo con una serie de disolventes y se examinaba cada fracción por separado. Así se cromatografiaban ceras y luego se eluía con distintos solventes y se evaporaban y se deskilaba luego cada fracción por separado, se le tomaba índice de refracción etc. Fue introducido este método por Reichstein (22).

Otro método es por pretratamiento adecuado del adsorbente o lavando la columna desarrollada con 1 reactivo que reaccione con el adsorbido, dando coloración.

Martín y Synge emplearon indicadores de pH (metil orange antocianos, etc.) para colorear sus columnas de sílice embebidas de agua en la separación de aminoácidos acetilados; al pasaje de éstos últimos hay un viraje del indicador con forma-

ción de distintas zonas coloreadas.

Un método semejante usó Minier en su trabajo (16) para separar en papel ácidos orgánicos del ciclo biológico (maléico, fumárico, succínico, etc.) y revelando con azul de bromofenol.

Trattner y Roberts emplean la dimetil-amino-azo-benceno como indicador coloreado para la separación de alcaloides sobre gel de sílice. El adsorbente se colorea de rojo en los sitios donde se fijan los alcaloides.

Zechmeister revela la presencia de estilbena cis y trans en columna pincelando la columna a lo largo con permanganato de potasio al 1% después del desarrollo.

Bell cromatografía hidratos de carbono; luego aplica una solución alcohólica de α -naftol y después SO_2 H_2 concent.

Los métodos modernos se basan en la combinación de la fluorescencia con la luz U.V. y/o de sustancias fluorescentes como fondo.

El examen de la columna cromatográfica bajo la luz U.V. propuesta por Karrer y Winterstein permite localizar las zonas de sustancias incoloras. Sus primeras aplicaciones fueron: ácidos biliares (23); alcaloides (24), separación de metilglucosas (25); aislamiento de vitaminas A y D(26); dosaje de vitaminas B (27) y K(28). R.Minier la aplicó también en el papel para vitaminas como así también para lumicromo, AFDN, etc. (16) Brockmann y Volpers (29) pretrataron el adsorbente con una sustancia fluorescente. Cuando una columna con dicho material es observada bajo una iluminación monocromática de cierta longitud, las zonas de adsorción que revelan en forma de anillos no fluorescentes y oscuras sobre un fondo brillante. Usando aquellas radiaciones absorbidas por la sustancia a separar és-

te procedimiento cromatográfico puede ser extendido a muchas sustancias incoloras.

La pentahidroxi flavona "morina" ha sido empleada para colorear alúmina (300 mg. para 500g. de alúmina); la "berberina" para la sílice y el ácido difenil fluorindeno sulfónico para el carbonato de K ó Ca y OMg.- Cada uno de estos colorantes fluorescentes eran previamente adsorbidos con metanol.-Ultimamente entró en uso el empleo de gel de sílice mezclado con 25% de SZu fluorescente. Fué el empleado por Reitzema (21) en su "chromatoplate".

Montes y Clavet (30) y Montes y Labat (20) usaron rodami na 6 G (B.D.H.)

La cromatografía aplicada a los componentes de esencias

Daremos ahora una corta reseña del empleo de los distintos tipos de adsorción cromatográfica en los componentes de aceites esenciales.

En primer lugar mencionaremos los primeros ensayos sobre sustancias orgánicas biológicas. Además del trabajo original de Tswelt. Koschara (31) separó por este método colorantes urínicos.

La ventaja del método es que no perjudica las sustancias a separar. Además sirve para comprobar la pureza de una sustancia, pues si es pura y se cromatografía no debe dar más de una banda, o de una mancha.

Mencionaremos en primer lugar los trabajos de Plattner y Pfau (32) sobre cromatografía sobre alúmina de los compuestos de los azulenos con trinitrobenceno, disueltos en ciclohexano; el de Brockmann y Volpers sobre separación por cromatografía sobre alúmina de aldehídos y cetonas de aceites esenciales (33) los trabajos ya mencionados (17); sobre componentes de aceites esenciales; otro también de Miller y Kirchner (34), en "chromatostrip" donde introducen un nuevo revelante de terpenos no saturados consistente en "spray" de fluoresceína y vapores de Br_2 que se fijan en la doble ligadura. Otro trabajo de Miller y Kirchner (35) sobre desterpenación de aceites esenciales por adsorción en columna; previa detección de los terpenos en "strip". Un importante trabajo de Al. Montes (36) sobre resolución de mezclas de las 2-4 D.N hidrazonas de 12 aldehídos y cetonas de aceites esenciales, en columnas de Si O₂ H₃ y bentonita. El trabajo ya mencionado de Clavet y Montes (30) sobre separación de los 3-5 dinitrobenzoatos de alcoholes y fenoles de aceites esenciales. De Labat y Montes (20); sobre "chromatostrips" en la separación de 2-4 dinitrofenilhidrazonas de cetonas y aldehídos,

así como separación de fenóles y terpenos de aceites esenciales, Un trabajo interesante de Miller y Kirchner (37) sobre reacciones "in situ" en el "chromatostrip" sobre las sustancias a cromatografiar, algunos de los cuales hemos adoptado y adaptado en nuestro trabajo. Por último el trabajo de Reitzema ya mencionado (21) en el cual se hace el primer ensayo de identificar, directamente en cromatografía de aceites esenciales, sus componentes. En cromatografía en papel mencionaremos el trabajo de Beatriz R. Cortina y Al. Montes (38) que es una cromatografía en papel para investigar tujona en bebidas alcohólicas.

D. PARTE TEORICA

Ensayos con papel

Los primeros ensayos de cromatografiar los ac. es. los realizamos en papel. Usamos a ese fin el papel Delta No.3000 y el papel Whatmann No.1 Colocamos el aceite disuelto en éter sulfúrico con una micropipeta en el papel y lo cromatografiamos por la técnica ascendente con hexano y 15% de AcOEt o con benceno y 15% de AcOEt. Cromatografiamos también así los componentes puros, Una vez alcanzado el frente del solvente; retiráramos el papel lo dejáramos secar y lo sumergiamos en una solución de rodamina 6G(B.D. H) en metanol al 0,1 o/oo o a un pulverizado de la misma solución Seco el papel lo sometíamos a la luz U.V. pero esta o no revelaba nada o se observaban manchas difusas y trazos alargados. Para obviar el inconveniente que quizás el metanol cromatografie las manchas en el lugar al quedar unos segundos en contacto con ellas, ensayamos cromatografía ya sobre papeles pretratados con rodamina 6G Pero por ser una cromatografía de partición se cromatografía la rodamina con los distintos solventes quedando los papeles como si no hubiesen sido tratados con ella. En los papeles en los que además de un "spray" de rodamina ensayamos además un pulverizado de 2.4DNPH en HCl 2 N en la esperanza de revelar compuestos carbonílicos, no encontramos más que manchas borrosas. Pero como las únicas manchas más o menos definidas se encontraban en un $R_f=1$; ensayamos utilizar, de acuerdo a lo que mencionamos en nuestra Introducción, solventes acuosos saturados de solventes orgánicos (CHCl₃, alcohol amílico, éter de petróleo, alcohol isoprópicico). Una vez preparados estos solventes (por saturación de ampolla y ulterior decantación) los empleamos en cromatografiar las distintas manchas de los componentes de aceites esenciales. Luego sumergiamos el papel en solución de rodamina al 0,1 o/oo en agua para no usar solventes orgánicos en los cuales los aceites esenciales son solubles. Los papeles mojados los secábamos suavemente a re-

flujo de tela extendidos sobre vidrio. Luego los pulverizábamos con una soluc. de 2,4 DNPH en HCl 2 N. Ni a simple vista ni a luz U.V. se observaron manchas y las que se observaban eran de trazos largos. La desaparición de las sustancias del papel se debía sin duda al arrastre por vapor de H₂O que se producía al secar el papel impregnado de tantos solventes acuosos.

