

Tesis de Posgrado

Análisis por cromatografía de hidrocarburos terpénicos

Gallardo Sarasola, Isabel F.

1959

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:

Gallardo Sarasola, Isabel F.. (1959). Análisis por cromatografía de hidrocarburos terpénicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1017_GallardoSarasola.pdf

Cita tipo Chicago:

Gallardo Sarasola, Isabel F.. "Análisis por cromatografía de hidrocarburos terpénicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1017_GallardoSarasola.pdf

1.19.3

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Resumen de Tesis

Presentada por: ISABEL F. GALLARDO SALASOLA

Para optar al título de: Doctora en Química.

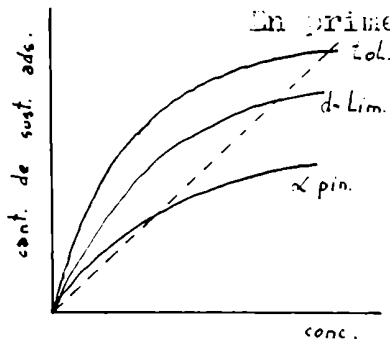
Tema: Análisis por cromatografía de Hidrocarburos
Terpénicos.

Año: 1959

ANÁLISIS POR DESPLAZAMIENTO DE HIDROCARBUROS TERPÉNICOS

El presente trabajo tiene por objeto establecer un nuevo método de separación de hidrocarburos terpénicos y posterior identificación de los mismos.

Para ello se hizo uso del análisis cromatográfico de adsorción; viendo los resultados obtenidos por Tiselius y Claesson al aplicar estas técnicas sobre azúcares, ácidos grasos y fenoles, quisimos ampliar el método con algunas modificaciones a fin de poder abarcar a los hidrocarburos terpénicos, y basándonos en el trabajo realizado por A. Casser, E. Harris, U. Christensen y W. Bøge (Universidad de Ohio; aparecido en Journal of American Pharmaceutical Association - Vol. 43. nº 5 - 1954).

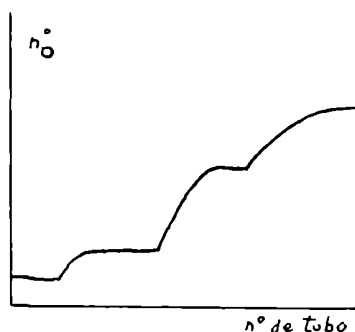


En primer lugar se hicieron las isoterms de adsorción sobre sílica gel para tolueno, α pineno y d-limoneno; luego trazando una recta desde la isoterma del eluyente, a la concentración empleada hasta el origen, se cortara las isoterms de los otros componentes en

Res. de Tesis: 1017

determinados puntos quedando establecida la concentración a la que éstos saldrán de la columna. O sea, el eluyente, sustancia con mayor coeficiente de adsorción irá desplazando a los otros más debilmente adsorbidos y a la vez establecerá concentraciones estacionarias para cada uno de modo que migren por la columna unos detrás de otros y salgan aproximadamente a la concentración establecida por las isotermas.

Si se van separando porciones de 0,5 ml. en distintos tubos y luego se determina el índice de refracción de cada uno de ellos, podrá construirse un gráfico de las siguientes características:



donde a medida que sale cada componente puro, el n_D se mantiene constante dando lugar a la formación de escalones. De esta manera puede saberse el número de componentes en una mezcla e identificarlos, como se hizo en la práctica, por derivados característicos tales como nitrosocloruros y derivados bromado.

Es interesante hacer notar que la altura de cada escalón para una determinada sustancia sólo depende del eluyente y su concentración; y la longitud de la cantidad de sustancia.

En la práctica se puso a punto el método empleando componentes conocidos y luego se aplicó, con buenos resultados a aceites esenciales, previo tratamiento con sodio, realizando todas las cromatografías a $3^\circ \pm 0,5^\circ$, para evitar cualquier isomerización.

Así mismo se comparó con el método cromatográfico en

placas dando por los dos caminos igual número de componentes, pero en el caso de la columna puede reconocerse cada uno por medio de derivados característicos asegurándose así la identificación.

Es de gran importancia encontrar el eluyente que a una concentración baja, logre establecer en el menor tiempo posible concentraciones estacionarias para cada componente, redundando este hecho en la formación de escalones bien netos.

Aprovechando las diferencias estructurales que los mismos hidrocarburos presentan, y que son de tanta importancia para determinar la afinidad de adsorción, podemos ampliar en un grupo más los distintos métodos cromatográficos que se aplican con éxito para la separación y caracterización de componentes provenientes de esencias naturales.

Además, gracias a la colaboración del Doctor M. Arber de Laboratorios Ivvar, pudimos hacer una cromatografía gaseosa de la esencia de trementina, teniendo oportunidad de observar que son técnicas muy rápidas y de gran eficacia. En nuestro caso, aparte de detectar los tres componentes fundamentales que habíamos hallado, apareció un cuarto pico, pequeño, debido a trazas de algún otro hidrocarburo que por hallarse en muy poca cantidad, no pudo detectarse en la cromatografía líquida.

Este método, junto con el análisis infrarrojo resulta de muchísimo valor para establecer la pureza de drogas y hallar pequeñas impurezas o adulteraciones y creemos que resultarán dentro de breve tiempo, elementos indispensables para todo laboratorio químico.

Adolfo Montel
A B

Dr. M. Arber

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE HIDROCARBUROS TERPENICOS

Tesis por:

ISABEL F. GALLARDO SARASOLA

para optar al título de:

TESIS: 1017

Doctora en Química

Año 1959

mi padre

Vaya en estas palabras mi más sincero
agradecimiento para el Doctor A. Montes,
quien con su larga experiencia, brindó
en todo momento la ayuda y consejo valio-
sísimo a fin de alcanzar la meta deseada.

Sea también mi agradecimiento para la Fundación Alberto Einstein pues mediante su ayuda, pude dedicar todo mi tiempo exclusivamente a estos trabajos, haciendo posible así su más pronto y completo desarrollo.

Agradezco al Doctor M.A. Arber, de laboratorios Invar la ayuda valiosísima que brindó al realizar un estudio de cromatografía gaseosa sobre la trementina para comparar y conocer este método más moderno, al mismo tiempo que enseñó el manejo del nuevo aparato demostrando en todo momento amplio sentido de colaboración.

INDICE

Página

Consideraciones generales sobre aceites esenciales	1
Análisis de aceites esenciales	6
Teoría de los métodos utilizados	9
Análisis de frente	11
Análisis de elusión	12
Análisis de desplazamiento	13
Isotermas de adsorción	22
Isomerización en gel de sílice	24
Método de extracción de productos aromáticos ...	27
Hidrocarburos terpenicos - características	28
Métodos de identificación de hidrocarburos terpenicos	31
Métodos de separación de hidrocarburos terpeni- cos	35
Consideraciones generales sobre adsorbentes y eluyentes	36
<u>PORTE EXPERIMENTAL</u>	
Obtención de hidrocarburos terpenicos	39
pineno - reconocimiento	41
Carano D ₄ - reconocimiento	42
Carano D ₃ - reconocimiento	42
Isotermas de adsorción - ensayos	44
Elución de solvente	49
Condiciones óptimas para realizar cromatografía .	51

	<u>Página</u>
Isotermas de adsorción - Cálculos	52
Ensayos realizados con muestras conocidas	54
Nitrosocloruros - Técnica	55
Derivado bromado - Técnica	58
Análisis de Tremontina	62
Esencia de Nolle - Análisis	65
Canfeno - Reconocimiento	66
Cadineno - Reconocimiento	69
Cromatografía en placas	69
Comparación	73
Conclusiones	75
Cromatografía gaseosa	76
Comparación con cromatografía líquida	78
Bibliografía	80

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE ACEITES

ESENCIALES

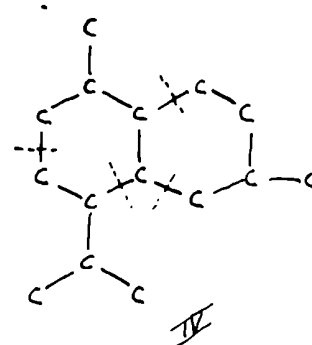
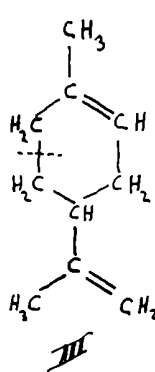
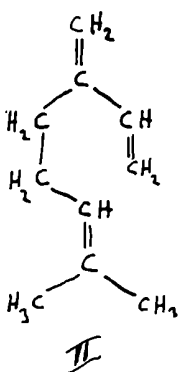
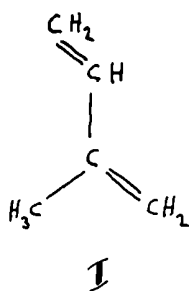
Los aceites esenciales de las plantas, que están presentes en flores, frutos, hojas y también ocasionalmente en la madera (madera de alcanfor, por ej.) consisten en mezclas complejas de sustancias de tipo acíclico, alicíclico y aromático.

Generalmente se los separa por destilación en vapor, donde son volátiles o por extracción con solventes.

En la mayoría de los casos el producto obtenido así no es homogéneo pero puede ocasionalmente predominar un componente, tal el caso de aceite de clave compuesto casi enteramente de engenol.

Considerando el esqueleto en sí de hidrocarburos acíclicos y alicíclicos y sus derivados, se observa el hecho interesante que ellos contienen el esqueleto del isopentano repetido, $C_5 H_8$ (I).

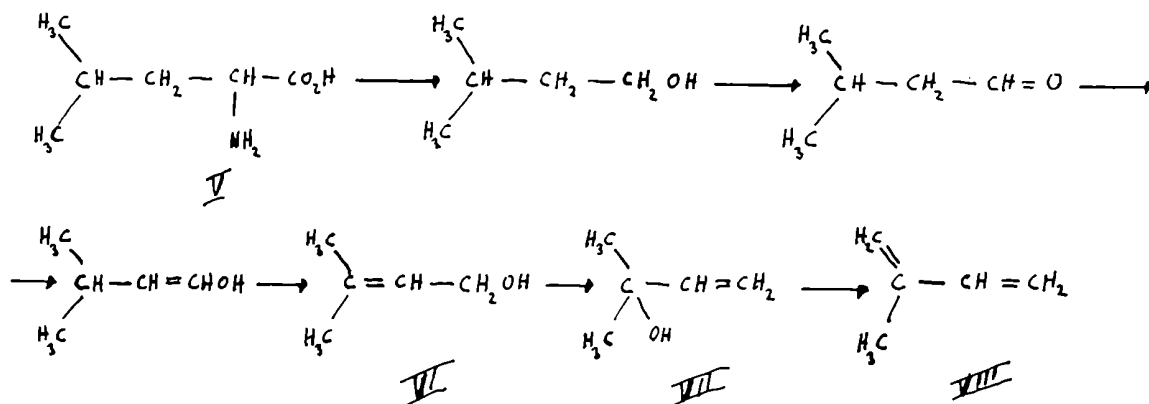
Así por ejemplo, el hidrocarburo simple mirreno (II) y el limoneno (III) pueden ser construidos por fusión de dos núcleos de isopreno; el sesquiterpene cadineno IV contiene tres núcleos de este tipo.



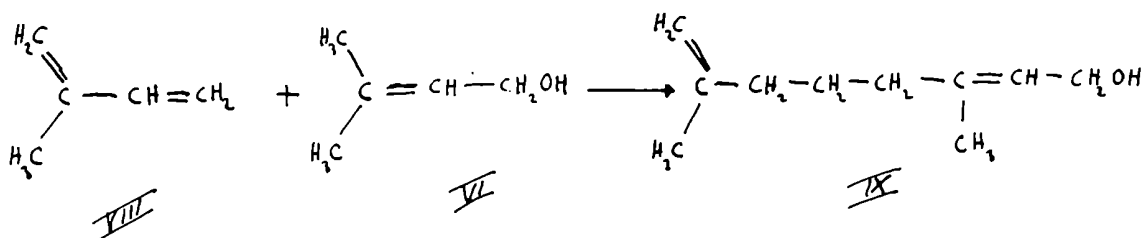
La así llamada regla isoprénica deducida de estas observaciones ha previsto una importante hipótesis para la dilucidación de la estructura, no solamente de terpenos simples, sino también de mezclas más complejas de sesquiterpenos y politerpenos.

Puede preverse solamente como trabajo de hipótesis ya que se conocen varios ejemplos anómalos, incluyendo uno que ha sido observado en la serie sesquiterpénica (1).

La parte que los terpenos juegan en el metabolismo de las plantas no es bien conocida, así como su formación. Una de las hipótesis acerca de esto último se debe a Favorsky y Lebedeva (2), quienes sugieren que la sustancia origen de los terpenos es el aminoácido leucina (V) formada por la degradación de proteínas, la cual pasa a isopreno VIII por las reacciones sig:

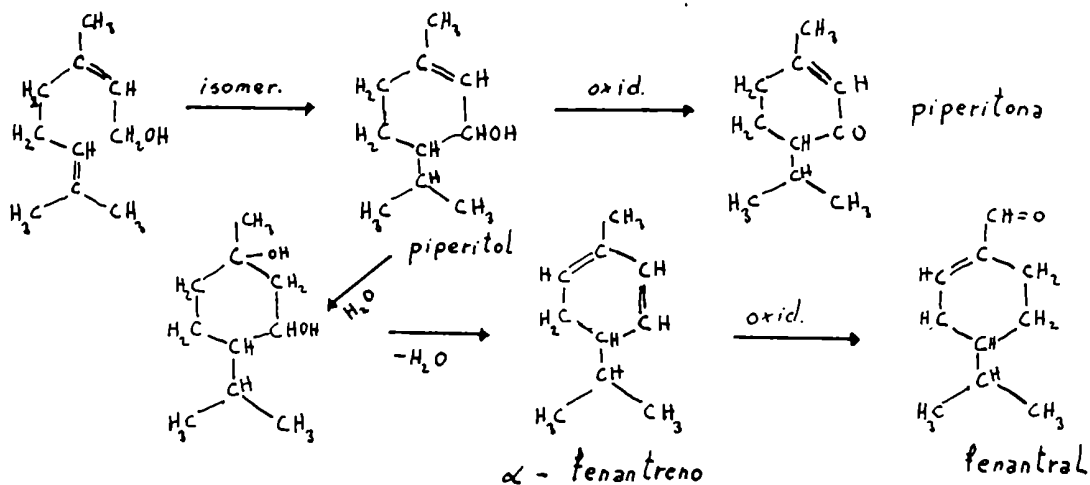


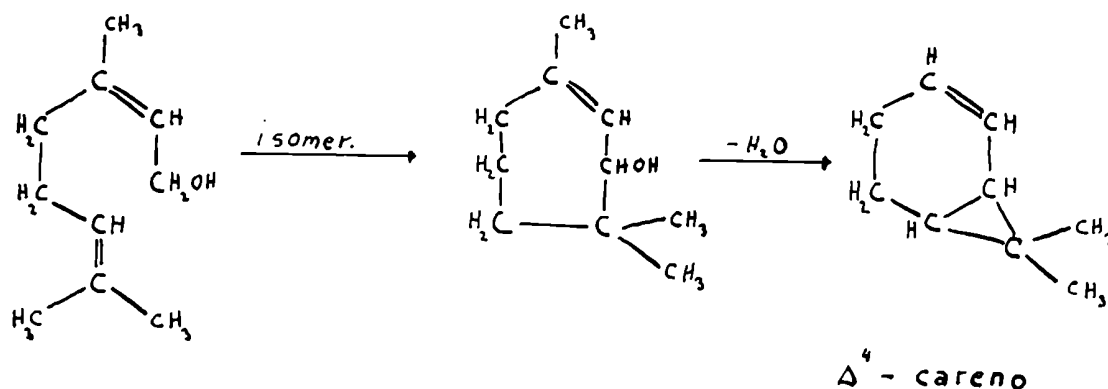
La condensación de isopreno (VIII) con VI daría origen al geraniol o con VII al linanel. La polimerización fácil del isopreno a hidrocarburo terpénico, alcoholes y sesquiterpenos ha sido estudiada por Wagner - Jauregg (3).