Teoría del "chromato strip"

Como la cromatografía de estos compuestos en papel ya tenía malos antecedentes, resolvimos abandonarla después de numerosos ensayos. Encaramos entonces la preparación de "chromatostrips". Como ya dijimos en la Introducción al ser preparados los primeros "strips" (17) sus autores recomendaron el uso de sílica-gel empastado con almidón (se puede usar amilopectina) y extendido sobre una angosta tira de vidrio de 22 cm. x 1,5cm. en un espesor de 0,0 2 pulgadas. También se puede pulverizar la mezcla sobre el vidrio con el pulverizador de pintura. Esta técnica fue introducida en nuestro país por Montes y Labat (20); con variantes Diluyeron el absorbente de ácido silícico con bentonita (1:4) para hacerlo menos absorbente. Por lo demás siguieron a Kirchner y Miller en su técnica. Mezclaron el ac. silícico con la bentonita (de una composición conocida). Lo tamizaron por 200 mallas (74 micrones de grano). Lo empastaron con almidón y lo extendieron sobre la tira de vidrio con un espesor de 0,5 mm. Pero el absorbente así no está listo para usar. Se seca a estufa. El tiempo de secado es importante como así también la temperatura. Hay que cuidarlo para obtener valores reproducibles de Rf. Luego, y como lo especifica Kirchner, con los "strips" aun calientes hay que activar la sílice. Labat siguiendo la receta de Kirchner, lo realiza sometiénolo al vacío de 3mm. durante 30', sobre HOK. Luego deja entrar el aire por una mezcla absorbente de humedad. Retirados del vacío, no se puede dejarlos al aire más de 10' pues sino se desactiva la sílice y varían completamente los Rf.

Al usar el "chromatoplate" Reitzema (21), usa una mezcla de ácido silícico y almidón empastados a baño-maría. Los extiende sobre una placa de 12,5cm. x 17,5cm.

Al preparar nuestra mezcla absorbente, consideramos el trabajo de Montes y Labat. La mezcla con bentonita, no repotta

ninguna ventaja. Además de introducir un absorbente más, susceptible de los variados cambios en su composición según su origen no presenta ninguna mejora en su poder de resolución. Por eso nos decidimos por la mezcla más simple; ácido silícico-almidón, para eliminar toda interferencia ajena. Pero las proporciones de ambos que establece Reitzema, no nos han dado una mezcla lo bastante uniforme y manipulable al extenderla sobre el vidrio. Quizás el almidón que él usó en EE.UU es diferente al de aquí. Por lo tanto hemos establecido las cantidades que detallamos en la parte experimental. La sílice debe ser tamizada por 200 mallas. Sino además de no tener grano uniforme, la superficie de la sílice al secarse es áspera y rugosa. El almidón debe estar bien molido. Evita los grumos. El calentamiento es un poco más prolongado que el establecido por Reitzema porque se activa mejor luego. Esta parte, la activación, es la verdadera parte importante en la preparación de la placa absorbente. Cuando mejor se activa la sílica al vacío, mayor es el poder resolutorio de la placa. Según hemos establecido en nuestros ensayos a mayor activación de la sílice sucede; a) Disminuye el Rf de las manchas. Como la sílice absorbe más; las sustancias no alcanzan en general $Rf = 1$ que es el verdadero inconveniente en la cromat. de aceites esenciales (especialmente los terpenos) con solventes orgánicos. b) Aparecen más manchas y separadas por mayores distancias. Cuando más absorbe la sílice, sustancias que en general van pegadas se separan bien.

Reitzema somete las placas a un vacío de 2-3mm. durante 30' sobre 40 K; pero hemos encontrado que los mejores resultados se obtienen sometiendo las placas calientes aún, a 0,5-1 mm. de cada vacío durante 60'.

Teoría y aplicación de los ensayos utilizados

Es sabido que los ácidos y cetonas son los "compuestos llaves" en los aceites esenciales. Por eso se trabajó tanto en su cromatografía. En general se prepararon los dinitrofenilhidrazonas y se cromatografiaron. Son muy coloreadas y la coloración se profundiza con la no saturación. Las primeras hidrazonas se prepararon de los cetoácidos y se cromatografiaron (39); disolviendo 25 gammas /0,1 ml en 0,01 M buffer fosfato (pH7,2), con butanol, butanol con sol 3/6 N H3, etc.

Pero el verdadero peligro de cromatografiar DNPHidrazonas lo señala R.Mumier (16) en su trabajo, donde demuestra que la DNPH de 1 compuesto puro da 2 manchas. Cita ahí varios ejemplos; el ácido pirúvico p.ej. su DNPHona da al cromatografiarse en papel 2 manchas siendo imposible de distinguir la verdadera.

En columna Montes (36) ha cromatografiado mezclas de DNPH de compuestos carbonílicos en mezclas binarias pero es muy trabajoso y no de gran poder de resolución amén de usar grandes cantidades de sustancia.

Un ejemplo:usa 0,04 gs. (40.000 γ) de la DNPH de la fracción carbonílica del ac.es. de peperina disuelta en 1 parte benceno /2 ligroina/ 4% de eter etílico. En un desarrollo que dura 6 horas no se logra separar más que 2 compuestos carbonílicos.

Labat, por su parte, impregnó las tiras absorbentes con una ancha banda basal de los derivados de DNPH de fracciones carbonílicas de aceites esenciales y las cromatografió. Además de usar gran cantidad de sustancia, que no siempre es accesible, se obtienen al desarrollar bandas anchas superpuestas que no permiten gran sensibilidad. Así p.ej. en la fracción carbonílica de A.Alba no logra en su desarrollo separar más que 2 compuestos carbonílicos. Por supuestos que a las

bandas no se les puede asignar ningún Rf.

En nuestro trabajo hemos decidido formar los derivados coloreados ya una vez realizada la cromatografía. Se cromatografía 25% del aceite esencial, o de una mezcla de sus componentes revelables por DNPH en la forma en que detallamos en la parte experimental. Una vez evaporado el solvente de la placa se le aplica un pulverizado a la placa de DNPH en HCl 2N. Eso evita la cromatografía de hidrazonas mezcladas que no podemos saber su forma de comportarse frente al solvente. En el lugar donde hay compuestos carbonílicos aparecen manchas pequeñas y redondas de distintas tonalidades del amarillo claro (p. ej.: fencoma) al rojo intenso (P. ej. piperonal). Cada compuesto tiene así su Rf determinado. En una misma placa las 4 cromatografías dan Rf idénticos para iguales sustancias. Se puede identificar numerosos compuestos para un solo aceite. Sustancias como fencoma o pulegona que no dan DNPHona por la técnica preparatoria común (40) en solución; dan buenas manchas en la placa.

Se procede luego a calentar la placa a 110°C y 15 mm. con lo que sucede lo siguiente:

- a) Las manchas de DNPH se oscurecen en su mayoría, adoptando bordes más netos, (más propicio para determinar Rf). Algunos permanecen invariables.
- b) Aparecen manchas coloreadas nuevas. Son debidas a:
 - 1°) A hidrazonas de compuestos en pequeñas cantidades o que no se forman en frío. Son en general amarillas.
 - 2°) A los terpenos que reaccionan al estar en medio ácido y sometidos al calor. (Heat sensitive y Acid-sensitive) Son colores en general marrones, violetas, verdes, etc.
 - 3°) A alcoholes terpénicos sensibles al calor (p. ej. linalol)

Son manchas marrón violáceas.

c) Muchas sustancias que sin calentamiento no se detectan después de calentadas, se detectan a la luz U.V.

d) Por último algunas manchas de la DNPH desaparecen por el calor. P.ej: La mentona, que da amarillo en frío con DNPH desaparece al calentar.

Se procede luego a una 3a. inspección a la luz U.V. que revela manchas no visibles. Para ello la sílice y el almidón fueron pretratados con rodamina 6 G (B.D.H) Para algunas sustancias es el único medio de detectarlas (p.ej: salicilato de metilo, alcohol fenil etílico)

Estos 3 ensayos ya proporcionan una idea clara sobre la composición del aceite esencial, en una sola placa.

El 2o. método que aplicamos al aceite esencial en otra placa es la oxidación de sus compuestos oxidables.

Se base en el trabajo de Kirchner y Miller (37) ya citado de reacciones en el chromatostrip sobre algunos componentes de aceites esenciales.

El método se base en que la cromatografía ofrece un método simple de separar los productos de una reacción. El compuesto puro se adsorbe en el "strip", se cubre con el reactivo y se cromatografía con el solvente adecuado. El alto poder de resolución y la rapidez con que los cromatogramas individuales se realizan hacen del "chromatostrip" un método ideal para este tipo de reacciones. Además, el carácter inerte de la placa la hacen ideal para el uso de reactivos fuertes y corrosivos, de modo que todo el producto de la reacción pueda ser cromatografiado sin peligro para el cromatograma. En la mayor parte las reacciones que ocurren no se completan de modo que están presentes el compuesto o compuestos originales, los productos formados

y el reactivo. Pero los compuestos inorgánicos tales como el agua, bases, sales y ácidos no son movidos por los solventes usados y permanecen en su origen. La mayor parte de los compuestos orgánicos simples formados en la reacción (en nuestro caso la oxidación con CrO_3) como ser ácido acético glicol, etc. se absorbe fuerte por el ácido silícico y tienen valores de R_f bajos que no interfieren en la detección. En el caso de la oxidación del citral a ácido geránico por ej: con CrO_3 en que se forma un compuesto muy oxigenado, el R_f del producto es bajo y está oscurecido por el ácido acético usado en el reactivo. Se considera "reacción negativa".

La reacción que usamos es la oxidación con CrO_3 disuelto en ácido acético. Proporciona una información valiosísima sobre la estructura de los componentes del aceite esencial.

En sus ensayos Miller y Kirchner identificaron por oxidación carveol como carvona, linalol y geraniol como citral, metil heptenol como metil heptenona, nerol como citral. En compuestos puros hemos identificado por este método mentol y alcohol bencílico no revelables por los métodos comunes. En los aceites esenciales la oxidación da compuestos carbonílicos de los alcoholes alifáticos o terpénicos y de las roturas de las dobles ligaduras.

Una vez cromatografiados los productos de reacción se revelan con la DNPH con los tres ensayos ya mencionados. Se revelan así numerosas sustancias tal como lo indican las tablas. Un tercer método empleado es el del sudan 3 introducido por nosotros. Este reactivo que ya es conocido por su empleo al teñir las grasas en el metabolismo de estas y que se emplea para su estudio, así como también en el revelado del lipoproteínas en la electroforesis, nos ha parecido que debía ser de utilidad en la cromatografía de aceites esenciales, y efectivamente es un muy

buen reactivo para la detección de aceites esenciales. Asimismo lo hemos ensayado sobre los componentes puros con buenos resultados tal como se detalla en la tabla correspondiente. El reactivo en solución alcohólica es rojo. La placa se sumerge en esa solución. Pero antes hay que tener la precaución de humedecer bien la placa con un pulverizado de agua, porque si no la placa absorbe el colorante y queda todo teñido de rojo uniformemente. Después de mojarla se sumerge en la solución alcohólica de Sudan 3, se deja escurrir y se deja secar el alcohol al aire. Las manchas adquieren su máximo de intensidad al secarse el alcohol pero se atenuan mucho después de unas horas. Los terpenos que son los de Rf elevados (Rf. aprox. 0,90) se tiñen enseguida de anaranjados. Los demás compuestos se tiñen en general de rojo intenso, la placa queda como un fondo rosado. Hay sustancias que no toman el colorante. Pero entonces se ven como manchas blancas (el color de la sílice) sobre fondo rosado). Es interesante hacer notar que al pulverizar la sílice con agua y mojarla, antes de aplicar el Sudan 3 y se observa por transparencia la placa se ven las manchas de los aceites esenciales.

Estos métodos nos han permitido realizar la cromatografía de los aceites esenciales y revelar los numerosos compuestos que los forman. Por cierto que la cromatografía de aceites esenciales, está lejos de establecer la identidad de los componentes de los aceites esenciales, pero es el método más rápido y preciso para indicar el número de componentes de un aceite esencial, y da una idea cierta del tipo y estructura química general de sus componentes. Es, sin duda, la operación previa a todo análisis de aceites esenciales desconocidos.

Propiedades de los aceites esenciales y sus componentes

A continuación damos las tablas de las principales características de los aceites esenciales empleados en nuestro trabajo. Hemos ensayado nuestros métodos sobre cuarenta aceites esenciales de los más comunes. En muchos de ellos ya se han realizado trabajos de identificación de componentes por los métodos clásicos. En las tablas consignamos entonces el nombre científico de las esencias, la denominación común, cuando la poseen, el origen de la planta y los principales componentes identificados y ya conocidos.

Además en otra tabla detallamos los componentes puros que hemos utilizado para calibrar el método. De estos damos la serie a que pertenecen (bencénica, terpénica, etc.) y su función química determinante. En general son compuestos carbonílicos en su mayoría, pues este tipo de compuestos es el que más hemos tratado de identificar en las esencias.

Componentes	Serie	Grupo funcional determinante
Piperonal	Bencénica	Carbonílico
Cinamaldehído	Bencénica	Carbonílico
Ionona	Terpénica	Carbonílico
Benzofenona	Bencénica	Carbonílico
Salicilaldehído	Bencénico	Carbonílico
α amilcinamaldehído	Bencénico	Carbonílico
Benzaldehído	Bencénico	Carbonílico
Tricetona	Terpénica	Carbonílico
Alc. feniletílico	Bencénica	Alcohólico-alifático
Citral	Terpénica	Carbonílico
Vainillina	Bencénico	Carbonílico
Pulegona	Terpénica	Carbonílico
Acetofenona	Bencénica	Carbonílico
Safrol	Bencénica	Carbonílico
Salicilato de metilo	Bencénica	Ester
Carrona	Terpénica	Carbonílico
Mentol	Terpénica	Alcohólico-alifático
Alc. benzílico	Bencénica	Alcohólico-alifático

Nombre Científico (Familia - especie - var.)	Nombre vulgar	Origen	Componentes identificados
<i>Anthrangélica officinalis</i>	Angélica	Nacional	β -felandreno, ac. metil etil acético, ac. hidroximirístico, felandreno, osthol, angelicina, ac. valérico, lactonal del ac. hidrozipentadecílico y el ac.
<i>Spium graveolens</i>	Spio	-	Guaiacol, ac. sedanólico, d-limoneno, d-salineno, anh. sedanónico y sedanolida
<i>Mentha arvensis</i>	Menta japonesa	Japón	L-mentol, neomentol, aceturona mentenona, pulegona, hexenol
<i>Lavandula officinalis</i>	Lavanda	Mediterráneo	α pineno, linalol, cineol, etilamylcetona, d-borneol, geraniol, cumarina, acs. acético, butírico, valérico y caproico
<i>Artemisia Alba</i>	Esopo	Europa Asia	Eufona - alc. terpinico - felandreno - α pineno - acs. acético e isovalérico
<i>Lippia citriodora</i>	Cedron	España	Citral, verbena, metilacetona, d- citronelol, geraniol, l-limoneno
<i>Salvia sclarea</i>	Salvia moscatel	Mediterráneo	Linalol, ac. acético, acetoneo?, alc. sólido.
<i>Citrus Bigaradia</i>	Petitgrain	India	β pineno, dipenteno, l-linalol, d-terpinol, nerol, farneol, furfural