Ejemplo:

La sugerencia que la l-leucina debía ser precursora de los terpenos, había sido hecha previamente por Leoman (4) sobre la evidencia citológica que a la destrucción del protoplasma precede la formación de terpenos en ciertas plantas. Este simple mecanismo para la formación de geraniol a partir de leucina es un ejemplo interesante como señala Read (5); el alcohol posee una estructura molecular poco común: contiene un grupo alcohol primario activado por doble ligadura: $-\overset{|}{\text{C}} = \text{CH} - \text{CH}_2\text{OH}$ situada próxima a un segundo grupo activo: $\begin{array}{l} \text{H}_3\text{C} \\ | \\ \text{O} = \text{CH} - \\ | \\ \text{H}_3\text{O} \end{array}$. Debido a la gran movilidad de

este grupo, el geraniol puede considerarse como sustancia madre de gran variedad de terpenos acíclicos y compuestos relacionados.

Ejemplo: (A) α - Fenantreno y sustancias relacionadas.

(B) Δ^4 - Careno

Los ejemplos (A), (B) con algunos agregados fueron sacados de los trabajos de Mead (las sustancias sin nombre no se encuentran en fuentes naturales). De esta manera puede llegarse teóricamente a la formación de numerosos terpenos y sus derivados.

Los compuestos de naturaleza alifática en cadena recta se los supone derivan del metabolismo de los ácidos grasos y a los de núcleo aromático del metabolismo de los hidratos de carbono. Teoría expuesta por Hall (6).

Mientras que los principios odoríferos de hojas y flores pueden asumir el rol de fuente de atracción para insectos, esta propiedad no puede extenderse a los aceites presentes en otras partes de las plantas.

En este último caso es posible actuar como una protección contra el ataque de dichos insectos, pero no parece

muy satisfactoria esta explicación, uno más bien tiende a afianzarse la teoría que la presencia de los aceites esenciales en plantas se debe al metabolismo de las mismas.

Un hecho que debe tenerse en cuenta es que dichos aceites esenciales son constituyentes altamente característicos y mediante ellos existe la posibilidad de diferenciar las distintas especies de plantas.

Tal es el trabajo de Smith sobre aceites de diferentes clases de Eucalyptos; (7) dicho investigador basó la mayor parte de su clasificación del género sobre las características químicas del aceite derivado de cada especie.

El uso de este método como una ayuda a la clasificación morfológica ordinaria ha sido apoyado por Simonsen, y parece ser especialmente aplicable en el caso de yerbas como el *Cymbopogon*, donde los métodos ordinarios botánicos han encontrado grandes dificultades. El trabajo sistemático en este campo con métodos refinados puede abrir un vasto y profícuo campo de investigación.

ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES

Desde hace años se viene trabajando en el estudio e investigación de los distintos componentes existentes en aceites esenciales, dado que muchos de ellos tienen gran aplicación industrial y poseyendo un pleno conocimiento de su composición puede, por medios sintéticos llegar a obtenerlos en gran escala.

Se destacan entre los que más se han dedicado a este estudio en nuestro país el Doctor A. Montes y el Dr. G. A. Foster, quienes con otros colaboradores han tratado de esclarecer la constitución de numerosos aceites esenciales.

Entre los problemas que se presentan, uno de ellos es la poca cantidad de esencia disponible en muchos casos, que hace imposible la aplicación de algunos métodos de identificación, y su repetición para confirmar resultados.

Por eso es que con el advenimiento de la cromatografía, se trató de buscar su máxima aplicación dado que aquí solo eran necesarias cantidades mínimas para cada análisis.

Mucho se trabajó en este campo dando como resultado la utilización satisfactoria de métodos cromatográficos para distintos casos.

- 1) Separación e identificación de aldehídos y cetonas mediante cromatografía de las 2-4 dinitro fenilhidrazonas (8).
De alcoholes y fenoles como 3-5 dinitrobenzoatos (8').
- 2) Separación de ácidos grasos en columna de gel de sílice (9)

3) Análisis de aceites esenciales utilizando placas con gel de sílice. (10).

Este sistema también fué utilizado por nosotros con algunas variaciones aplicables a nuestro trabajo para corroborar y comparar la eficacia del nuevo sistema que empleamos.

Otra de las experiencias que puede dar idea acerca de la constitución de un aceite esencial, especialmente en el caso que predomine un componente es su espectro ultravioleta; por otra parte muy utilizado para saber si una sustancia ha sufrido adulteraciones.

En el presente trabajo hemos tratado de separar hidrocarburos terpénicos que estaban en aceites esenciales, mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice, y su posterior reconocimiento como derivados bromados, nitrosocloruros y otros, así como también una aplicación cuantitativa, utilizando para ello las isoterms de adsorción de los distintos componentes.

Estos métodos requieren cantidades mínimas y son además técnicas muy suaves que no alteran las características de las esencias y por consiguiente resultan convenientes en el caso de hidrocarburos terpénicos de tan fácil isomerización.

Recientemente Fink, Lewis y Wiss han descrito condiciones bajo las cuales hidrocarburos aromáticos y alifáticos son separados sobre gel de sílice (11). La separación de una mezcla de hidrocarburos por medio de adsorción selec-

tiva se basa en el hecho de que la tendencia de éstos a ser adsorbidos decrece en el orden: aromáticos > olefinas > saturados; además la capacidad del gel para adsorción de olefinas aumenta del siguiente modo: cadena derecha < cadena ramificada < olefinas cíclicas.

Con esta información como base, fué investigada la posibilidad de utilizar la variación de grados de insaturación y las diferencias estructurales que los mismos hidrocarburos terpénicos presentan, para separación por análisis por desplazamiento.

TEORIA DE LOS METODOS UTILIZADOS (12)

Es bien conocido que algunos sólidos porosos, como carbón, sílica gel, alúmina son capaces de tomar grandes cantidades de sustancias extrañas de soluciones y gases. Este fenómeno se llama adsorción y fué descubierto hace más de 150 años.

Scheele, en 1773 descubrió la adsorción de gases sobre carbón, y unos pocos años después, en 1785, Lewitz encontró que el carbón era capaz de decolorar ciertas soluciones.

Ya hacia el 1800 el método de adsorción adquirió gran aplicación industrial en la purificación de azúcares, incrementándose continuamente su uso en muchas técnicas y principalmente para remover impurezas.

Uno de los primeros experimentos de este tipo lo realizó Davilewk, en 1862 separando amilasa de trypsin en jugo pancreático por medio de adsorción sobre colloidian precipitado recientemente.

En 1906 el botánico ruso Tawett inventó un nuevo e ingenioso método para realizar análisis por medio de adsorción al cual denominó "análisis cromatográfico" que viene de su uso original en la separación de pigmentos.

Sin embargo escasas noticias se supieron acerca del método hasta 1930 en que aparecieron los trabajos de Kuhn, Winterslein y Lederer; desde entonces, en el transcurso de muy pocos años el análisis de adsorción cromatográfico pasó a ser una herramienta indispensable en trabajos de in-

investigación realizados por laboratorios químicos y existe bibliografía moderna excelente donde se puede observar la evolución del análisis cromatográfico de adsorción.

Los primeros se realizaron sobre mezclas de sustancias coloreadas (Tsuett) cuya separación podía hacerse visible fácilmente; más tarde se introdujeron variaciones para poder aplicarlo a sustancias incoloras, como era observar la columna con luz ultravioleta (impropiamente llamado ultracromatografía); otra posibilidad era convertir dichas sustancias incoloras en otras coloreadas por medio de reactivos convenientes antes o después de la adsorción.

En 1940 Tiselius aplicó el método que se utilizó en nuestro trabajo, o sea: determinó la concentración de la solución que sale de la columna por continuas mediciones del índice de refracción; método de fácil aplicación, rápido y que requiere muy poco volumen. Posteriormente se perfeccionó el método para obtener separaciones cuantitativas.

Los experimentos realizados comprenden tres caminos distintos: análisis de frente, análisis de elusión y análisis por desplazamiento.

En todos ellos se hace uso del volumen de retención que da el grado de afinidad de adsorción para distintas sustancias.

Es el volumen de líquido que pasa por la columna antes que la sustancia en cuestión salga; si se lo divide por el peso de adsorbente, se obtiene el "volumen específico de retención" ml/g; desde luego que no se incluye el pequeño

volúmen de solución necesario para reemplazar el solvente entre las partículas adsorbentes al comienzo del experimento. (13).

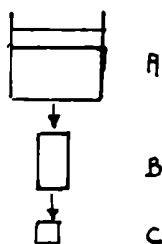
Ejemplo: Volúmen de retención ml/g. de carbón (Tiselius)

Alanina	0,3	Valina	3,2	Histidina	15
Prolina	2,5	Leucina	7,7	Arginina	40,4

Claeson (14) mostró que en una serie homóloga el grado de adsorción puede ser correlacionado con el punto de ebullición pues siempre se incrementa al aumentar p.e.

Hall y Tiselius lo confirmaron para el caso de compuestos isómeros con grupos funcionales similares. El p.e. de 2 metil 2- butanol, 3 metil- 1 butanol y 1 pentanol son respectivamente 101,3°, 130,5°, 138°. Los volúmenes de retención observados eran 76; 97 y 113 ml.

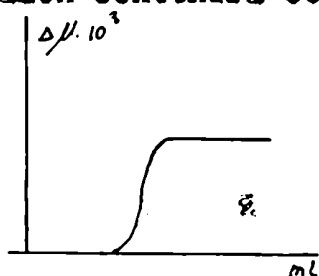
Análisis de Frente:



El adsorbente se lava primero con solvente puro; después, la solución a ser analizada se vierte continuamente en A y seguidamente pasa a través del filtro B; la solución es adsorbida y se mueve rápidamente con un frente agudo mientras el filtro comienza a saturarse.

Al principio el solvente puro pasa a la celda e y la concentración de soluto es cero. Cuando el adsorbente de B está saturado, o sea cuando el frente ha pasado a través de todo el filtro, la concentración de c crece repenti-

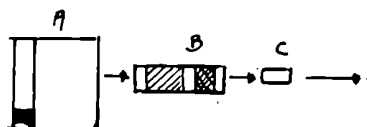
namente, obteniéndose un diagrama con un escalón si se trata de una sola sustancia y de 2 escalones si se trata de dos sustancias, etc. El primer escalón contiene componente 1; el segundo contiene componentes 1 y 2, y similarmente el i escalón contendrá componentes 1, 2... $i-1$, i . El volumen V_1 que



ha pasado por el filtro antes que el soluto i salga se llama volumen de retención para el componente i . El volumen éste será mayor cuanto más grande sea la adsorción pero

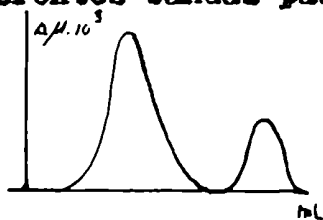
también se incrementa con la dilución, por consiguiente no puede ser usado directamente, para análisis cualitativo de una mezcla (15).

Análisis de elución:



Después de lavar el filtro adsorbente con solvente puro, se introduce una pequeña cantidad de solución a ser analizada. El recipiente A se llena entonces con solvente puro, que pasa luego a través del adsorbente; de este modo los componentes se mueven por la columna en zonas separadas; en C la concentración es

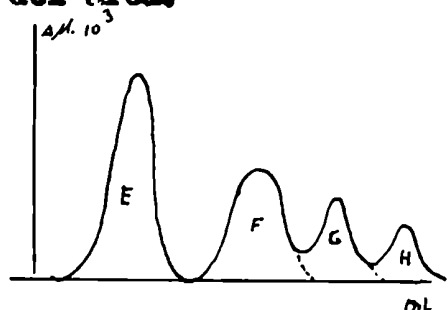
cero durante el curso del experimento excepto cuando las diferentes bandas pasan por ella.



En el diagrama cada componente se representa por un pico y el análisis cuantitativo se realiza por medición de las áreas que encierran dichos picos; en algunos casos cada compo

nente sale al estado puro y puede identificarse por métodos analíticos ordinarios.

El inconveniente que se presenta son las grandes de los picos debido a sustancias fuertemente adsorbidas las cuales hacen difícil su separación e incierta la determinación del área.

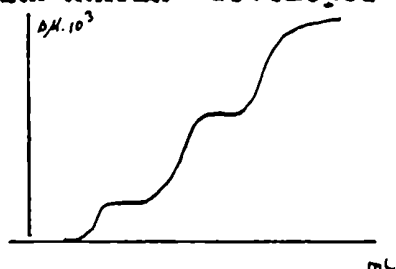


La figura muestra el caso de revelado por elución de una mezcla E, F, G, H. Se ve que la sustancia E sale de la columna libre de otras pero no así la F pues antes de ser completamente eluida ya aparece la G. Igual sucede con H. Esta dificultad se debe al hecho que muchas sustancias son adsorbidas más fuertemente de solución diluida.

Tiselius ha demostrado que es ventajoso revelar el cromatograma con una solución de sustancia más fuertemente adsorbida que las de la mezcla a ser separadas. Este método se llamó:

Análisis por desplazamiento: Aquí después de agregar un peque-

ño volúmen de muestra, y lavar con unas gotas de solvente puro, se agrega una solución de sustancia "developer" las cuales es adsorbida más fuertemente.



Durante el transcurso de dicho cromatograma las sustancias adquieren rápidamente una concentración estacionaria la cual se representa grá-

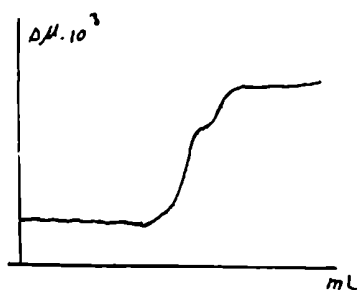
ficamente por un escalón cuya longitud depende de la cantidad de sustancia y la concentración única y exclusivamente de la sustancia eluyente elegida y su concentración. Luego por medición de alturas se practica análisis cualitativo y de longitud de escalones el cuantitativo.

Desafortunadamente, no siempre se puede aplicar este método, como en el caso de sustancias adsorbidas irreversiblemente.

Existe una ocasión en la cual se prefiere análisis de elución al de desplazamiento: cuando las condiciones de adsorción son tan favorables que es posible encontrar una serie de solventes los cuales sucesivamente eluyan los diferentes componentes.

En el caso de desplazamiento, el inconveniente, tal como lo indican Holman y Hagdahl (16) es que las zonas salen de la columna inmediatamente una detrás de otra sin estar separadas por solvente puro. Esta dificultad, en caso de ser necesario salvarla, como en separaciones netamente cuantitativas, puede evitarse mediante el uso de "carriers" Son sustancias de afinidad intermedia entre las que forman las zonas; se ha logrado separar gran número de aminoácidos y péptidos por interposición de alcoholes alifáticos.

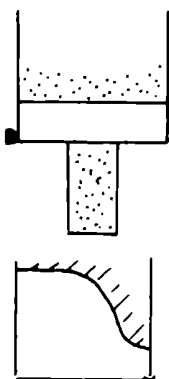
Drake ha estudiado algunos factores que influyen sobre la nitidez de separación de las zonas, tal como el empaquetamiento y forma de la columna, presión superior. En muchos casos el aspecto gráfico del ofomatograma puede ser el siguiente:



Como se observa, la subida del escalón no está indicada en forma rápida y neta pudiendo dar lugar a suposiciones erróneas.

Para cerciorarse, y esto fué lo que siempre hicimos en nuestro trabajo, puede doblarse la cantidad de sustancia a analizar y ver si correspondientemente aumenta la longitud de los dos escalones, si fuesen dos sustancias esto debería suceder.

Otro método técnico sería el dado por Claesson que requiere cambio de columna. Se usan 2 ó 3 columnas cuyo diámetro decrezca según se indica en la figura.



Una columna de diámetro mayor que posee en su base un compartimiento sin adsorbente, es seguida de una segunda columna más chica. Cuando la curva de la zona entra en ese compartimiento ocurre la mezcla con solvente puro de antes allí y la solución ahora diluída entra en la segunda columna.