Nombre Científico (Familia - especie - var.)	Nombre vulgar	Origen	Componentes identificados
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Mediterráneo	α -pineno, camfeno, borneol, alcanfor, dipenteno
<i>Laurus nobilis</i>	Laurel	Europa	Linalol, l-pineno, felandreno, geraniol, eugenol, linalol, y ésteres
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriandro	Europa	D. linalol, l-pineno, i-pineno, β -pineno, p-cimeno, dipenteno, felandreno, geraniol, borneol, decanal, terpineno
<i>Oreganum majorana</i>	Hojerana	África	Borneol, α -terpineol, terpinenol, terpineno
<i>Eucalyptus citriodora</i>	-	Australia	Citronelal, citronelol, geraniol y pineno
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Mediterráneo	Timol, carvacrol, cimeno, dipenteno, geraniol, acetico
<i>Eucalyptus globulus</i>	-	Nueva Gales del Sur	Linalol - pineno - pinocarveol - aromadendrol
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	África	Timol, carvacrol, p-cimeno, menteno, linalol, al. camilico, hexenol, camfeno, borneol, geraniol

Nombre Científico (Familia - especie - var.)	Nombre vulgar	Origen	Componentes identificados
<i>Coccolophyllum caulis</i>	-	Nacional	-
<i>Juniperus communis</i>	Enebro	Europa Asia América	Pineno - cadineno - carfeno - terpinenol -
<i>Heterothalamus spartioides</i>	Pichana	Nacional	Dipenteno Acetato de mentilo
<i>Canelle alba</i>	Canela	Indias Occident.	Eugenol - cineol - pine- no - cariofileno
<i>Bystropogon mollis</i>	Peperina	Nacional	Mentona - pulegona - iso- mentona - mentol - 2 ac. básicos
<i>Vetiveria zizanioides</i>	Vetiver	India Ceilán	Vetiverol - vetiverona - ac. vetivérico - vetiveno
<i>Citrus decumana</i>	Pomelo	Nacional	D-lineno, d-limoneno (90%) - linalol, citral, geraniol, citro- nolal, ésteres de linalol y gera- niol.
Esencia de Luzera	-	Nacional	-

Nombre Científico (Familia-especie-var.)	Nombre vulgar	Origen	Componentes identificados
<i>Anthemis nobilis</i> L.	Manganilla	Europa	Isobutirato de etilo, isobutil angelato, amilangelato, anthemol, hexano, butanol, anthemeno, azuleno etc.
<i>Senecio Eriophyton</i>	-	Nacional	-
<i>Bulnesia Sarmienti Lorentz</i>	Palo santo o guaiaco	Ind América	Euciol, trim. sesquiterp. perust. Bulnesol
<i>Eugenia caryophyllata</i> Blum. (Caryophyllaceae) (Euc. aromaticus L.)	Clavo de olor	Indias Occidentales	Eugenol, hulfural benzoato de metilo, anilicetona, metil heptil cetona, vainillina, metilamulicarbunol, alc. furfurilico, salicilato de metilo, α y β cariofileno
Esencia de patagona (S. Huapi)	-	Nacional	-
<i>Quinum kilimascharicum</i> (parte desalcauf.)	Camphor basel	Congo	Alcanfor (aprox. 30%) Eugenol
<i>Cinnamomum Cassia</i> Blume	Canela de China	China	Aldehido cinámico, benzico y o-cumarico, acet. de cinamulo, aldeh. salicilico, cumarina, ac. cinámico, benzico y salicilico
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce	India	D-limoneno, aldeh. nonilico, d-terpineol, d-linalol, aldeh. decilico y citral, ac. butirico, octano, y antranilato de metilo

Nombre Científico (Familia - especie - var.)	Nombre vulgar	Origen	Componentes identificados
Cuminum Cyminum	Comino	Egipto	Aldeh. cumínico, cumeno - hidrocumínico, beta-pineno, dipenteno, felandreno
Artemisia Draunculus	-	Europa Asia	Metilchavicol, mirceno, aldeh. p. metoxicanámico estragol
Pinus sylvestris	Pinochas	Europa Asia América	β -pineno, l-felandreno, acet. de bornilol, careno, cadi- neno
Lavandula spika	Lavanda silvestre	-	linalol - alcanfor - bornol - linalol - careno ác. fórmico y acético
Cymbopogon flexuosus	Lemongrass	India Kalaia	Bital (70%), metilheptenona, citronelal, citroneno, geraniol, limoneno, dipenteno, mir- ceno, linalol
Carum petroselinum	Perejil	Nacional	linalol - pineno - mir- ceno - petrosileno
Mentha pulegium	Poleo europeo	Europa	Pulegona - limoneno - mentol - α o β isopulegona
Mentha piperita	Menta piperita	Europa América	α -mentol, l-mentona, ald. isovalérico, alc. amílico, ac. acético, cineol, pineno, felan- dreno, limoneno, cadineno

C. PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de la placa adsorbente

- a) La placa es de vidrio de 3mm. de espesor aproximadamente. El tamaño es de 20 cms. x 11 cms. Cada placa que se va a usar debe ser antes contrastada en su largo y en su ancho con un palmer para asegurar espesor uniforme. No todos los vidrios presentan igual espesor en el centro y en los bordes. Deben ser desechados. El espesor debe ser uniforme para que también lo sea luego el de la capa adsorbente. Variaciones de 0,1mm. en el espesor de la placa en distintos puntos de sus superficie ya la inutilizan para este uso.
- b) La mezcla adsorbente se prepara así: 30 gr. de ácido silícico (se usó marca Inthem), se muelen y se tamizan por tamiz de 200 mallas. Eso da granos uniformes de 74 micrones como tamaño máximo. Luego se muelen a polvo fino 3 grs. de almidón y se mezcla con el ácido silícico. Se mezcla a contacto íntimo de ambos cuerpos. Ahora se pueden preparar placas para usar con luz ultravioleta o no. En el primer caso se le agregan a la mezcla ácido silícico almidón, 15 ml. de solución de rodamina 6 G al 0,1 p/oo en agua y luego 39 ml de agua. Si no se piensa emplear luz ultravioleta en la placa se agregan directamente a la mezcla adsorbente 54 ml. de agua.
- c) Una vez preparada la suspensión de la mezcla, se empasta. Para ello se lleva a baño maría a 85°C agitando continuamente. En corto tiempo (aprox.2') la mezcla se espesa y ofrece una consistencia gelatinosa desapareciendo los granos duros del ácido silícico del fondo del recipiente. Si se usó rodamina 6G la masa presenta un color rosado. Siempre agitando se retira del baño y se deja enfriar. Al enfriarse la masa se espesa aún más. Se le agregan agitando 10ml. de agua y se homogeniza bien la masa.
- d) Se extiende la masa sobre el vidrio. La placa limpia y seca, se coloca entre dos bandas de vidrio elevadas 0,5mm. sobre el nivel

de la placa. La mezcla adsorbente se extiende sobre la placa con una espátula o con un pincel. Usando las bandas de vidrio como soporte se pasa entonces una regla metálica bien lisa. La placa queda recubierta con una capa de 0,5mm. de mezcla adsorbente. Es necesario no demorar mucho en toda esta operación, pues la mezcla al extenderse sobre el vidrio con lentitud se espesa irregularmente en distintos lugares. Otra precaución es, antes de extender la mezcla, verterla a otro vaso de precipitados limpio. Eso se debe a que en el vaso en que se realiza el espaste quedan a veces pequeños grumos endurecidos adheridos a las paredes en la parte superior del vaso, y a veces se arrastran con la mezcla sobre la placa, inutilizándola.

Tomando en cuenta estos pequeños detalles se obtiene una capa perfectamente uniforme y de espesor constante. Con la cantidad indicada de mezcla se obtienen seis placas.

e) La placa se lleva a estufa. Esta debe estar a 110°C al introducir la placa y esta temperatura debe mantenerse constante. Se deja exactamente 30'. Se retira y en la superficie se puede escribir cualquier indicación con lápiz como si fuese papel. Si tiene rodamina es de un color rosado, tenue y si no la posee es de una blancura impecable.

f) Aun caliente se somete al vacío de 0,5 a 1mm. de mercurio, sobre HOK durante una hora. Después de este tiempo, se rompe el vacío con aire seco (se pasa por una mezcla absorbente de humedad) y sin pérdida de tiempo se procede a depositar las sustancias. No debe transcurrir más de 10' entre que se saca el vacío y que se coloca la placa en la cuba a cromatografiar.

Preparación de los cromatogramas

Cada placa tiene capacidad para cuatro cromatografías independientes separadas por 2 cms.c/una, a unos dos centímetros del borde inferior de la placa, se depositan 40 a 50 gammas de la sustancia a cromatografiar, se deja evaporar el solvente y se lleva a la cuba de cromatografía saturada con los vapores del solvente. Se introduce la placa en el solvente, se manipula como si fuese una cromatografía en papel y se deja ascende éste. Cuando el frente del solvente ha recorrido 15 cms. se retira la placa y se deja secar al aire. El desarrollo tarda 90'. En el trabajo se ha seguido el mismo método que se detalla a continuación, para los componentes puros de esencia, para las mezclas de éstas y para las esencias mismas.

Para disolver las sustancias se usó éter etílico. Se aplica la disolución a la placa con una micropipeta.

Como solvente en la cromatografía se usó hexano normal, fracción de éter de petróleo que hierve entre los 60 a 70°C con 15% de acetato de etilo. Esta mezcla nos ha dado los mejores resultados en la resolución.

Revelado: La placa ya cromatografiada se somete a una pulverización de solución clorhídrica de 2,4 dinitrofenilhidrazina. Esta se prepara saturando una solución de HCl 2 N con la DNPH y filtrando. El filtrado es amarillo por lo tanto el pulverizado debe ser suave para no interferir con el color de las hidrazonas formadas. Luego de un ligero pulverizado ya aparecen nítidas manchas. Se les determina el Rf.

Se lleva luego la placa a estufa a 105°C y 10'. No debe aumentarse ni el tiempo de calentamiento ni la temperatura porque el ácido clorhídrico oscurece toda la placa y se pierde la cromatografía. Se hacen las nuevas lecturas.

Se lleva la placa calentada a la luz ultravioleta (300 a 400 m μ) y por la rodamina se observa una fluorescencia anaranjada en toda la placa y en los lugares donde hay sustancias activas a la luz U.V. se ven manchas violáceas. Se anotan los nuevos resultados.

El revelado con Sudan 3 se hace en otra placa. Se satura una solución de etanol con Sudan 3, se filtra o decanta la solución límpida de color rojo. Se vuelca en una cubeta y se sumerge ahí la placa previamente humedecida por un pulverizado de agua. Se retira la placa y se deja secar al aire, haciéndose luego las lecturas. En otra placa se hace el ensayo de oxidación en las esencias. Para eso se recubre la sustancia antes de cromatografiar con una gota de ácido acético saturada con CrO₃H. Esa placa no lleva rodamina en su composición. Después de la investigación con DNPH por el calor se hace un pulverizado con una solución al 0,10/00 de rodamina 6G en agua y se lleva a la luz U.V. Se completan así también los tres ensayos con la solución clorhídrica de DNPH en la placa de oxidación.

RESULTADOS

I.- Componentes puros de esencia

Se detalla la tabla a continuación, los resultados obtenidos en establecer los Rf e identificar algunos de los componentes más comunes en las esencias. Los Rf son perfectamente constantes en la misma placa, obteniéndose el mismo Rf ($\pm 0,05$ unidades), en las cuatro cromatografías gemelas de la sustancia en la placa. Eso indica que las placas son perfectamente uniformes en su espesor. En la tabla los números correspondientes a los métodos son:

- 1- DNPH en frío.
- 2- DNPH en caliente.
- 3- DNPH - calor - U.V.
- 4- Sudan 3.

Se indica sólo el método que da la mancha más nítida para establecer el Rf. Es preferible usar la mancha más oscura (en general después de calentar) por ser de bordes más nítidos. En las esencias se detallan los colores de todos los métodos. En dos sustancias, mentol y alcohol bencílico, se ha realizado previamente el ensayo de oxidación para poder revelarlos.

Componentes	R _f x 100	Métodos			
		1	2	3	4
Piperonal	97	rojo	-	-	no da
Cinamaldehido	80	anaranj.	-	-	rojo
Tonona	86	-	marrón	-	anaranjado
Benzofenona	77	-	anaranj.	-	rojo
Salicilaldehido	47	-	marrón	-	no da
α-amilnamaldek.	10	-	marrón	-	rojo
Benzaldehido	17	-	anaranj.	-	no da
Fenona	17	-	anaranj.	-	no da
Alc. feniletílico	11	-	-	x	no da
Citral	97	-	marrón	-	anaranjado
Vainillina	0	-	marrón	-	no da
Pulegona	96	-	marrón	-	anaranjado
Acetofenona	21	-	marrón	-	rojo
Safrol	38	-	anaranj.	-	anaranjado
Salicilato de metilo	81	-	-	x	no da
Carvona	67	-	rojo	-	anaranjado
Menilol + CrO ₃	62	amarillo	-	-	rojo
Alc. benzílico + CrO ₃	20	anaranj.	-	-	rojo

II.- Resolución de mezclas

En la tabla siguiente damos cuenta de las mezclas de componentes puros resueltos con nuestro método. Los Rf de las sustancias en las mezclas son los de esas sustancias al estado puro con variación de $\frac{1}{4}$ unidades en general en el Rf. La proporción de las sustancias en las mezclas es por partes iguales.

Los métodos empleados en la resolución son:

- 1- DNPH en frío.
- 2- DNPH en caliente.
- 3- DNPH calor U.V.

Clase de las mezclas	Mezclas	Métodos de resolución
Ternarias	Piperonal - salicilaldehído - acetofenona	1-2-3
	Tonona - citral - benzaldehído	1-2-3
	Cinamaldehído - carona - benzaldehído	1-2-3
	Citral - safrol - fenona	1-2-3
	Pulegona - acetofenona - vainillina	1-2-3
	Tonona - salicilaldehído - α amilcinamald.	1-2-3
	Piperonal - benzofenona - al. fenilético	1-2-3
	Pulegona - carona - fenona	1-2-3
Cuaternarias	Citral - cinamaldehído - salicilaldehído - benzaldehído	1-2-3
	Piperonal - benzofenona - acetofenona - safrol	1-2-3

III.-Resolución de aceites esenciales

Las tablas a continuación dan los resultados de la cromatografía de los aceites esenciales. En cada ensayo está detallado el Rf de cada mancha, su color y su intensidad. Estos tres datos ya dan una idea bastante importante sobre la característica de la mancha. El ensayo de DNPH se detalla como antes en frío, caliente y a la luz U.V. Lo mismo el ensayo de oxidación. El mayor o menor número de sustancias aparecidas en la oxidación da idea del número de compuestos alcohólicos existentes en la esencia o de su no saturación. Debe recordarse, como ya se dijo en la parte teórica, que algunas manchas en el ensayo de oxidación son idénticas en algunas en el DNPH directo, pues son compuestos carbonílicos que se oxidaron parcialmente.