Como en general la parte diluída es adsorbida fuertemente más fuertemente que la concentrada, es rápidamente alcanzada por la región de concentración mayor que sale por la columna grande. De esta manera, se forma un frente uniforme horizontal en la segunda columna.

Este mismo efecto no se logra si se coloca un compartimiento vacío entre dos columnas de igual diámetro, o usan

de columna cónica.

La técnica de Tiselius ha tenido muchas e importantes aplicaciones.

Caso de análisis de éteres y sulfitos orgánicos en sílice (17). Estudio en hidrocarburos, alquilduros, bromuros, cloruros, nitrilos, mercaptanos (18).

Análisis de ácidos no saturados (19).

Análisis de azúcares (20).

A continuación daremos algunos detalles más del análisis por desplazamiento, e interpretación de gráficos, dado que fué el utilizado en el trabajo nuestro.

Como ya se ha dicho, en muchos casos se hace inconveniente un análisis de elusión tratándose de sustancias fuertemente adsorbidas pues para obtener una separación completa deben agregarse grandes cantidades de solvente, las bandas se van ensanchando y de este modo resultan concentraciones bajas que son difíciles de observar con métodos interferométricos.

El mejor camino para evitar esta dificultad sería usar como revelador otro solvente el cual reduzca los coeficientes de adsorción, en lo posible, a la región donde es válida la ley de Henry (21), y el coeficiente se hace constante.

Este es probablemente el significado del uso de algunos reveladores bien conocidos para todo trabajo en cromatografía.

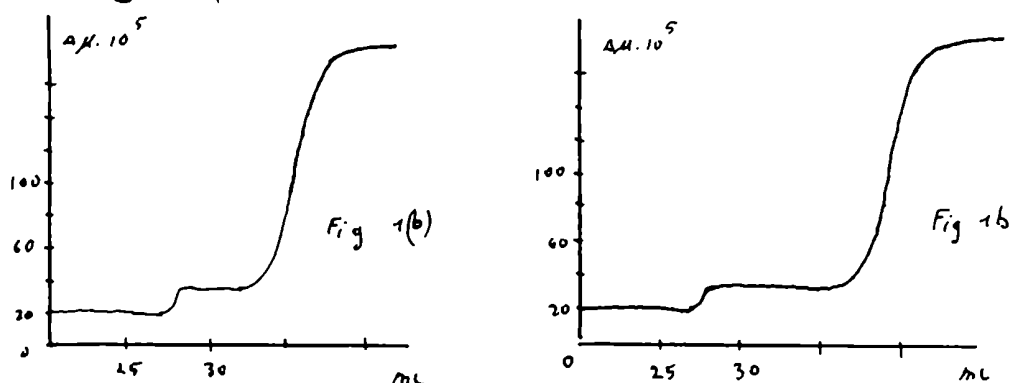
Es nuestro propósito describir algún método de revelado en análisis de adsorción en el cual las bandas no se desplacen más allá de un cierto límite y por consiguiente resulta bien adaptado para métodos de observación ópticos, además de dar una máxima separación con mínimo revelador y adsorbente.

Supongamos un ml. de 0,5% solución acuosa de sacarosa que está presente en un extremo de una columna de carbón activado.

La columna es entonces lavada con un revelador consistente en una solución de sustancia con más alta afinidad de adsorción, ej: 0,5% solución acuosa de fenol.

La concentración de la solución que sale por la columna se mide interferométricamente.

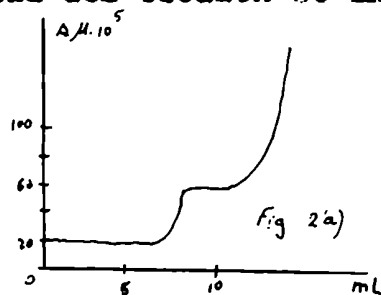
Fig. 1 (a) muestra diagrama así obtenido cuando el filtro tiene un volumen de 250 mm^3 . Con cantidades grandes de carbón (500 o 1250 mm^3) se obtiene exactamente el mismo diagrama.



El primer escalón en la curva contiene toda la sacarosa

(95% - 98%) recuperado) y no da ninguna reacción para fenol; el segundo escalón representa el fenol. Si se usa la misma cantidad, pero en otras concentraciones de sacarosa (0,05%, 0,1%, 2%) también resulta el mismo diagrama, siempre que la concentración de fenol se mantenga a 0,5%.

Si la cantidad de sacarosa es doblada, la longitud del escalón se incrementa pero no su altura. Fig. 1b.



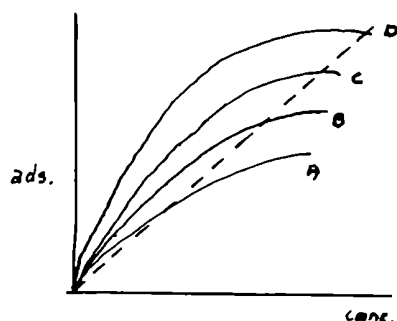
Si finalmente la concentración de fenol se varía a 1,0% la altura del escalón de sacarosa es incrementada Fig. 2 a.

De estos experimentos se deduce que con esta clase de revelado se establece un estado estacionario tal que la distribución de concentración es independiente de long. de la columna o la cantidad de revelador usado contrario a la conducta en revelado por elución.

Si se tiene una mezcla de sustancias llamadas A, B y C adsorbidas en la columna y reveladas por adición de una solución D.

Es presumible que la afinidad de adsorción sigue el orden: $D > C > B > A$. Fig. 2(b) muestra las isotermas de adsorción para las sustancias. Si se establece un estado estacionario todos los componentes deben viajar a través de la columna con el mismo orden.

Acorde con la teoría expuesta en (22), ésto es



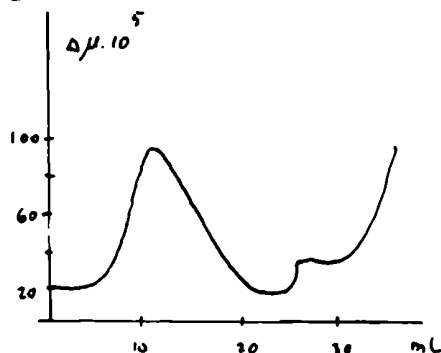
posible solamente si las concentraciones son ajustadas de tal forma que los coeficientes de adsorción son los mismos. Dada la concentración del revelador D nosotros trazamos una recta desde el punto o correspondiente sobre la isoterma de D hasta el origen. Esta línea al cortar las isotermas de los otros componentes, establece los valores correspondientes a las concentraciones estacionarias o sea la altura de cada escalón en el diagrama de la fig. 1 (a).

En revelado por elución una banda aislada dará una larga cola de sustancias la cual se quedará lentamente detrás debido al hecho que el coeficiente de adsorción alcanza-rá valores muy altos a concentraciones más bajas. Es esencial observar que ésto no ocurre un revelado por desplazamiento. El coeficiente para A en presencia de B no se elevará a valo-res altos y siempre será menor que el de este último aun a la concentración más baja de A.

Por ésto, del estado estacionario resultará la formación de los diferentes componentes puros cada uno a concentración característica que depende del desplazador y es independiente de su cantidad o presencia de otras sustancias.

Algunas veces se presentan componentes en una mezcla con afinidad de adsorción baja y no pueden formar concentración estacionaria; en fig. 2 (b) esto correspondería a una isoterma tan baja que no es cortada por la línea de coeficien-tes de adsorción constantes. Si esto acontece, el componente se comporta como en elución y formará una banda separada que

migrará independiente del sistema.



De todo esto sacamos en conclusión que durante la migración tienen lugar dos procesos simultáneos.

- 1 - Ajuste gradual de las concentraciones de A, B y C a valores estacionarios determinados por D.
- 2 - La separación de los componentes, unos de otros.

Sustancias fuertemente adsorbidas requieren menos adsorbente y dan separaciones completas con sólo unos cm^3 de revelador.

Sustancias débilmente adsorbidas requieren más adsorbente y puede suceder que comiencen a salir antes de haber establecido concentración estacionaria.

La selección del desplazador D es muy importante.

Debe tener una adsorción mayor que la de todos los componentes presentes. La concentración deberá elegirse de tal forma que permita a todas las sustancias poder alcanzar estado estacionario; en gráfico de Fig. 2 (b) se traduce en el hecho que la línea recta corte a las isotermae por la zona donde se verifica la ley de Henry.

Un análisis cuantitativo es hecho más exactamente

por dos experimentos sucesivos sobre la misma muestra usando, por ejemplo, el doble de cantidad en el segundo. Por integración de la diferencia entre las curvas se elimina la incerteza debida a la falta de nitidez en la separación de escalones contiguos.

Muchos trabajos de este tipo han encontrado amplio apoyo para su realización en The Swedish National Tuberculosis Association. Uppsala, Institute of Physical Chemistry.

ISOTERMAS DE ADSORCION

Un interesante intento para interpretar la formación de cromatogramas en términos de isotermas de adsorción ha sido presentado por Wilson.

Esta isoterma usada para expresar la relación entre adsorbente y adsorbato en equilibrio, ha sido determinada por combinación de sólidos y gases; y sólidos y soluciones (Mc Bain, Freundlich).

Wilson ha supuesto que el equilibrio se alcanza cuando la solución pasa a través de la columna, y que el volumen de los intersticios entre partículas del adsorbente, y los efectos de difusión pueden despreciarse.

En base a éso, elaboró una ecuación diferencial que relaciona la velocidad de la banda con el volumen de solvente pasando a través de la columna. Dicha teoría de Wilson anda bien en el caso del análisis cualitativo, pero al querer aplicarlo cuantitativamente se notan controversias debido a que las condiciones ideales sobre las cuales se basan sus trabajos, rara vez llegan a darse en la práctica.

METODO DIFERENCIAL PARA ISOTERMAS DE ADSORCION (23).

Se agita un peso definido del adsorbente con un volumen conocido de disolución problema; puede ser necesario efectuar un vacío parcial para eliminar el aire de los poros del sólido y garantizar así una impregnación completa.

Tras pasar un breve intervalo, se deja depositar el sólido y analizar el líquido claro; ello da la concentración de equilibrio de la disolución. La cantidad de sustancia adsorbida se calcula a partir de las concentraciones inicial y final, y del volumen empleado.

Isoterma clásica de adsorción:

$$\frac{x}{m} = B \cdot C^{1/n}$$

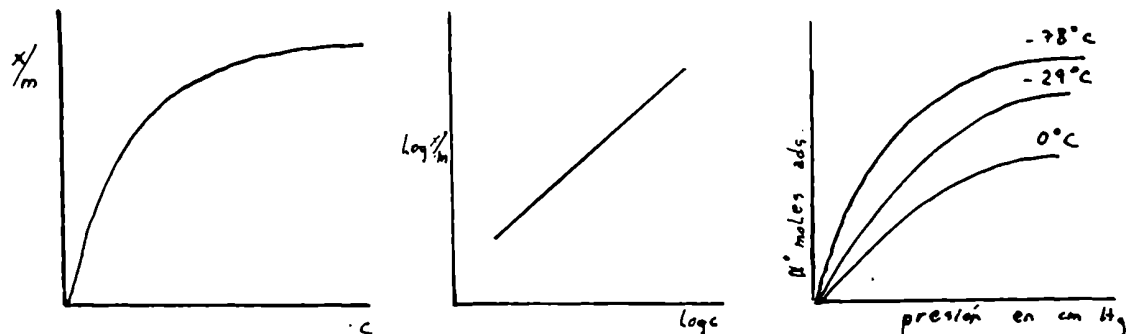
$$\log. \frac{x}{m} = \log B + \frac{1}{n} \log C.$$

C = concentración de equilibrio de la disolución; se aplica en un intervalo considerable de concentraciones.

$\frac{x}{m}$ = cantidad adsorbida por gramo de sustancia adsorbente.

B, n = constantes para el sistema a una determinada temperatura.

El aumento de presión y la disminución de temperatura aumentan la magnitud de adsorción.



La disminución de adsorción con elevación de temperatura implica según el principio de Le Chatelier que en el proceso de adsorción se desprende calor.

Dicho proceso es casi invariablemente reversible y se alcanza un equilibrio definido en un tiempo breve que depende de la concentración de disolución y cantidad de adsorbente.

Efectos que puede ocasionar el adsorbente sobre las sustancias con las cuales tiene íntimo contacto.

Siendo en nuestro caso el adsorbente: gel de sílice, trataremos este caso en particular.

Columna usada: gel de sílice, refrigerada a $3^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$.

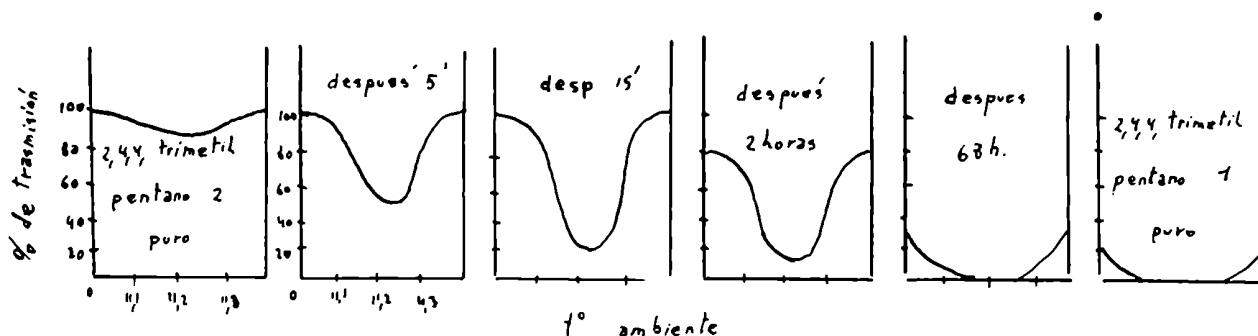
Las causas que determinaron realizar las cromatografías a esta temperatura son fundamentalmente dos:

- 1 - Está experimentalmente comprobado que el poder de adsorción, como ya se dijo, aumenta al disminuir la temperatura por consiguiente para asegurarnos bien se realizan los trabajos a baja temperatura.
- 2 - El poder de isomerización de la sílice sobre los hidrocarburos terpénicos disminuye, y prácticamente se anula a temperaturas inferiores.

Este fenómeno se manifiesta sobre los hidrocarburos en general. Callaway y Murray (24) realizaron trabajos sobre fracciones del cracking de gasolinas, completando sus experiencias con espectro infrarrojo. Investigaron el efecto de la sílice sobre dos olefinas del tipo $RR^1C = CH_2$ y una del tipo $RCH = CRR^1$. Todas estas olefinas se isomerizaban rápidamente a temperatura ambiente.

2-etil-1 exano se isomerizaba casi completamente (90%) cuando pasaba a través de columnas de sílice a 25°C.

La isomerización de olefinas terciarias se producía fácilmente; esta reacción fué seguida por espectro infrarrojo. En la fig. se da un estudio donde la intensidad de la banda característica de cada uno de los isómeros 2,4,4 trimetil pentano se da en función del tiempo de contacto.



Como se ve, la velocidad de isomerización depende del tiempo en contacto con sílice gel, pues en 2 horas, sólo se isomerizaba el 29%.

También se estudió el efecto de temperatura sobre grado de isomerización. Un test registrado fué el siguiente.

Se a regaba 2-etil -1 exano a gel colocada en dos tubos los cuales estaban a -24° y +24° respectivamente por una hora.

El análisis infrarrojo de los hidrocarburos mostró que solo 5% de la olefina a temperatura más baja se ha-

bía isomerizado, en oposición al 65% de la otra a mayor temperatura.

Teniendo estos trabajos como base, y en concordancia con lo sugerido por estos autores, todas las cromatografías que se realizaron en el presente trabajo fueron hechas a $3^{\circ} \pm 0,5$ dado que los terpenos son de fácil isomerización, lo cual nos daría un dato erróneo en análisis de sustancias desconocidas.