En las tablas se da también el número de compuestos revelados con los ensayos de DNPH y Sudan 3. Las abreviaturas son:

- a- amarillo (o; de una a tres cruces según la intensidad del color)
- n- anaranjado (de una a tres cruces)
- m- marrón (de una a tres cruces)
- v- verde (de una a dos cruces)
- vi- violeta (de una a dos cruces)
- rø rojo (de una a dos cruces)
- bl- blanco

Los Rf están tomados al Rf x100. Ejemplo:0,20 es 20.El cuadro indicado g- es el color de la mancha.

En el ensayo con Sudan 3 se toma como blanco cuando queda coloreada de rosado la placa y no toma color la mancha, quedando el blanco de la sílice.

Esencias	D NPH (directo)					Oxidación					Sudán		Comp. revelados con D NPH	Comp. revelados con Sudán
	frio		Ø		U.V.	frio		Ø		U.V.				
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C	Rf	C			
<i>aculeptus</i>	13	at+	8	v+	8	15	at	10	at	15	16	fl	siete	cinco
<i>Butriodora</i> (Chisones)	20	at+	98	at	20	34	ao	15	mt+	57	23	fl		
	60	at			47	57	at	46	ao	98	75	mt+		
	87	at			98	90	at	57	at		86	mt+		
								98	mt+		98	mt+		
<i>osmarinum</i>	8	at	8	mt+	98	10	at	16	at	84	30	rt	cinco	tres
<i>fficialis</i> (Rio Negro)	24	at	33	ao		25	at	25	mt	98	39	rt+		
	33	ao				67	ao	67	mt+		98	mt+		
	65	at						84	at+					
	98	fl+												
<i>Rowandro</i> (Mendoza)	4	at	57	mt	98	27	at	49	mt	49	21	rt	seis	cuatro
	24	at	84	mt		49	at	55	at	64	36	rt		
	36	at+				64	at	64	mt	98	84	mt+		
	98	at				98	at	87	ao		98	mt+		
								98	mt					
<i>Bejorana</i> (Bastelar)	13	at+	13	mt	13	15	at	11	mt	45	18	rt	cinco	cuatro
	24	at+	30	mt	30	34	ao	15	mt	95	30	fl		
	47	at				45	ao	45	mt		76	mt		
	95	at				95	at	78	at		98	mt+		
								95	mt					

Esencias	DNPH (directo)					Oxidación					Sudán		Comp. revelados con DNPH	Comp. revelados con Sudán
	frio		Ø		U.V.	frio		Ø		U.V.	Rt	e		
	Rt	e	Rt	e	Rt	Rt	e	Rt	e	Rt	e			
3ocú	21	a+	10	m+	30	24	a+	15	m+	33	13	ll	ocho	tres
llophyllus-	30	a+	23	m+	87	33	a+	33	m+	45	75	r+		
aulis	51	a+	46	m+		45	a+	45	m+	90	90	m++		
	95	a++	95	m+++		96	r+	64	m++					
								96	m+					
Esencia de	14	a+	9	m++	37	11	a+	3	m+	3	11	ll	siete	cinco
nebro de S.	28	a+	18	m+		45	a++	45	r+	45	21	r+		
Buapi	37	a+	37	r+		87	a+	64	a+	87	40	r+		
	98	a+	84	m+		97	a+	87	m+	97	77	ll		
			98	m++				97	m+		98	m++		
Heterothalamus	5	a++	12	m+	12	53	a+	12	m+	64	16	ll	ocho	cuatro
Bartoides	12	a++	20	m+	20	64	a++	64	m+	97	24	r+		
Pichana (Pseudo)	40	a++	40	a+	40	75	a+	75	m+		78	m++		
	50	a+	79	m+	79	83	a+	97	m++		97	m++		
	79	a++	95	m++	95	97	r+							
	86	m+++												
Esencia de	6	a+	6	m+	20	9	a+	9	a+	25	9	ll	seis	cuatro
Barcelo (dymus	17	a+	17	m+		25	a+	25	m+	34	20	ll		
interi) Nahuel	28	a+	82	m+		46	a+	82	r++	97	31	r+		
Buapi	82	a++	96	m+		82	a+	97	r+		82	r++		
						97	a+							

Presencias	DNPH (directo)					Oxidación					Sudán			Comp. revelados con DNPH	Comp. revelados con Sudán
	frío		θ		Li	frío		θ		Li					
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C			
bernia (Córada)	5	a+	15	m+	98	8	a+	8	m+	65	17	ll	siete	cuatro	
	15	a+	40	m+		24	a+	24	m+	83	22	r+			
	20	a+	90	m+		46	m+	46	m+	98	43	u+			
	80	a0				83	a+	65	m+		84	u++			
	90	a++				98	a+	83	m+						
	98	a++						98	r+						
tercia zarioides (Spinones)	20	u+	0	m++	32	23	a+	12	m+	23	23	ll	siete	cinco	
	60	u+	32	m++	60	54	a-	23	m+	65	63	r+			
	89	u+	00	m++	98	65	a-	65	rl+	90	53	r+			
	98	u++	70	rl+		72	a+	84	m+		90	u++			
			89	m++		90	a+	90	m+		98	u++			
			98	m++											
melo Quisones	0	a+	15	m+	32	15	a+	10	m+	62	10	r+	siete	cuatro	
	48	a0	48	r+	55	62	a+	23	m+	98	49	ll			
	55	a+	55	a+		76	a-	47	m+		73	r++			
	71	a-	98	a++		98	a+	98	m+		98	m++			
	98	a++													
ucaleptus lobulus	24	a+	20	m+	98	22	a+	13	a-	98	22	m+			
	34	a+	34	m+		45	a+	34	a+		36	r+			
	45	a+	98	m+		98	a+	45	m+		47	r+			
	60	a+						98	m++		65	r+			

Esencias	DNPH (directo)					Oxidacion				
	frío		θ		UV	frío		θ		UV
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C	Rf
Esencia de manzanilla (Castelar, Bs. As.)	12	a+	12	a+	12	18	a+	10	u+	30
	33	a+			78	30	a+	18	m+	98
	67	a0				98	a+	30	m+	
								74	m+	
								98	m+	
Senecio	10	u+	10	m+	21	15	a+	15	m+	33
Eriophyton	27	a+	33	m+	73	33	a+	33	u+	97
	33	u+	73	m++		97	a+	45	m+	
	73	u+						97	u+	
Palosanto	7	u+	42	m++	20	10	a+	8	m+	10
⊕ guayaco	50	u+	60	m++	76	53	a+	10	m+	87
	76	u+	76	m++	98	87	u+	53	m++	96
								87	m++	
								96	u+	
Eugenia	12	a+	12	m+	87	15	a+	11	u+	38
Umbelora	95	a+	87	m+		90	a+	21	a++	97
(naa-gapiú)						97	a+	38	a+	
								90	m+	
								97	m+	

Esencias	DNPH (dueto)					Oxidacion					Sudán		Comp. revelados con DNPH	Comp. revelados con Sudán
	frío		θ		UV	frío		θ		UV	Rf	C		
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C	Rf				
Esencia de anzanilla (basilar, Bs As)	12	a+	12	a+	12	18	a+	10	u-	30	30	bl	cuatro	Tres
	33	a+			78	30	a+	18	m+	98	65	r		
	67	a0				38	a+	30	m-		98	u+		
								74	m+					
								98	m+					
Poncio	10	u+	10	m+	21	15	a+	15	m+	33	13	bl	cinco	Tres
Eriophyton	27	a+	33	m+	73	33	a+	33	m+	97	76	m+		
	33	u+	73	m++		97	a+	45	m+		98	m+		
	73	a+						97	m+					
Palosanto	7	u+	42	m++	20	10	a+	8	m+	10	8	bl	siete	cuatro
quayaco	50	u+	60	m++	76	53	a+	10	m+	87	13	r		
	76	u+	76	m++	98	87	u-	53	m++	96	43	u+		
								87	m++		98	u+		
								96	m+					
Eugenia	12	a+	12	m+	87	15	a+	11	u-	38	10	bl	Tres	cuatro
Amplora	95	a+	87	m+		90	a+	21	a++	97	85	r		
(naa-gapiú)						97	a+	38	a+		53	m+		
								90	m+		98	u++		
								97	m+					