METODO DE EXTRACCION DE PRODUCTOS AROMATICOS
DE ORIGEN VEGETAL

1° - Extracción por presión; con 3 variantes (25)

- a) Mediante esponja: el producto aromático se recogerá por presión sobre una esponja, que se prensa cuando está embebida en él.
- b) A la escudilla: se usa un vaso chato de hierro esmaltado cuyo fondo está arizado de púas contra las que se frota la corteza del fruto.
- c) Con prensas a tornillo o hidráulicas.

2° - Extracción por destilación mediante vapor de agua (26)

- a) Destilación por agua: el material está en contacto directo con agua en ebullición; reuniéndose la mezcla de aceite y agua, se usa para pétalos de rosas.
- b) Destilación mediante agua y vapor: el material está colocado dentro del alambique pero separado del agua que hierve; no es tocado por ésta, pero sí atravesado por el vapor.
- c) Destilación por arrastre con vapor de agua: Es el método más rápido y mejor, dando buen rendimiento y calidad de producto.

Cuando este método da bajo rendimiento o el producto sufre alteraciones importantes, se emplea la extracción mediante solventes volátiles.

HIDROCARBUROS TERPÉNICOS-CARACTERÍSTICAS

Los hidrocarburos térpenicos son unos de los constituyentes de los aceites esenciales, tan ampliamente distribuidos en la naturaleza y por consiguiente es ésta su fuente de obtención.

Algunos, como el limoneno, abundan bastante, especialmente en aceites de citrus: naranja, limón, mandarina, bergamota; apio (60 por ciento), alcaravea (40 por ciento).

Baremos a continuación las características de los hidrocarburos más utilizados en el trabajo realizado, como base de experimentos posteriores.

Limoneno: aceite incoloro, agradable olor a naranja; protegiéndolo de la luz y el aire es bastante estable pues sino se oxida fácilmente. Puede ser destilado a presión normal sin descomposición.

Constantes físicas: p.e = 177,6 a presión normal
 $d^{20} = 0,8409$; $n_D^{20,5} = 1,4725$.

Los derivados más utilizados para su identificación son: el tetrabromado y nitrosocloruro de temperatura de fusión 104°, 105° y 114°-115°, respectivamente.

El limoneno ópticamente inactivo, llamado dipenteno se obtiene al calentar o tratar con ácido el dextro o levo-limoneno. En la naturaleza podemos encontrarlo en trementinas de diferentes orígenes, aceite de pino, citronela y otros. Se identifica por su derivado bromado.

Al fraccionar una mezcla de hidrocarburos, el dipenteno tiene p.e. más alto que el limoneno.

Ambos tienen igual aplicación: para la aromaticidad de cosméticos, saber de productos farmacéuticos, etc.

α pineno: forma el constituyente principal de trementina de diferentes orígenes: griega, rusa, española, americana, australiana. Se encuentra además en el limón, coriander, etc.

Constantes físicas. p.e = 156°-157°
 $d = 0,8590$; $n_D^{20} = 1,4658-14663$.

Es aceite incoloro, móvil, que resinifica, por exposición al aire; tiene gran tendencia a isomerizarse bajo la acción del calor, ácidos. La identificación generalmente se hace preparando el nitrosocloruro cuyo punto de fusión: 112°-113°.

β pineno: acompaña al α pineno en las trementinas pero generalmente en menor cantidad. La francesa lo contiene en alta proporción, al igual que otros aceites esenciales: limón, coriander, etc.

Constantes físicas. p.e. = 164°
 $d_{15} = 0,8740$ $n_D^{20} = 1,4872$.

Se utiliza al igual que el α para la preparación de borneol, alcanfor y terpincol. Se puede identificar por derivado tetrapromado de temperatura de fusión: 124°/25°

Careno Δ_3 : Se encuentra en trementinas, aceites de pino alemán.

Constantes físicas. p.e. = 170°
 $n_D^{20} = 1,489$.

Aceite incoloro; para su identificación se hace nitroscleruro de p.f. 101-102 a la reacción de Diels y Alders. No tiene aplicación industrial.

MÉTODOS DE IDENTIFICACION DE HIDROCARBUROS
TERPENICOS

Los más importantes son:

A) Oxidación.

B) Productos de adición:

- 1) Adición de H_2O (hidratación)
- 2) " de Hidrógeno.
- 3) " de Hidrácidas.
- 4) " de Halógenos.
- 5) " de compuestos nitrogenados
 - a) Nitroso halogenuros.
 - b) Nitrosatos.
 - c) Nitrositas.
 - d) Nitrolaminas.
- 6) Adición de anhídrido Maleico.
- 7) " de SO_4H_2
- 8) " de ácido Sulfúrico.

A) hidrocarburos no saturados pueden, bajo ciertas condiciones ser oxidados a la forma de derivados hidroxilados; luego éste puede a su vez pasar por oxidación a aldehído o cetona, y a ácido.

Ejemplo: sabineno, fenantreno, terpineno, Tujeno, canfero, mirceno, careno pueden formar una mezcla de ácidos.

Debido a la insolubilidad de los hidrocarburos en agua, la oxidación se realiza en acetona, siendo uno de los oxidantes más utilizados el MnO_4K , en medio alcalino, neutro o ácido, éste último muy poco usado (27).

El NO_3H también se emplea, pero debe cuidarse prevenir la nitración pues los productos de oxidación pueden contener nitroderivados.

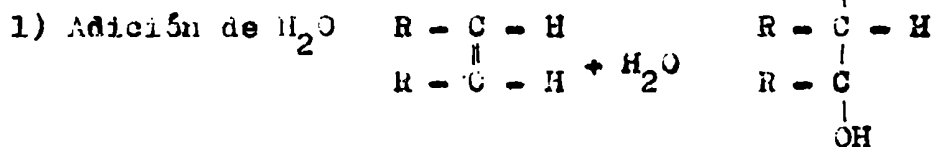
Ejemplo: canfeno (28).

Hidrogenación: Puede ser usado cuando el producto deshidrogenado es un sólido, o cuando los derivados formados son más fáciles de analizar que las sustancias.

Ejemplo: mientras que del isocadineno no pudo obtenerse un derivado cristalino, luego de su hidrogenación pudieron prepararse.

La diferencia en el color, el cual resulta después del uso de varios agentes dehidrogenantes, tal como S y Se, es también de valor en la identificación de compuestos azulenos.

B) Adición



Siendo alcoholes pueden identificarse mediante derivados característicos, tal como uretanos.

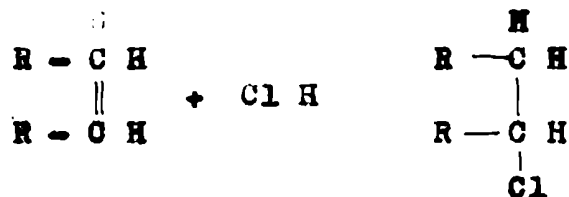
Un ejemplo típico de sustancia conteniendo agua de hidratación es el hidrato de terpina.

2) Hidrogenación: Las condiciones varían grandemente según los casos. Cuando hay un sistema conjugado de doble ligadura, el hidrógeno formado por la reacción de: $\text{Na} + \text{H}_2\text{O}$ puede ser suficiente.

Ejemplo: mirceno.

Pero la mayoría de los casos requiere condiciones más complicadas, bajo efectos catalíticos, Ni, Ni Raley, Pt, Pd, H₂ bajo presión.

3) Adición de Halogenuros.



Reacciones exotérmicas que debe realizarse a baja temperatura. Muchas veces se realizan transformaciones intramoleculares. Ejemplo: pineno y canfeno. Para método de preparación (29).

4) Adición de Halógeno.

Una de las reacciones más utilizadas. De los halógenos, I₂ se usa para determinaciones cuantitativas en compuestos orgánicos (30) Br₂ para reacciones cualitativas, es el más usado. Más adelante se darán, en la parte práctica, detalles técnicos.

El uso de alcohol como solvente es muy utilizado, pues no interfiere; el derivado formado es bastante insoluble en alcohol, el cual es a su vez un buen solvente para impurezas de aceites.

5) Adición de Nitrocompuestos

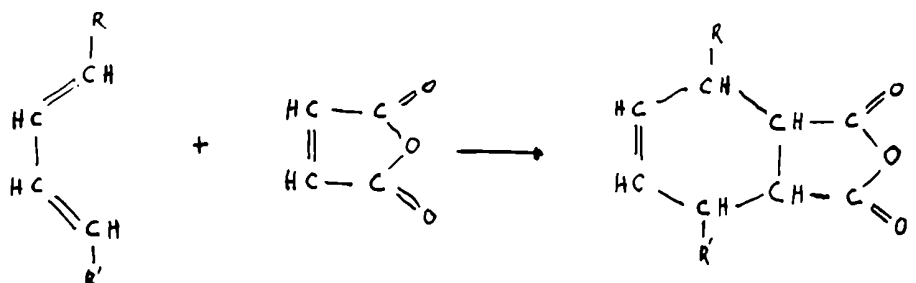
Los nitrosocloruros son los más mencionados en la literatura. Se detallarán después.

El nitrocoloruro parece existir en forma bimolecular; de acuerdo con Simonsen (31) la naturaleza de dicha ligadura entre dos moléculas no ha sido establecida, pero creese que se trata del tipo: puente hidrógeno.

Ejemplo: de sustancias con nitrocoloruro cristalino: limoneno, pineno, dipenteno, silvestreno, careno, fenantreno, fencheno, santano, cadineno, carofileno, terpineol.

6) Adición de anhídrido maleico.

La reacción de adición entre una sustancia conteniendo ligadura etilénica y una sustancia con doble ligadura conjugada recibe el nombre de reacción de Diels y Alders.



Los dos compuestos se combinan sin catalizador, sin solvente y frecuentemente a temperatura ambiente.

7) Adición de ácido sulfúrico: resulta la introducción del grupo SO_3H . Los ácidos sulfónicos, como derivados, son poco usados debido a la formación de mezclas isómeras y otras dificultades que surgen en su preparación.

8) Adición de ácido pícrico.

Muchos hidrocarburos aromáticos pueden fácilmente identificarse por los compuestos de adición formados:

picratos (32).

Métodos de separación e identificación de hidrocarburos terpénicos.

Kirchner (33) ha separado limoneno, α pineno, canfeno, p cimenos en los llamados "chromatostrips" utilizando como soporte ácido silícico. Para revelarlo, la localización de las manchas se efectuaba pulverizando con solución de fluoresceína y exponiendo a vapores de bromo; los hidrocarburos no saturados fijaban rápidamente Br_2 presentándose como manchas amarillas sobre fondos rosado; un método así utilizamos en la práctica para compararlo con resultados obtenidos en columna.

Compuestos muy poco reactivos pueden ser localizados con una mezcla concentrada de ácido nítrico y sulfúrico.

Otros estudios realizados fueron los de Varma sobre análisis de frente de terpenos; análisis de aceites esenciales descritos por Kirchner y Miller quienes también describieron una modificación de la técnica usual de columna(34); ellos mezclaban el adsorbente (ej: ácido silícico) con yeso de París y después de adicionar agua lo vertían rápidamente en un molde conveniente; de este modo obteníase un "chromatobar", columna soporte.

Otro método de análisis es mediante destilación fraccionada, a presión reducida, obteniéndose por separado cada

fracción que pase a distinta temperatura.

Si se destila directamente la esencia, los hidrocarburos terpénicos destilan entre los compuestos más volátiles (antes de 180° a presión normal). A dicha presión pueden provocarse modificaciones que se ponen de manifiesto en la variación del poder rotatorio. Tal fenómeno fué observado en el caso del aceite esencial de salvia solarea (35).

Consideraciones generales sobre adsorbentes y eluyentes.

Silica gel ha sido usada para adsorción de esteroides, ácidos grasos, acetato de azúcares, aminoácidos.

El término silica gel, sílica o ácido silícico se refiere a la sílice hidratada precipitada, cuya composición varía según el método usado para precipitarla.

La relación entre el agua que contiene y el poder de adsorción ha sido estudiada por Trueblood y Malmberg.

El gran poder de adsorción era asociado con el bajo contenido de "agua libre". Cuando todo el "agua estructural" (o sea agua removible por ignición) ha desaparecido, el poder de adsorción cesa casi completamente.

Gel de sílice está clasificado, según Strain, como un adsorbente de gran capacidad.

Ejemplo: carbón activado > sílica gel > franeonita > florindina > alúmina ácida > alúmina básica > Cr_2O_3 > SZn > F_2Oa .

Robinson, por su parte clasifica los adsorbentes se-

gún el mecanismo íntimo de las separaciones.

- 1) Intercambiadores iónicos: resinas sintéticas.
- 2) de partición: agua o nitrometano sobre gel sílice.
- 3) Sustancias activas:

Fuertes: alúmina, carbón.

Medianas: silicatos alcalinos, gel de sílice, óxidos alcalinos, azúcares (sacarosa, almidón).

Débiles: sulfato de Ba, óxidos de estaño, berilio y zinc.

Eluyentes

La purificación de solventes es extremadamente importante en cromatografía pues las impurezas pueden influir marcadamente en el curso del revelado. Todo solvente orgánico antes de usarlo debe ser secado y redistilado.

Fright y Groenings han determinado la siguiente serie eluotrópica en sílica gel (orden creciente de adsorbabilidad del solvente).

Heptano	éster etílico	agua
Diisobutileno	acetato de etilo	acetona
Benceno	alcohol butílico sec.	metanol
Cloruro de isopropilo	alcohol etílico	á. pirúvico

En la práctica, el mayor inconveniente encontrado fué que el solvente tenía hidrocarburos aromáticos, los cuales eran adsorbidos por la sílice, saturándola, y la muestra colocada posteriormente no se adsorbía.

Habiendo reseñado una información teórica sobre aceites esenciales, hidrocarburos terpénicos, teoría de análisis usado, nos adentraremos ahora en la parte práctica, dando todos los detalles seguidos y observados aún en los casos que se ensayó con resultados negativos, pues ésto no fué trabajo perdido ya que sirvió para orientarnos hacia buen camino y alcanzar la meta propuesta desde un principio.



**I - Obtención de muestras de hidrocarburos
terpénicos puros**

En la primera parte del trabajo realizado se obtuvieron hidrocarburos terpénicos puros para poder realizar las experiencias con estos y establecer condiciones óptimas.

1 - Teniendo en nuestro poder α pineno y δ -limoneno, se procedió a destilarlos sobre Na, a presión reducida, para obtenerlos químicamente puros.

Destilación de δ -limoneno: p.e. : 76,5° - 77° a 26 mm.
 n_D^{22} : 1,4728

Destilación de α -pineno: p.e. 40° - 42° a 25 mm.
 n_D^{22} 1,4660.

2 - Para contar con mayor número de terpenos, se trató trementina, de origen inglés con Na metálico; dejó un día en contacto, y al otro día se destiló tal como estaba en el balón, a presión reducida, en una columna de fraccionamiento de las siguientes características:

Columna de vidrio pirex de 51 mm. diámetro externo y 120 cm. de largo; el relleno está constituido por anillos de tubo de vidrio común de 7 mm. diámetro exterior. Como la operación debe ser conducida en forma adiabática, se rodeó dicha columna con una resistencia eléctrica a todo lo largo. La cubierta externa de la envoltura de la columna es un caso de fibrocemento de 75 mm. diámetro interior sobre el cual se

fijaron dos resistencias, controladas exteriormente con reógrafos (c/una disipa de 30 a 300 W).

Características de la trementina: n_D^{18} : 1,4732. = 11,25

Destilación de trementina

Fracción	temp. destilación	Presión	n_D^{18}	
(a)	1	60°	26 mm.	- 11,25°
	2	61,5°	25 mm.	
	3	61,5°	25 mm.	
	4	61,5°	25 mm.	
	5	61,5°	25 mm.	
	6	61,5°	25 mm.	
	7	61,5°	25 mm.	
	8	64	24 mm.	
(b)	9	65°-66°	26 mm.	- 12,70°
	10	65°-66°	26 mm.	
	11	65°-66°	26 mm.	
	12	65°-66°	26 mm.	

Se interrumpió la destilación en este punto

Posteriormente se procedió al reconocimiento de las dos fracciones mayores. Teniendo en cuenta el p.c., n_D y °.

se investigó si el líquido de (a) era B pineno.

Técnica: Oxidación a ácido norpinico.

Se prepara en caliente solución de 7 grs. de MnO_4K , 1,2 g. de OHK y 100 ml. de agua; se deja enfriar. Agregar de una vez 3 g. de B pineno (o fracción problema), se agita y mantiene por debajo de $30^{\circ}C$ durante 5 horas. Se filtra y concentra al tercio; agregar 1,55 g. de sulfato de sodio. El norpinato de potasio cristaliza. Se libera de líquido por succión, disuelve en agua y trata con solución diluida de ácido sulfúrico hasta neutralizar el álcali y extrae el ácido con eter. Se evapora éste y recristaliza de benceno. Agujas. pf. 126-127°.

En la práctica se siguió la técnica antes descripta; al calentar a $30^{\circ}C$, luego de una hora se formó una masa pegajosa con fuerte olor a alcanfor; se siguieron los demás pasos; al filtrar, el líquido que pasó era casi incoloro, con olor a alcanfor pero no mucho. Al extraer, posteriormente con eter y evaporar, aparecieron cristales blancos en forma de agujas.

pf. 117-122°

Se recristalizó de benceno dos veces. 1ra. pf. 122-125°

2da. pf. 125-126°

Por consiguiente quedó confirmado que el líquido de matraz (a) es B pineno.

El rendimiento fué bajo pues en la 1ra. filtración, parte del norpinato de potasio quedó adherido al dióxido de manganeso y es muy difícil de eliminar por lavados, así mismo se observó que dicho dióxido tenía también olor a alcanfor.

Matras (b). Teniendo en cuenta sus características se trató de identificar como careno D⁴.

Se hizo de la siguiente manera: (36)

El hidrocarburo (5 cc.) fué disuelto en acetona pura, seca (50 cc) y a la mezcla, la cual estaba en baño de hielo, se agregó gradual y lentamente 12 g. de MnO_4K finamente dividido. La oxidación lleva aproximadamente 16 horas. Luego el dióxido de Mn era separado, lavado con acetona mezclada con agua, donde la sal del ácido orgánico formado es insoluble y destilado en corriente de vapor para remover algo de acetona adherida e hidrocarburo sin reaccionar.

La solución acuosa de dióxido de manganeso que debía contener la sal de potasio se filtró y el dióxido fué repetidamente extraído con agua caliente hasta que el líquido fuese incoloro, aproximadamente seis veces. El filtrado alcalino, color marrón oscuro se concentró a volumen pequeño; acidificó; trató con eter, secó y evaporó obteniéndose una masa gomosa pero en cantidad muy chica, que no cristalizó por ningún método.

Ante este resultado negativo, se trató de identificar dicho componente como careno D³.

Técnica seguida (37). Con anhídrido maleico en orden de 1 : 1.

Se calienta a reflujo 6 horas: 6,8 g. de careno D³ con 5 g. de anhídrido maleico; la solución obtenida de color marrón amarillento se destila al vacío. Es de consistencia resinosa.

Recogió la fracción que pasó a 195° - presión 10 mm.

Dicha fracción se adicionó a una solución concentrada de OHNa hirviendo y precipitó la sal de sodio que filtróse; era de color amarillento, algo gomosa; se trituró con metanol hasta cristalizarla por completo y que tomara color blanco. Luego secó a 120°; disolvió en poca agua, acidificó con ácido sulfúrico diluido obteniéndose el ácido libre como aceite el cual se trató con eter, evaporó, quedando un aceite viscoso color amarillo, que dejó estacionar 2 días, al cabo de los cuales trituró con acetonitrilo para hacerlo friable. Se obtuvieron cristales blancos; recristalizó de acetonitrilo.

Prismas.

p.f (descomposición) 183°

o sea un grado por debajo del dado en Ber. 71 B (1938) 1163 para el producto de condensación de careno D³ con anhídrido maleico.

Por consiguiente el líquido del matraz (b) es careno D³

3 - Destilación a presión reducida (20 mm. de Hg) aceite de esencial de Molle (obtenido por arrastre con vapor de agua de la oleoresina y suministrado por el Dr. L. Pardo de la Dirección de Bosques del Ministerio de Agricultura).

Se destiló sobre sodio metálico, sin columna de fracción

namiente, 10 ml. de esencia, con el objeto de que pasaran solo los hidrocarburos terpénicos para su posterior cromatografía en columna.

Parte del líquido quedó en las paredes de la alargadera, solidificando, luego ésto nos dió indicio que uno de los componentes era canfeno, único hidrocarburo sólido a temperatura ambiente.

II - Isotermas de adsorción

Una ayuda muy valiosa en los métodos cromatográficos de adsorción, es la determinación de isotermas de adsorción, pues establecidas éstas para varias sustancias y el eluyente se traza una línea desde el punto de la isoterma de este último a la concentración usada, hasta el origen; dicha recta cortará las isotermas de los otros componentes en determinados lugares, indicando así las concentraciones respectivas con que cada uno saldrá de la columna.

Distintos Métodos seguidos - Posibles errores.

En un vasito de precipitados se pesó 1 gr. de $\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, marca Mablincrodt, 90 mallas; agregó con pipeta aforada 5 cc. de la solución cuyo coeficiente de adsorción se quería determinar.

Colocó en un baño de agua y y hielo a 3°C y agitó durante 10 minutos; luego se decantó el líquido a un tubo, tapó

y dejó tomar la temperatura ambiente.

Igual procedimiento se siguió en todos los casos.

Se hizo gráfico N° 1 poniendo índices de refracción en función de concentración del siguiente modo: colocando sobre recta \overline{OA} al n_D del solvente puro; en BC los n_D del tolueno, d-limoneno, α pineno. Uniendo el n_D de solvente con los de éstos se obtienen los valores de los n_D a distintas concentraciones.

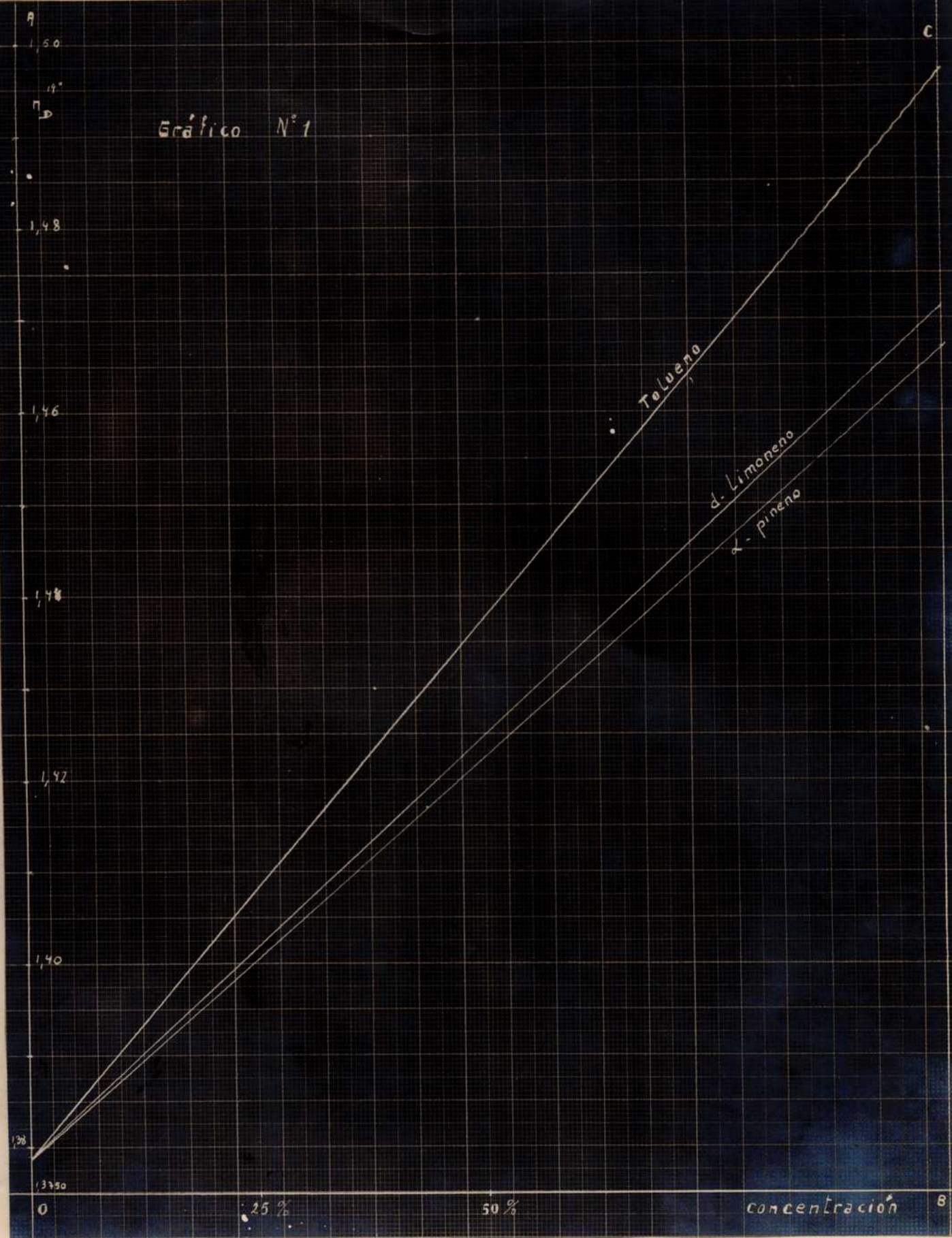
Luego se determinó los n_D después de la adsorción y con la ayuda del gráfico mencionado se conocía la concentración de la solución; así se comprobó que éstos eran casi los mismos, o sea no había prácticamente adsorción.

Se pensó que el error podría estar en haber usado un vaso de precipitados, mucho tiempo de agitación y que ambos factores pudieron haber favorecido la evaporación del solvente alterando la concentración de la solución y dando lugar a que el n_D no disminuyese y hasta en algunos casos llegará a aumentar, como en las soluciones de d-limoneno y tolueno al 5%.

Para evitar esta causa de error se utilizó un matraz aforado de 10 cc. para efectuar la adsorción y agitó 5 minutos. No se obtuvo resultados favorables.

(A) Nuevamente volvióse a efectuar las isotermas pero ahora poniendo especial cuidado en la temperatura; colocando el matraz en baño de hielo y sal, $t^\circ: -1^\circ\text{C}$, con la sílice, y por separado enfriando las soluciones de los distintos compo-

Gráfico N° 1



mentos en solvente N° 7. Agregó 5 cc. de solución a determinar y agitó 8°. Decantó. Dejó tomar la t° ambiente y determinó el n_D .

Se notó que hubo adsorción aunque no mucha.

Como las isotermas utilizadas en el trabajo práctico, después de muchos ensayos, fueron realizados con solvente especialmente nitrado, en la página 52 se darán los valores correctos hallados y cálculos efectuados.

III

A continuación se detallarán los ensayos de orientación a fin de establecer las condiciones óptimas para realizar la cromatografía en columna

Temperatura

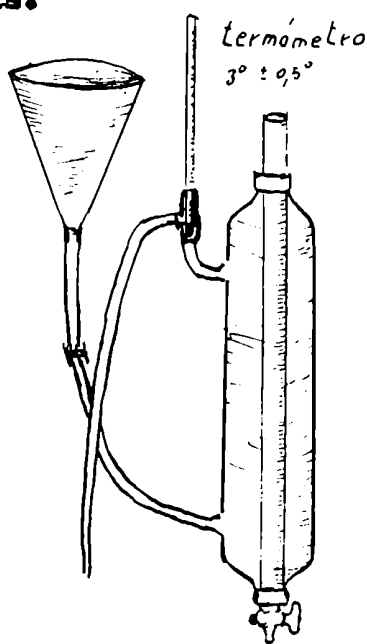
Teniendo ya conocimiento que la temperatura ejercer gran influencia en la adsorción sobre sílice, se estableció como temperatura de trabajo $3^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ tratando no exceder estos límites, especialmente que no subiese pues en ese caso disminuye mucho la adsorción, a la vez que hay peligro de isomerización de los hidrocarburos terpénicos.

Columna

La sílice, al igual que otros adsorbentes, se coloca en la columna en forma de un "slurry", masa empapada. Para ello pesó 10 g. sílice y agregó 20 ml. solvente N° 7 agitando bien

hasta obtener una masa sin grumos; la mezcla se agregó rápidamente en la columna que es de vidrio Pirex, 1x50 cms. Debe tenerse especial cuidado en que el adsorbente no esté nunca seco, sino se producirá como un encogimiento dentro del tubo y la columna será de rendimiento nulo.

No conviene colocar tapón de algodón en la parte superior del adsorbente pues da lugar a la formación de especie de bolsas de la solución debajo del material protector y conduce a formar bandas desiguales en las sustancias adsorbidas.



columna usada.

Cromatografía N° 1-Método general usado

Se preparó la columna en la forma descrita refrigerándola a $3^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ durante 10 minutos; luego agregó la muestra: 2 cc. de mezcla: 15% α pineno y 20% d-limoneno. Cuando las últimas trazas de dicha muestra fueron lavadas con solvente N° 7, se agregó el eluyente: tolueno 25%. Luego se fueron tomando porciones de 0,5 ml. en α /tubo y determinando los respectivos n_D . Cuando el n_D se mantiene constante quiere

decir que está saliendo un componente puro a la concentración establecida según la isoterma.

Cuadro N° 1

Adsorbente: 10 g. SiO_2 Mablincrodt; 90 mallas.

Solvente: N° 7. n_D^{19} : 1,3852.

Mezcla: 2 cc. de: d-limoneno 20%; α pineno 15%.

Eluyente: tolueno 25%. n_D^{19} 1,4230.

t° : $3^\circ \pm 0,5^\circ$ - Velocidad de goteo: 1 tubo c/8 minutos.

tubo	n_D^{19}	t	n_D	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D
1	1,3852	8	1,3852	15	1,3930	22	1,3932	29	1,4222
2	1,3852	9	1,3852	16	1,3932	23	1,3963	30	1,4225
3	1,3852	D	1,3859	17	1,3932	24	1,4041	31	1,4228
4	1,3852	E	1,3865	18	1,3932	25	1,4101	32	1,4230
5	1,3852	F	1,3875	19	1,3932	26	1,4152	33	1,4230
6	1,3852	G	1,3896	20	1,3932	27	1,4180	34	1,4230
7	1,3852	H	1,3918	21	1,3932	28	1,4193	35	1,4230

Observaciones: Al ir agregando el eluyente la columna se volvía algo más translúcida, y esa zona iba avanzando; cuando llegó casi al extremo inferior, apareció la muestra.

Por los valores obtenidos se observa un sólo escalón luego la muestra no se separó.

Ante este resultado negativo trató de encontrar las posibles causas. Hicieronse numerosos ensayos con columnas variando una por una las diferentes condiciones.

- 1 - A distintas concentraciones de eluyente: 20%, 30%, 35%.
- 2 - Activando la sílice al vacío: 0,5 mm. Hg. durante 1 hora sobre OHK, y luego rompiendo el vacío con aire seco (cloruro de calcio); utilizándola inmediatamente.

- 3) Acortando el pico de salida de la bureta para evitar posible mezcla de solución de 2 sustancias distintas que salen una después de la otra.
- 4) Trabajando con SiO_2 de 200 mallas, más superficie de contacto; pero la columna se tapa de tal forma que no pasa el solvente.
- 5) Utilizando como solvente eptano; el método carece de sensibilidad y no pueden separarse los componentes pues el n_D tiene límites de variación muy reducidos.
- 6) Con eter de petróleo fracción $40^\circ\text{-}60^\circ$; resultado negativo.

Presumiendo que la causa pudiese venir del solvente que tuviese impurezas, se hizo el espectro ultravioleta y comprobó que adsorbía en longitud de onda correspondiente a los aromáticos; así mismo trató en un ensayo con mezcla sulfonítrica, dando olor característico a nitrobenzeno.