Esencias	DNPH (directo)					Oxidación				
	frío		θ		U.V.	frío		θ		U.V.
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C	Rf
Esencia sataquá (Nahuel Cuapi)	20	a+	3	m++	80	13	a+	13	m+	10
	46	a+	10	m+	98	23	a++	23	m++	23
	58	a+	58	m+		54	a+	36	m+	86
	80	a+	80	m+				54	m+	
								86	m+	
Quinum	20	a+	20	m+	-	23	a+	0	m+	14
Helmascharicum (paracalm desalcan?)	64	a+	98	m++		67	a++	14	m+	23
	90	a++				84	m+	23	m+	52
Salta	98	a+				98	a+	67	m+	84
								84	m++	
Esencia Cane la de China	12	a+	35	m+	50	21	a+	7	m+	21
	35	m+	70	m+++	64	64	a+	21	m+	7:
	54	a+	83	m++		88	a+	64	m++	86
	70	m+++				95	a+	73	m++	9:
	83	m++						88	m+	
								95	m+	
Comillo (Mendoza)	21	a+	20	m+	-	45	a+	45	m+	2
	46	a+	71	a+		66	m+	98	a+	4
	71	a0				98	a++			

Esencias	D N P H (directo)					Oxidación					Sudán		Comp. revelados con D N P H	Comp. revelados con Sudán
	frío		♂		U.V.	frío		♀		U.V.	Bf	C		
	Bf	C	Bf	C	Bf	Bf	C	Bf	C					
Esencia ataquá	20	a+	3	m++	80	13	a+	13	m+	10	17	ll	siete	tres
Nahuel (uapi)	46	a+	10	m+	98	23	a++	23	m++	23	74	r+		
	58	a+	58	m+		54	a+	36	m+	86	95	n++		
	80	a+	80	m+				54	m++					
								86	m+					
esencia limascharicum	20	a+	20	m+	-	23	a+	0	m+	14	23	r+	cuatro	cuatro
esencia caabm desalcan)	64	a+	98	m++		67	a++	14	n+	23	67	r+		
alta	90	a++				84	n+	23	m+	52	88	n+		
	98	a+				98	a+	67	m+	84	98	m++		
								84	m++					
Esencia de China	12	a+	35	m+	50	21	a+	7	m+	21	33	ll	siete	cuatro
	35	n+	70	m++	64	64	a+	21	m+	73	67	r++		
	54	a+	83	n++		88	a+	64	m++	88	80	n++		
	70	n++				95	a+	73	m++	95	97	n++		
	83	n++						88	m+					
								95	m+					
Domillo (Mendoza)	21	a+	20	m+	-	45	a+	45	n+	23	22	ll	cuatro	cuatro
	46	a+	71	r+		66	m+	98	r+	45	48	r+		
	71	a0				98	a++				69	n+		
											87	n+		

Esencias	D NPH directo					Oxidación			
	frio		o		U.V.	frio		o	
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C
Esencia Vino	30	a+	30	m+	46	34	a+	14	a+
	58	ao	58	m+		61	a++	26	m+
	75	ao	75	m+		89	a+	34	m+
	96	a+				97	rf+	61	m++
								97	rf+
Esencia de Parandula spika (bastelar)	24	a+	8	m+	8	55	a+	18	a+
	53	ao	17	m+	17	64	a+	26	m+
	73	a+				78	a++	64	a+
	97	ao				84	a+	78	a++
							84	m+	
Petitgrain (Paraguay)	0	u+	10	m-	68	35	a+	30	m+
	24	a+	31	m+	98	65	a+	65	m-
	68	a+	68	m+				95	m+
	95	a+	98	m+					
Menta piperita (Mendoza)	0	a+	10	m+	95	23	a+	98	m+
	20	a+	55	a+		85	a+		
	55	ao	95	rf+					
	85	a++							
Lavanda officinalis (Mendoza)	0	a+	55	m+	-	57	ao	23	m+
	55	a+	98	m+		64	a+	64	m+
	85	a+				81	a++	78	m+
						98	a+	98	m+

Esencias) NPH direct)					Oxidación					Sudán		Comp. revelados con NPH	Comp. revelados con Sudán
	frio		o		U.V.	frio		o		U.V.				
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C	Rf	C			
Esencia Pino	30	a+	30	m+	46	34	a+	14	a+	34	58	hl	cinco	tres
	58	ao	58	m+		61	a++	26	m+	61	77	m+		
	75	ao	75	m+		89	a+	34	m+	97	98	m++		
	96	a+				97	rf+	61	m++					
								97	rf+					
Esencia de Arandula roja (Castelar)	24	a+	8	m+	8	55	a+	18	a+	26	9	hl	seis	cuatro
	53	ao	17	m+	17	64	a+	26	m+	64	74	r+		
	73	a+				78	a++	64	a+	78	88	r++		
	97	ao				84	a+	78	a++	98	97	m++		
								84	m+					
Esencia (Paraguay)	0	u+	10	m-	68	35	a+	30	m+	9	25	r+	siete	cuatro
	24	a+	31	m+	98	65	a+	65	m+	59	58	r+		
	68	a+	68	m+				95	m+	98	72	m+		
	95	a+	98	m+							98	m++		
Esencia piperita (Mendoza)	0	a+	10	m+	95	23	a+	98	m+	86	12	hl	seis	cuatro
	20	a+	55	a+		85	a+				22	hl		
	55	ao	95	rf+							57	m+		
	85	a++									97	m++		
Esencia officinalis (Mendoza)	0	a+	55	m+	-	57	ao	23	m+	64	57	hl	cuatro	cuatro
	55	a+	98	m+		64	a+	64	m+	98	87	r+		
	85	a+				81	a++	78	m+		64	m+		
						98	a+	98	m+		98	m++		

Especies	D NPH (directo)					Oxidación				
	fuo		Ø		UV	fuo		Ø		U
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C	R
Limonocass (Misiones)	35	a+	24	a+	35	55	a+	21	m+	5
	68	m++	35	m+	68	64	a+	55	m+	7
	98	m++	68	m++		78	a++	78	m+	9
			98	m++		84	a+	84	r+	
							95	m+		
Peretit Racional	0	a+	10	m+	98	12	a+	4	a+	6
	21	m+	21	m+		41	a+	12	a+	8
	30	m+	98	m+		54	a0	41	m+	9
	98	m+				98	a+	65	a+	
							84	a+		
							98	r+		
Poleo Genta pulegium (Misiones)	26	a+	15	m+	15	35	a+	25	r+	2
	38	a+	73	m+	40	70	a+	36	a+	6
	66	a+	40	m+	50			75	a+	9
	73	a+			73			98	m+	
	97	a+			98					
Comino extranjero	10	a+	10	m+	90	11	a+	11	m+	5
	38	m+	90	m+		51	a+	51	m+	6
	75	m+				68	a+	68	m+	2
	90	m+				77	a+	86	m+	5
							95	m+		