Al colocar la sílice empapada en el solvente, pudiera ser que adsorbiese los aromáticos y quedase prácticamente saturada por consiguiente la muestra pasaría por la columna sin ser adsorbida.

Técnica para eliminar aromáticos.

1 - Se preparó mezcla sulfonítrica: en proporción 2 moles SO_4H_2 + 1 mol NO_3H como para nitrar 40 ml. de benceno.

Agregó el NO_3H sobre el SO_4H_2 en baño de hielo y luego sobre la mezcla, siempre agitando, poco a poco, un litro de solvente N° 7.

Después calentó a reflujo durante una hora a 50°C; pasó a una ampolla de decantación (separó la mezcla sulfonítrica sin reaccionar); lavó cinco veces con agua; luego con solución de hidróxido de sodio para neutralizar la acidez; otra vez con agua y por último secó con SO_4Na_2 anhidro. Destiló recogiendo la fracción que pasó entre 62°-68°C.

Esta técnica no dió resultado pues quedaba parte de aromáticos sin nitrar, puesto que la solución estaba muy diluída.

2 - Se colocó mezcla sulfonítrica como para nitrar 100 ml. benceno; luego agregó un litro de solvente, y agitó con agitador mecánico durante ocho horas a unos 40°C.

Después se lavó con agua; luego con solución concentrada de SO_4H_2 , donde el nitrobenzeno es muy soluble, y así se lo eliminaba casi completamente; al separar la solución del SO_4H_2 , éste poseía fuerte olor a nitrobenzeno.

Luego lavó con agua; con OHNa diluída; con agua, y después de tratar con SO_4Na_2 anhidro, destiló con columna de fraccionamiento recogiendo la fracción que pasó entre 65°-68°.

De esta manera obtúvose un solvente libre de aromáticos, condición que hallamos fundamental para realizar la adsorción sobre sílice.

Otra cosa que ejerce notable influencia es la velocidad de goteo de la columna, pues al ser muy lenta (las cromatografías anteriores llevaban desde 4 horas algunas hasta 8 horas) se produce el fenómeno de difusión y se se obtienen

separaciones netas.

Para aligerar la columna se aplicó presión en la parte superior de forma que se consiguió una velocidad adecuada.

IV

Condiciones óptimas encontradas para realizar la cromatografía

Sílice: Mallinckrodt e Inhkem: 50% de 90 mallas y 50% de 200 mallas; activada a 0,5 mmg. Hg. durante 1 hora. La columna no debe estar seca en ninguna parte pues sino se agrieta y ya no sirve.

Temperatura: $3^{\circ} \pm 0,5$; puede refrigerarse con H₂O salada.

Solvente: N° 7 previamente nitrado; libra de aromáticos.
 n_D^{19} : 1,3790.

Eluyente: Para muchos casos resulta conveniente el tolueno; si no da separaciones buenas debe probarse con otro que adsorba más fuertemente. No conviene usar soluciones más concentradas del 30%, pues en caso contrario resulta difícil conseguir rápido concentraciones estacionarias.

Velocidad: aproximadamente 0,5 ml. por minuto.

Antes de hacer nuevas cromatografías, se repitieron las isotermas de adsorción notándose que realizándolas a 3°C, con solvente nitrado, se obtenían valores correspondientes a una adsorción conveniente. Se hicieron las isotermas de adsorción para soluciones de tolueno, α pineno y δ -limoneno.

Resultados obtenidos teniendo en cuenta las concentraciones que corresponden a los respectivos n_D según gráfico N° 1.

Tolueno. Técnica de pg. 45 (A) pero a 3°C.

28% { Antes de adsorción: $n_D^{19} = 1,4125$ corresponde a 28%
 después " " : $n_D^{19} = 1,4080$ " " " 24,9%
 adsorción: 3%

En 100 cc. hay 3,1 cc. de adsorción

En 5 cc. $x = 0,152$ cc. " por 1g. SiO_2

15,2 cc. " por 100 g. SiO_2

20% { Antes de adsorción $n_D^{19} = 1,4025$ 20%
 Después " " $n_D^{19} = 1,3985$ 17,3%
 2,7%

en 100 cc. 2,7 cc.

en 5 cc. $x = 0,136$ cc. por 1 g. SiO_2

13,6 cc. por 100 g. SiO_2

10% { Antes de adsorción $n_D^{19} = 1,3905$ 10%
 después " " $n_D^{19} = 1,3891$ 8,3%
 1,7%

en 100 cc. 1,7%

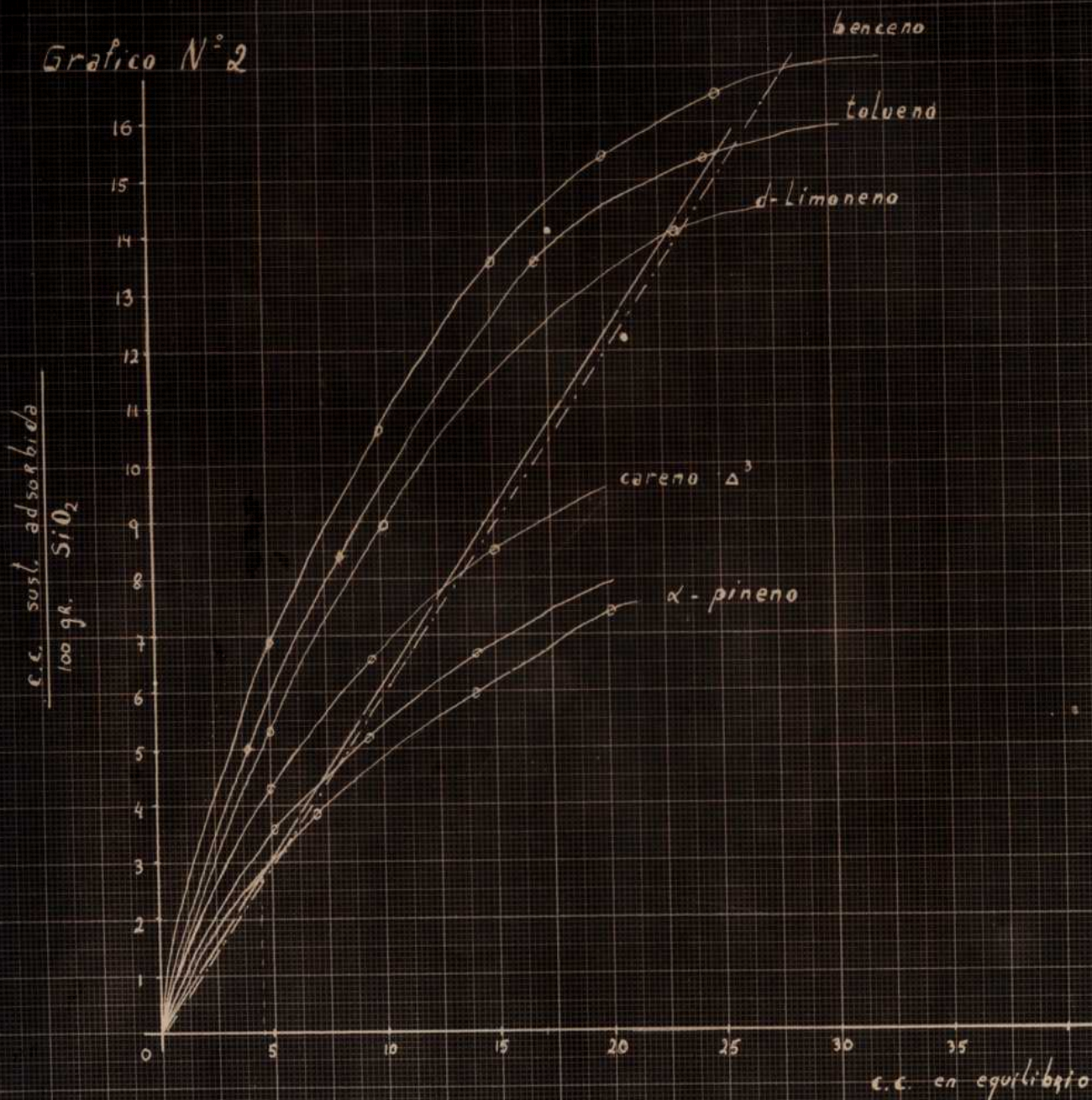
en 5 cc. $x = 0,085$ cc.

8,5 cc. ads. por 100 g. SiO_2

///....

Isotermas de adsorción

Grafico N° 2



5%	Antes de adsorción: n_D^{19} : 1,3846	5%
	Después " " : n_D^{19} : 1,3835	4%
		<hr/>
		1%
	en 100 cc.	1% adsorción
	en 5 cc.	$x = 0,05$ cc.ads. por 1 g. SiO_2
		5 cc. " " 100g. SiO_2

Con estos valores se hace gráfico de isotermas poniendo de la adsorción en función de la concentración en equilibrio que es la que queda después de efectuada la adsorción. Gráfico N° 2.

De igual manera se hicieron las isotermas para el d-limoneno y pineno.

d- limoneno

20%	Variación en la conc. debido a adsor.	2,5%
	adsorción de sust. por 100 g. SiO_2	12,5 cc.
10%	Variac. en la conc.	1,8%
	adsorción de sust. por 100 g.	8,9 cc.
5%	Variación en la conc.	1,1%
	adsorción de sust. por 100 g.	5,5 cc.

α pineno

Variación en la conc.	1,5%
adsorción de sust. por 100 g. SiO_2	7,5 cc.

14%	{	Variación en la conc.	1,2%
		Adsorción de sust. por 100 g.	6 cc.
7%	{	Variación en la conc.	0,7%
		adsorción de sust. por 100 g.	3,8 cc.

V

Ensayos realizados con muestras conocidas

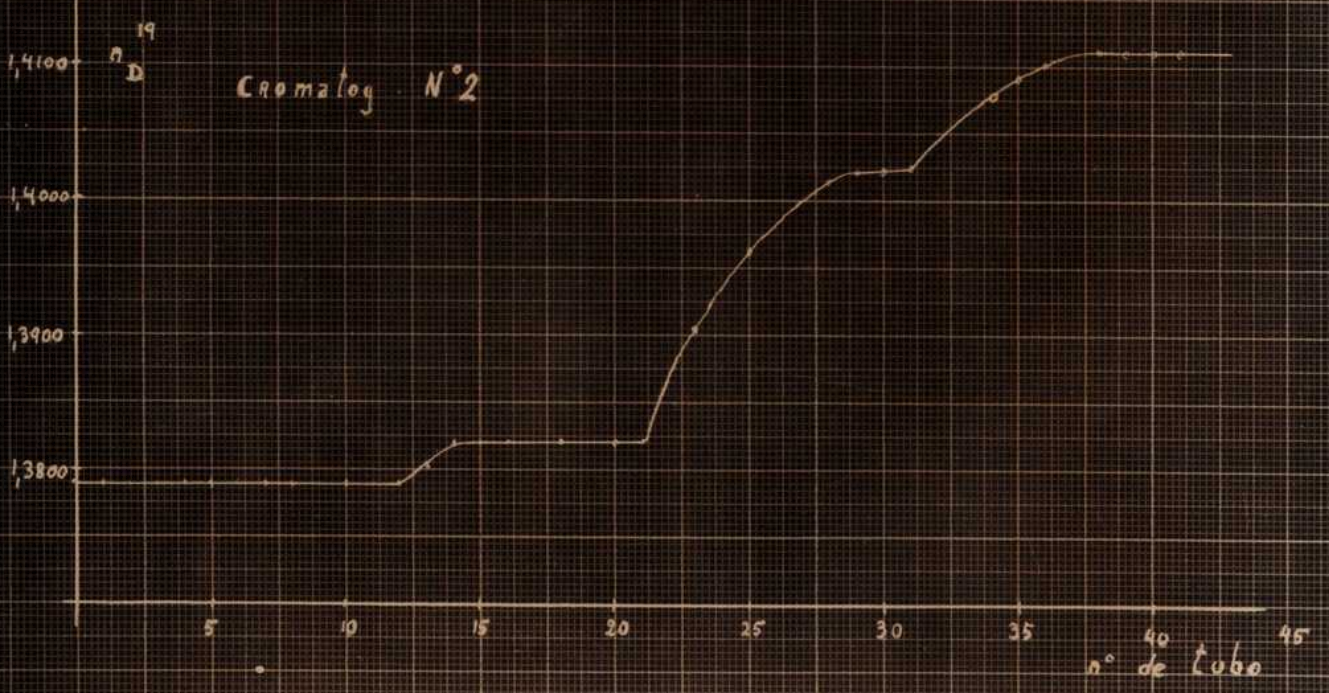
Cromatografía N° 1.

Mezcla: 1 ml. α pineno al 15% y 1 ml. d-limoneno 30%.

Columna: 10 g. SiO_2 de 5 g. 200 mallas y 5 g. 90 mallas

Solvente N° 7 nitrado - Flujo: 25% tolueno; 1 tubo/ minuto.

tubo	n_D^{19}	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D
1	1,3790	9	1,3790	17	1,3822	25	1,3966	33	1,4050
2	1,3790	10	1,3790	18	1,3822	26	1,3988	34	1,4064
3	1,3790	11	1,3790	19	1,3822	27	1,4005	35	1,4080
4	1,3790	12	1,3790	20	1,3822	28	1,4016	36	1,4093
5	1,3790	13	1,3800	21	1,3822	29	1,4025	37	1,4100
8	1,3790	14	1,3813	22	1,3864	30	1,4025	38	1,4105
7	1,3790	15	1,3822	23	1,3904	31	1,4025	39	1,4108
8	1,3790	16	1,3822	24	1,3935	32	1,4025	40	1,4110

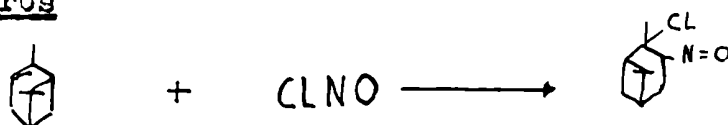


Como se puede observar en el gráfico hay dos escalones bien marcados. Se separaron los tubos correspondientes a éstos; juntó el contenido de aquellos con igual n_d e hicieron derivados.

En general, para la identificación se trató siempre de reconocer por derivados bromados y nitrosocloruros; una vez obtenidos éstos y poseyendo ya un indicio de lo que podía ser, se trató de asegurarse mediante la obtención de otros derivados.

En muchos casos se hicieron varias cromatografías seguidas a fin de obtener suficiente cantidad de sustancia para identificar, pues a menudo es necesario realizar varias recrystalizaciones para obtener productos puros que fundan en el rango de 1°C .

Nitrosocloruros



El nitrosocloruro puede tener la forma isómera de oxima cuando el C sobre el que se fija grupo $-\text{N}=\text{O}$ tiene unido un H.



La reacción tiene lugar por acción del ClNO naciente sobre el terpeno aislado en medio adecuado.

En primer lugar se preparó el reactivo: nitrato de amilo.

Técnica de Ullman.

Una solución concentrada de nitrito de sodio (35 partes en 50 ml. H_2O) o de 43 partes de nitrito de potasio en 25 ml. H_2O se trata con 44 partes de alcohol amílico (54,5ml.) y se enfría a $0^{\circ}C$. Con enérgica agitación se hace gotear en la masa, 43 partes en volumen de ClH , d 1,19 contenidos en una ampolla de decantación, muy despacio, manteniendo la refrigeración de modo que la temperatura no sea mayor de $3^{\circ}C$. Terminada la adición, se continúa agitando durante media hora más. El aceite se lava, seca (ver más abajo) y destila entre $96^{\circ}C$ y $98^{\circ}C$, reuniéndose un aceite amarillo, en colector enfriado con hielo. Rendimiento 52%.

Lavado y conservación del nitrito de amilo.

El aceite se lava con carbonato de sodio al 5% hasta reacción alcalina; se seca sobre carbonato de potasio anhidro y luego destila. Se conserva al abrigo de la luz (en frasco color caramelo) con algunos cristales de tartrato neutro de potasio y en la heladera.

Obtención del nitrosocloruro. Técnica seguida para el α pineno y en todos los casos:

Se mezcló la fracción que contenía el α pineno con 2 ml. de ácido acético; enfrió en la heladera hasta que la masa solidificó.

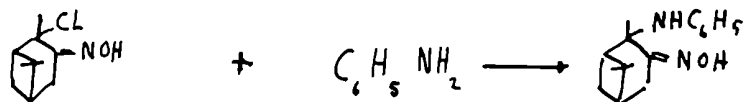
Luego, en baño de hielo y sal se agregó gota a gota agitando, nitrito de amilo en cantidad igual a la de ácido acético; demorar de 10 a 15 minutos la operación esta; no

debe hacerse en forma ligera pues sino luego no cristaliza; se deja 10 minutos en hielo y después agrega agitando y gota a gota ClH concentrado; la solución que era color verde muy pálido, a medida que se agregaba el ClH fué tomando un tono verde más oscuro; color verde esmeralda, y después comenzó otra vez a aclararse; en este momento debe interrumpirse el agregado de ClH pues si se continua, pasa inmediatamente a color amarillo marrón y ya en este medio tan ácido es imposible que precipite el nitrosocloruro, por consiguiente, el proceso del agregado de ClH debe hacerse con sumo cuidado para no arruinar toda la operación.

Se dejó enfriar una hora en hielo y filtró, obteniéndose un precipitado verdoso, algo gomoso y muy impuro. Se recristalizó disolviendo el precipitado en poco volumen de cloroformo frío, mínima cantidad, y reprecipitarlo con algunas gotas de metanol.

Nitrosocloruro de α pineno. 1ra. recristal. p.f. 108° - 112°
 segunda " p.f. 110° - 112°
 tercera " p.f. 112° - 113°
 (Wallack)

Se hizo la nitrosamina correspondiente al α pineno.



Método de Mallack

Se cubrió con alcohol el nitrosocloruro y luego agregó anilina recién destilada en relación de 2 moles a uno de nitrosocloruro, calentando suavemente hasta que se disolvió la mezcla.

Enfrió con hielo, raspando las paredes hasta que precipitó (aproximadamente 5 minutos).

El producto se disolvió en pequeño volumen de ácido acético, diluyó con agua y reprecipitó con amoníaco. La completa cristalización llevó 1 día. Cristales blancos.

Nitrolamina de α pineno p.f. 100° - 101°

Reconocimiento de d-limoneno

Derivado tetrabromado - Técnica de Godlevski

La solución de terpeno se mezcló con partes iguales de alcohol amílico y eter etílico; luego colocó en mezcla frigorífica y agregó gota a gota solución de bromo en eter etílico; al principio se nota como el bromo es adsorbido fácilmente pues enseguida queda otra vez incolora. Se continúa agregando hasta que persiste el tono rojizo; se dejó evaporar el eter lentamente; ésto es muy importante para obtener una buena cristalización; tardó en cristalizar 5 horas; filtró y re-cristalizó el precipitado algo amarillo, de acetato de etilo. pptdo. blanco muy cristalino p.f. 103° - 104° (Guenther)

Se hizo una segunda cromatografía con igual mezcla pero poniendo 1 ml. α pineno al 20% y 1 ml. d-limoneno al 20%

Los escalones salieron a igual altura, el correspondiente al α pineno algo mayor pues es más concentrada y el del limoneno algo menor, pues está en menor cantidad. Cromatografía 2.

Luego de observar que el método iba bien para estos componentes se hicieron mezclas de 3 y 4 sustancias.

A continuación detallaremos 2 de las cromatografías efectuadas.

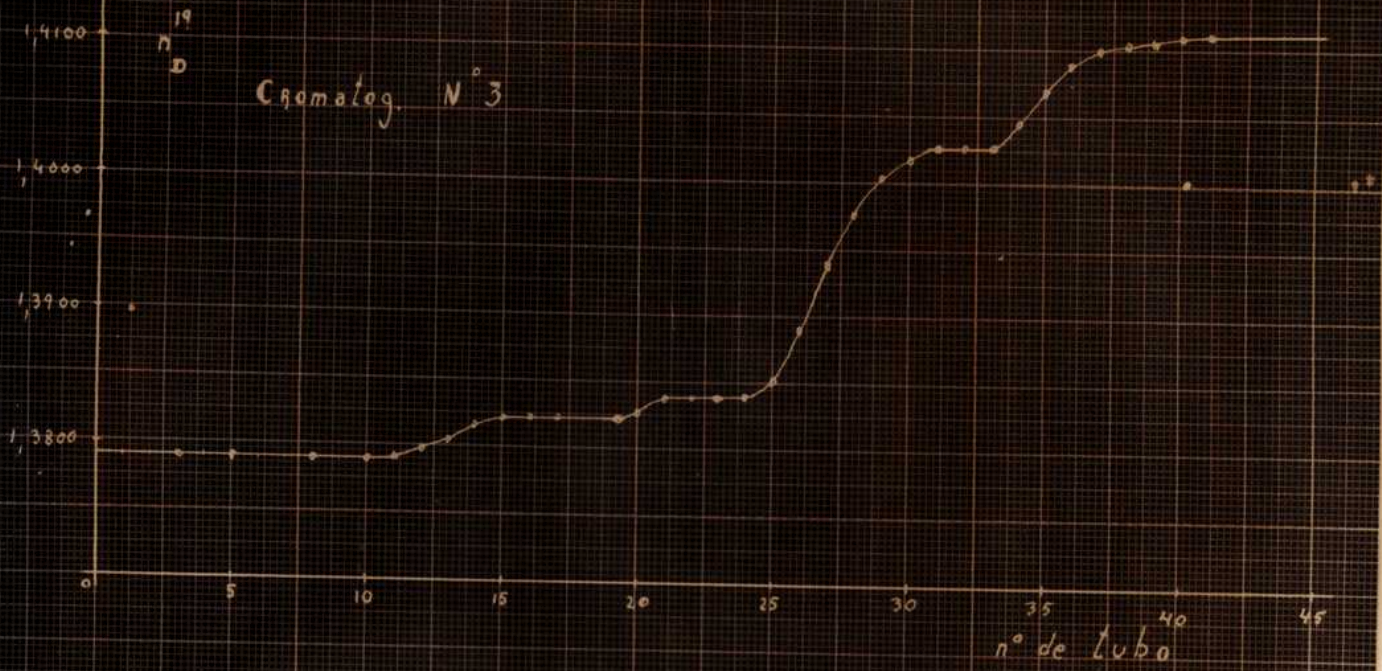
Cromatografía N° 3

Mezcla: α pineno: 0,15 ml; β pineno 0,2 ml; δ -limoneno 0,35 ml.

Columna: 13 g. SiO_2 de: 7 g. 200 mallas y 6 g. 90 mallas.

Solvente N° 7 nitrado - Fluyente: 25% tolueno; 1 tubo/minuto.

tubo	$n_D^{19^\circ}$	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D
1	1,3790	10	1,3790	19	1,3822	28	1,3975	37	1,4098
2	1,3790	11	1,3790	20	1,3833	29	1,4005	38	1,4103
3	1,3790	12	1,3798	21	1,3838	30	1,4016	39	1,4105
4	1,3790	13	1,3805	22	1,3838	31	1,4025	40	1,4108
5	1,3790	14	1,3814	23	1,3838	32	1,4026	41	1,4111
6	1,3790	15	1,3820	24	1,3840	33	1,4026	42	1,4112
7	1,3790	16	1,3822	25	1,3850	34	1,4044	43	1,4112
8	1,3790	17	1,3822	26	1,3890	35	1,4069	44	1,4112
9	1,3790	18	1,3822	27	1,3935	36	1,4088	45	1,4112



Se observan 3 escalones perfectamente determinados.

El segundo escalón corresponde al B pineno, quien se identificó mediante el derivado nitrosita.

Técnica de nitrosita de B pineno:



Se disolvió la fracción en 5 ml. de eter de petróleo al mismo tiempo preparó solución de 2,5 g. de nitrito de sodio en 4 ml. de agua. Cuidadosamente se agregó la segunda solución sobre la primera y agregó luego gradualmente 2,5 ml. de ácido acético glacal con agitación. Se formó después de 5 minutos un precipitado cristalino, amarillento que lavó con agua y luego con alcohol metílico. Recristalizó disolviendo en cloroformo y reprecipitando con alcohol metílico crist. amarillos.

nitrosita de B pineno (recristaliz.) $124^{\circ} - 125^{\circ}$

Cromatografía N° 4

mezcla: α pineno 0,1 ml; B pineno 0,2 ml; careno Δ_3 0,25ml;

columna: 15 g. SiO_2 de 7 g; 200 mallas y 6 g. 90 mallas

solvente nitrodo N° 7;uyente: 25% tolueno n_d^{15} 1,4112;

1 tubo/minuto.

///.....

tubo	n_D^{19}	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D
1	1,3790	10	1,3795	19	1,3838	28	1,3960	37	1,4083
2	1,3790	11	1,3805	20	1,3838	29	1,3993	38	1,4095
3	1,3790	12	1,3816	21	1,3858	30	1,4012	39	1,4103
4	1,3790	13	1,3825	22	1,3878	31	1,4023	40	1,4106
5	1,3790	14	1,3825	23	1,3895	32	1,4025	41	1,4110
6	1,3790	15	1,3825	24	1,3900	33	1,4025	42	1,4112
7	1,3790	16	1,3827	25	1,3900	34	1,4027	43	1,4112
8	1,3790	17	1,3836	26	1,3900	35	1,4042	44	1,4112
9	1,3790	18	1,3838	27	1,3930	36	1,4062	45	1,4112

Se obtuvieron 4 escalones bien determinados; hicieronse 3 cromatografías para obtener cantidades suficientes de cada componente e identificarlos.

El α pineno; B pineno y d-limoneno se identificaron fácilmente por los métodos ya expuestos.

Del careno A_3 se preparó derivado bromado y nitrosocloruro. El derivado bromado dió resultado negativo, no cristalizó. Se siguió la técnica del nitrosocloruro para careno A_3

Disolvió la fracción tercera en 2 ml. ácido acético; dejó solidificar en hielo; agregó nitrito de amilo 2 ml. gota a gota demorando 15 minutos; luego dejó en frío 15 minutos; agregó ClH muy despacio también gota a gota, agitando continuamente; tomó primero coloración verde oscura y después de

agregar 0,4 ml. de ClH pasó rápidamente a color amarillo verdoso; suspendió el agregado, agitando y rascando las paredes para favorecer la cristalización; se produjo abundante desprendimiento de burbujas; después de 15 minutos la solución se enturbió apareciendo los primeros cristales; dejó en hielo 24 horas; filtró: pptdo. verdoso, amorfo, que inmediatamente después de filtrado se disolvió en cloroformo y precipitó con metanol; cristales blancos.

Nitrosocloruro de careno Δ_3 p.f. 100° - 101°
(con descomposición)
tomo color marrón oscuro.-

Se preparó la nitrolanilina por técnica de Wallack pág. 58.

Demoró en precipitar 10 horas. Cristales blanco algo amarillos, recristalizados de ácido acético por agregado de amonía.

Nitrolanilina de careno Δ_3 p.f. 141° - 142°.

VI

Análisis de Trementina (origen inglés).

Esta trementina se trató previamente con Na metálico y destiló. Anteriormente se había destilado columna de fraccionamiento obteniéndose 2 componentes reconocidos como B pineno y careno Δ_3 pág. .

Cromatografía N° 5

Sustancia: 0,8 ml. de trementina n_D^{19} 14715

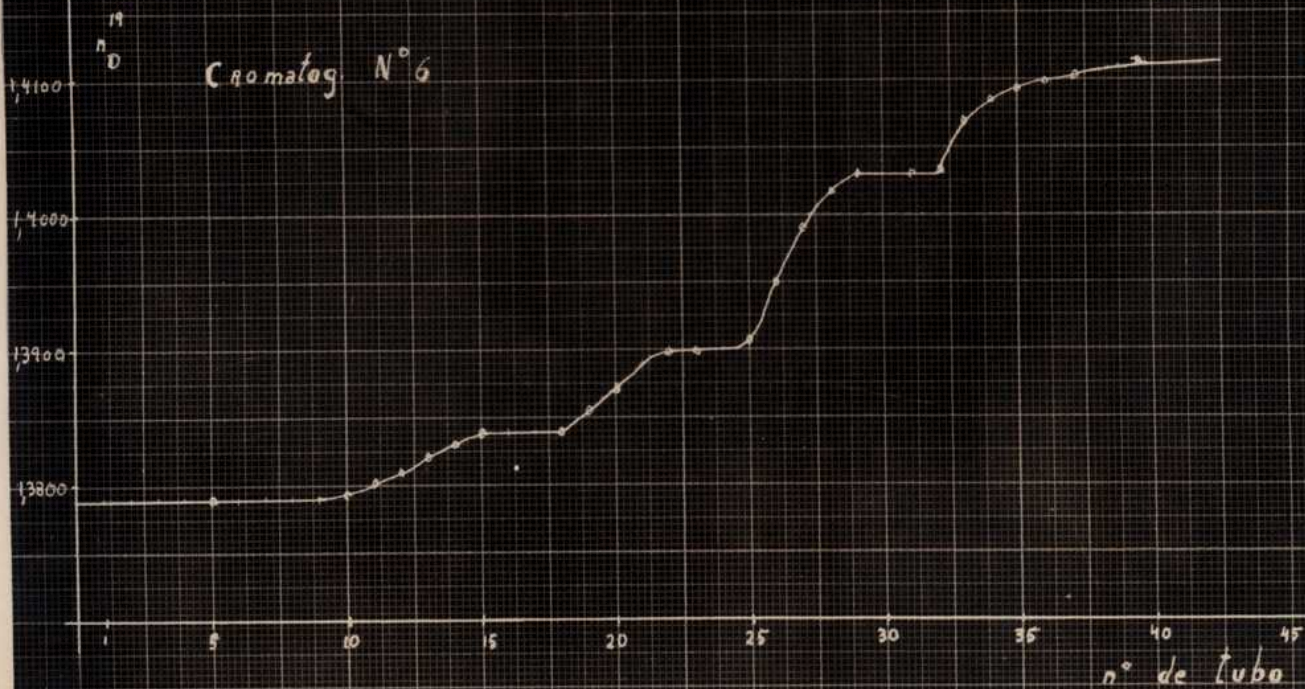
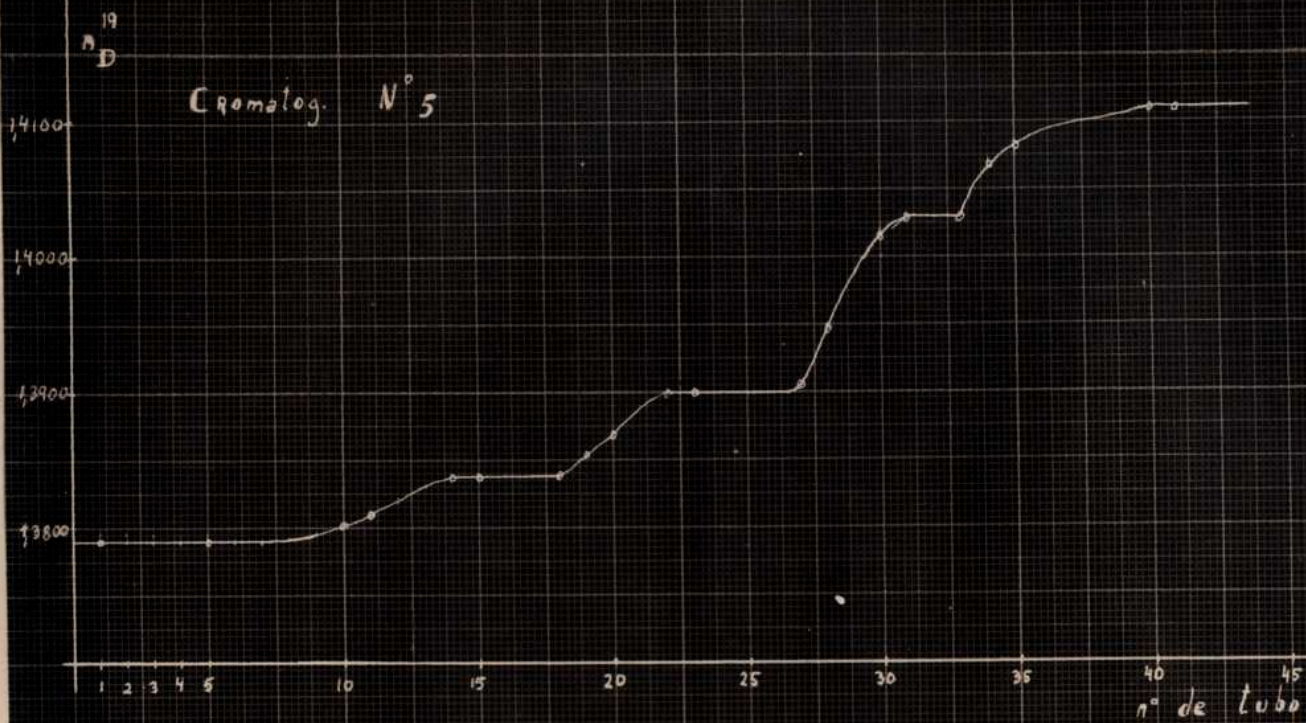
Columna: 13 g. SiO_2 de 7 g. - 200 mallas y 6 g. 90 mallas.