	D NPH directo)					Orudación					Sudán		Comp revelados con D NPH	Comp revelados con Sudán
	fuo		Ø		UV	fuo		Ø		UV				
	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C	Rf	C	Rf	Rf	C		
Presencias														
monorass (Divisiones)	35	a+	24	a+	35	55	a+	21	m+	55	9	bl	cuatro	cuatro
	68	m++	35	m++	68	64	a+	55	m+	78	74	r+		
	98	m++	68	m++		78	a++	78	m+	98	88	r+		
			98	m++		84	a+	84	r+		97	m++		
								93	m+					
retib Baoumal	0	a+	10	m+	98	12	a+	4	a+	65	17	bl	cineco	cuatro
	21	m+	21	m+		41	a+	12	a+	84	33	bl		
	30	m+	98	m+		54	a0	41	m+	98	77	m++		
	98	m+				98	a+	65	a+		98	m++		
								84	a+					
								98	l+					
leo Kenta lequim (Divisiones)	26	a+	15	m+	15	35	a+	25	r+	27	12	bl	suere	unos
	38	a+	73	m+	40	70	a+	36	a+	67	37	bl		
	66	a+	40	m+	50			75	a+	98	48	r+		
	73	a+			73			98	m+		70	m++		
	97	a+			98						97	m++		
mondo extranjero	10	a+	10	m+	90	11	a+	11	m+	51	15	bl	cuatro	cuatro
	38	m+	90	m+		51	a+	51	m+	68	40	bl		
	75	m+				68	a+	68	m+	86	77	m+		
	90	m+				77	a+	86	m+	95	84	m++		
								95	m+					

CONCLUSIONES

Se ha aplicado el análisis cromatográfico a la resolución y análisis de los aceites esenciales. Ante la necesidad de establecer métodos de cromatografía de los aceites esenciales y tomando en cuenta los trabajos ya existentes sobre componentes de aceites esenciales en este terreno, se ha procurado establecer una técnica que permita la resolución cromatográfica de éstos. Los aceites esenciales son uno de los campos de la química donde la cromatografía es una necesidad imperiosa dada la escasísima muestra existente a veces y su complejísima constitución. Cada esencia posee siempre 10 a 20 componentes distintos en variadísimas proporciones. Todo trabajo en los aceites esenciales requiere previamente un análisis cromatográfico que oriente el trabajo posterior, como en otros productos naturales: alcaloides, vitaminas, glúcidos, etc.

Sin embargo se puede decir que el análisis cromatográfico directo de aceites esenciales se ha visto impedido por las características de los aceites esenciales, pues son casi irresolubles por la cromatografía de adsorción en columna y la cromatografía de partición en papel. Por eso en los últimos diez años se resolvió la cromatografía de las esencias separando distintas fracciones de ellas, carbonílicas, fenólicas, terpénicas, etc. y cromatografiándolas por separado. En este trabajo se ha encarado la cromatografía directa de los aceites esenciales y se ha resuelto con éxito. Se adoptó la técnica de la placa adsorbente "chromatoplate" empleada para componentes de esencia y se adaptó de forma que resultó eficaz para la cromatografía de los aceites esenciales. La técnica se puso a punto primero con componentes puros, pasándose luego a la resolución exitosa de mezclas ternarias y cuaternarias y por último a la cromatografía y resolución de los aceites esenciales mismos. Se cromatografían las esencias en una placa de vidrio recubierta de material adsorb-

bente. Se aplicó a 40 aceites esenciales. Se revelan los componentes con:

- a) Los carbonílicos con 2-4 dinitrofenilhidrazina en frío, con calor y a la luz U.V.
- b) Los terpénicos no carbonílicos aprovechando su sensibilidad a los ácidos y al calor y su absorción en la luz U.V.
- c) Los compuestos alcohólicos y con ligaduras no saturadas de las esencias se oxidan con ácido crómico en el mismo cromatograma y se revelan con los métodos a) y b).
- d) Se introduce un revelante nuevo para los aceites esenciales: el Sudán III. Además cada componente se identifica por su Rf como en la cromatografía de partición en papel. Los resultados se consignan en las tablas correspondientes.

Este método es muy exitoso en la resolución de los aceites esenciales. Su rapidez y su alto poder de resolución, evidenciado en los numerosos componentes revelados, y la valiosísima idea que proporciona sobre los grupos funcionales de los componentes de esencias (carbonílicos, terpénicos, alcohólicos, con ligaduras no saturadas), así como la ventaja principal de ser una cromatografía directa de los aceites, nos permite ser optimistas sobre su utilidad en el campo de la química analítica.

Adolfo L. Puente

M. R. J. J. J.

B I B L I O G R A F I A

- 1) G.Hesse Berl- Lunge- D'Ann: Anal.Quim.Ind. Apéndice I (1950)
- 2) A.J.F. Martin y R.M.Synge: Biochem.J. 35, 1358 (1941)
- 3) J.Weiss: Journ Chem.Soc. Part. II; 297 (1943)
- 4) A.C.Offord y J. Weiss: Nature, 155, 725, (1945)
- 5) J.De Vault: JACS 65, 532 (1945)
- 6) E.Glueckauf: Nature, 156, 205 (1945)
ibid. 156, 748 (1945)
- 7) L.Zechmeister y L.Cholnoky "Principles and Practice of Chromatographic method" (1941)
- 8) H.Strain, Chromatographic Adsorption Analysis (1942)
- 9) T.I.Williams + An introduction to Chromatography (1947)
- 10) E.Lederer - Progres Recents de la Chromatographie (1949)
- 11) Goppelsroeder- Ueber capillar Analyse und ihre Anwendung(1888)
- 12) Freundlich- Capillarchemie (1909)
- 13) : Biochemical Journal, 38, 224 (1944)
- 14) Munier, Machebeuf - Bull- Soc.Chim.Biolog. 849 (1951)
- 15) Resumen de cromatografias en papel. Bull. Soc.Chim.de France No.:Sept.October (1952)
- 16) Munier, Bull. Soc. Chim. France 852- 873 (1952)
- 17) Kirchner E.G; Miller J.M.y Keller J.G. Analytical Chemistry 23,420 (1951)
- 18) Kirchner- Keller : JACS 72, 1867 (1950)
- 19) Rutter - Nature 166, 273 (1950)
- 20) A.Montes y J.Labat: A.Asoc.Quim. 41, 166 (1953)
- 21) Reitzema: Ann. Chem. 26, 960 (1954)
- 22) T.Reichstein: Helv. Chem. Acta. 21, 1197 (1947)
- 23) J.L.Cramer: Nature, 161, 349 (1948)
- 24) K.Folker y J.Shawel: JACS 64, 1892 (1942)
- 25) E.J.Norberg, I.Auerbach, y R.M.Hixton: JACS: 67,342, (1945)
- 26) I.B.De Witt y M.Sullivan. Ind.Eng. Chem. 18, 117 (1946)
- 27) M.Koffler: Helv.Chim. Acta: 25, 1469 (1942)
- 28) Koffler: Helv.Chim. Acta 28, 702 (1945)

- 29) H. Brockmann y F. Volper: Chem. Ber. 80, 77 (1947)
- 30) A. Montes y E. Clavet: Anales. Asoc. Quim. 41, 99, (1953)
- 31) A. Koschura. Ber. 67, 761 (1934)
- 32) Plattner y Pfau- Hel. Chim. Acta 20; 230/1 (1937)
- 33) Brockmann y Volper- Analyst, 71; 251/63 (1946)
- 34) Miller J.M. y Kirchner J. G. Anal. Chem. 23, 428/30 (1951)
- 35) Miller J.M. y Kirchner, J.G. An.Chem. 24, 1480 (1952)
- 36) A.L. Montes - An. Asoc. Quim. 40, 273/82 (1952)
- 37) Miller J.M. - Kirchner K.G. An. Chem. 25, 1107 (1953)
- 38) B. Cortina y A.L. Montes: An. Asoc. Quim. 42, 213/22 (1954Q)
- 39) Bland D.E. Nature 163, 568 (1949)
- 40) Allen, D.F.H. JACS, 52, 2955 (1930)