Solvente nitrado N° 7. Eluyente: 25% tolueno; 1 tubo/minuto.

tubo	n_D^{19}	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D	t.	n_D
1	1,3790	10	1,3802	19	1,3855	28	1,3950	37	1,4097
2	1,3790	11	1,3810	20	1,3870	29	1,3992	38	1,4100
3	1,3790	12	1,3822	21	1,3888	30	1,4017	39	1,4105
4	1,3790	13	1,3830	22	1,3900	31	1,4029	40	1,4108
5	1,3790	14	1,3838	23	1,3900	32	1,4030	41	1,4110
6	1,3790	15	1,3838	24	1,3900	33	1,4030	42	1,4112
7	1,3790	16	1,3838	25	1,3900	34	1,4069	43	1,4112
8	1,3790	17	1,3838	26	1,3900	35	1,4083	44	1,4112
9	1,3795	18	1,3830	27	1,3905	36	1,4092	45	1,4112

De los tres escalones obtenidos se sabía que el primero y segundo corresponden según los análisis hechos antes a B pineno y careno A_3 . Confirmó otra vez por derivados y trató de analizar la tercera fracción.

Como había muy poca cantidad, se hizo solo el nitroso cloruro; siguió la técnica corriente pág. 56, obteniéndose unos pocos cristales blancos recristalizados una sola vez p.f. 112° - 114°.



Para poder enriquecer la trementina en esta fracción se destiló a presión reducida, 20 mm. Hg. una parte y separó lo que quedó en el balón, que debía tener mayor cantidad de este componente tercero pues de acuerdo a su adsorción (parecida al limoneno) debe tener p.e. más alto.

El índice de refracción era: n_D^{19} 1,4726.

Se hizo otra cromatografía en columna, en iguales condiciones que la anterior obteniéndose un alargamiento en el tercer escalón, como habíamos previsto. Obsérvese gráfico de Cromatografía nº 6.

Con los productos de dos cromatografías se hicieron derivados bromados y nitrosocloruro.

Nitrosocloruro: recristalizado 2 veces p.f. 114°-115° correspondiente a δ -limoneno o al dipenteno. En el gráfico se observa que el n_D es algo mayor al calculado por la concentración de δ -limoneno.

Derivado tetrabromado: recristalizado 3 veces p.f. 124°-125° cristales blancos.

El p.f. corresponde al dipenteno, por consiguiente, tras confirmar otra vez los resultados obtenidos llegamos a establecer que la trementina tiene una pequeña cantidad de dipenteno.

Posteriormente se realizó cromatografía en placa pg. de esta separación obteniéndose en todos los casos una sola mancha luego los compuestos separados estaban puros. Además se comprobó que el Rf. del dipenteno es prácticamente igual al

del α -limoneno mientras que en columna se logra una pequeña variación del n_D .

D

VII

Esencia de Molle.

Como ya se dijo en pág. 43, se destiló la esencia de Molle y por las características de esta destilación se supuso que la esencia contenía canfeno, único hidrocarburo sólido a temperatura ambiente.

Cromatografía N° 7

Sustancia: 1 ml. esencia de molle. $n_D^{18^\circ} = 1,4801$

Columna: 16 g. SiO_2 de 8 g. 200 mallas y 8 g. 90 mallas.

Solvente nitrado. Eluyente: 25% tolueno $n_D^{19} = 1,4112$. 1 tubo por minuto.

tubo	n_D^{19}	t	n_D	t	n_D	t	n_D	t	n_D
1	1,3790	11	1,3795	21	1,3837	31	1,4012	41	1,4106
2	1,3790	12	1,3805	22	1,3848	32	1,4025	42	1,4110
3	1,3790	13	1,3810	23	1,3860	33	1,4035	43	1,4112
4	1,3790	14	1,3820	24	1,3872	34	1,4050	44	1,4112
5	1,3790	15	1,3822	25	1,3891	35	1,4070	45	1,4112
6	1,3790	16	1,3823	26	1,3912	36	1,4085	46	1,4112
7	1,3790	17	1,3823	27	1,3935	37	1,4085	47	1,4112
8	1,3790	18	1,3823	28	1,3960	38	1,4085	48	1,4112
9	1,3790	19	1,3823	29	1,3978	39	1,4098	49	1,4112
10	1,3790	20	1,3825	30	1,3946	40	1,4102	50	1,4112

De acuerdo con los resultados obtenidos y confirmados aparecen 2 escalones y una subida lenta que hace suponer existe un tercer componente que no logra establecer concentración estacionaria. Así mismo se observa que según el n_D , el primer escalón parece corresponder al α pineno; se hizo otra cromatografía con la esencia y 0,2 ml. de α pineno obteniéndose un alargamiento del primer escalón luego esto casi configura que se trata de α pineno.

Se certificó haciendo el nitrosocloruro; pptdo. blanco después de recristalizar dos veces p.f.: 112°-113° (Wallach)

Luego la esencia contiene α pineno.

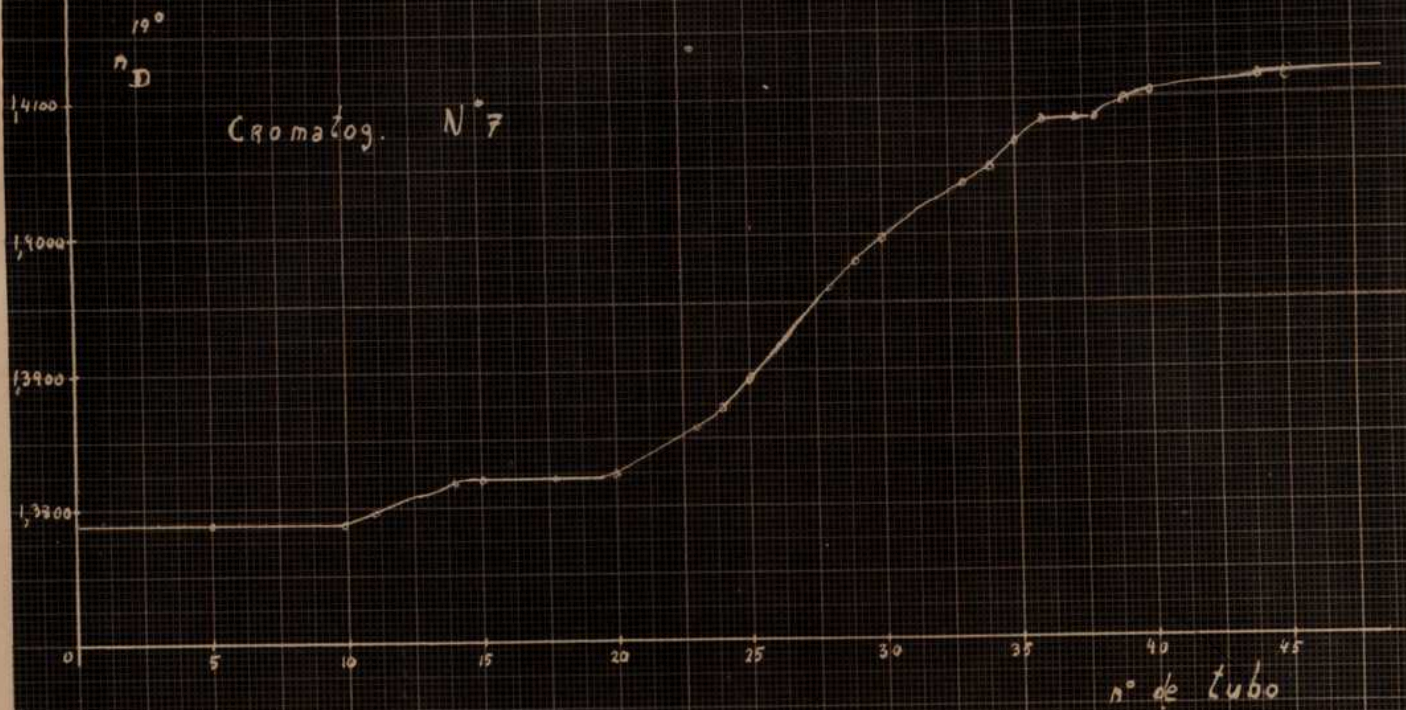
Con las porciones de solución correspondientes al segundo escalón perteneciente a varias cromatografías se trató de identificar por canfeno.

Técnica segunda: oxidación a isoborneol.

Se calentó 10 partes de la fracción durante 2 a 3 horas a 50°-60° con 25 partes de ácido glacial y una parte de SO_4H_2 al 50%, agitando frecuentemente. La mezcla al principio tenía 2 fases pero después de 30 minutos se homogeneizó tomando primero color rosado que pasó luego a rojizo oscuro.

Al cabo de 3 horas se agregó agua; lavó repetidas veces con agua y saponificó al acetato calentando con una solución de 5 g. de OHK en 25 g. de alcohol.

Para separar el alcohol se agregó lentamente el aceite a 10 ml. de H_2O helada. Primero se formó una masa gomosa que trabajándola en baño de hielo fué poco a poco volviéndose friable en forma de masa blanca amarillenta finamente dividida.



Como estaba impuro se recristalizó de eter de petróleo.

Determinación de p.f. cristales blancos. p.f. 212^oC

Se hizo cromatografía en placas de la esencia (la técnica se da en pg. 69) apareciendo 3 manchas.

Ante este resultado se trató de buscar un eluyente que estableciese más fácil una concentración estacionaria.

El acetato de etilo fué rechazado pues se adsorbe demasiado fuerte y en ese caso el α pineno corre con el frente como en un análisis por elusión.

De acuerdo con lo recomendado por Glasse, Harris y Bope en su trabajo realizado en la Universidad de Columbus, Ohio, se buscó eluyente con coeficiente de adsorción intermedio entre tolueno y acetato de etilo, hallándose las condiciones óptimas para benceno al 28%, obteniéndose 3 escalones perfectamente definidos.

Cromatografía N° 8

Sustancia: 1 ml. de esencia.

Columna: 16 g. SiO₂ de: 8 g. 200 mallas y 8 g. 90 mallas.

Solvente nitrado N° 7 - Eluyente: benceno 28% n_D^{19°} 1,4165

1 tubo/minuto.

///....

tubo	n_D^{20}	t	n_D	t	n_D	t	n_D	t	n_D
1	1,3790	10	1,3814	19	1,3815	28	1,4068	37	1,4145
2	1,3790	11	1,3828	20	1,3950	29	1,4087	38	1,4153
3	1,3790	12	1,3830	21	1,3986	30	1,4098	39	1,4155
4	1,3790	13	1,3830	22	1,4008	31	1,4100	40	1,4160
5	1,3790	14	1,3830	23	1,4038	32	1,4100	41	1,4160
6	1,3790	15	1,3830	24	1,4057	33	1,4100	42	1,4160
7	1,3790	16	1,3830	25	1,4058	34	1,4106	43	1,4160
8	1,3790	17	1,3830	26	1,4058	35	1,4120	44	1,4160
9	1,3790	18	1,3871	27	1,4068	36	1,4137	45	1,4160

Falta por identificar el tercer componente.

Para ello se hizo, según las técnicas corrientes el derivado tetrabromado, nitrosocloruro y cromatotrips don de apareció una sola mancha.

Resultados: Con el derivado bromado no se obtuvo precipitado cristalino sino una goma que no pudo volverse friable.

El primer intento del nitrosocloruro no dió precipitado pues se agregó demasiado ClH. Se repitió por segunda vez agregando menos cantidad y con especial cuidado.

El nitrosocloruro demoró 1 día en cristalizar. El precipitado debió recrystalizárselo 3 veces hasta obtenerlo puro.

Nitrosocloruro - cristales blancos p.f. 93° - 94°.

De acuerdo con Guenther, pertenece al derivado del cadineno, hidrocarburo muy abundante

Se confirmó mediante la reacción característica de color:

Disolviendo cadineno en exceso de Cl_3CH ; agregando unas gotas de SO_4H_2 concentrado y agitando el tubo; la solución fué primero verde intenso, luego azul y por calentamiento rojo.

También se hizo el nitrosato. Técnica de Wallach.

Se calentó una solución de volúmenes iguales de terpeno y nitrito de amilo con 0,5 volúmenes de ácido acético glacial y 1 volumen de NO_3H agitando. Después se agregó lentamente alcohol; se observó la formación de un aceite amarillo que demoró 2 días en cristalizar manteniéndolo en refrigerador a muy baja temperatura y trabajándolo cada tanto.

Se obtuvieron cristales amarillos, recristalizados de acetato de etilo p.f. 105° - 107°C.

Llegamos a la conclusión que los hidrocarburos de la esencia de Molle son: α pineno, cadineno y canfeno.

VIII

Método de cromatografía en placas

Para comparar la sensibilidad del método de cromatogra-

fía en columna con la de placa, a los efectos de detectar el número de hidrocarburos presentes en una muestra, se prepararan estas últimas.

Preparación de placa adsorbente.

1) Placa de vidrio de 3 mm. de espesor aproximadamente. El tamaño es de 20 cm. x 11 cm. Cada placa usada debe ser antes contrastada en su largo y ancho con un palmer para asegurar espesor uniforme de modo que también lo sea la placa adsorbente.

2) La mezcla adsorbente se prepara así:

30 gr. de á. sílico, tamizado por tamiz de 200 mallas, o sea granos uniformes de 74 micrones como tamaño máximo, se mezclan con 3 g. de almidón molido a polvo fino, éste actúa como material ligante. Se agrega a la mezcla 60 ml. de agua. Preparada la suspensión se lleva a baño maría a 35°C, agitando continuamente. En poco tiempo se nota que la mezcla comienza a espesarse (aproximadamente 2') desaparecen los grumos y toma consistencia gelatinosa.

Siempre agitando se retira del baño y deja enfriar, la masa espesa más; al estar ya completamente fría se agrega 10 ml. de agua y homogeiniza bien la pasta hasta notarla sin asperezas ni pequeños grumos.

La placa bien limpia y seca, se coloca entre dos bandas de vidrio elevadas 0,5 mm. sobre el nivel de la placa central. La mezcla adsorbente se extiende rápidamente sobre la placa y luego usando las bandas como soporte se pasa una

regla metálica limpia y seca; la placa debe quedar recubierta con una capa de 0,5 mm. de mezcla. La operación debe hacerse en forma rápida pues sino dicha mezcla se espesa irregularmente.

Otra precaución es, antes de extender la mezcla, verterla en otro vaso de precipitados limpio, para eliminar pequeños grumos adheridos a las paredes del vaso donde se realiza el empaste.

3) Se lleva la placa a estufa a 110° y deja 30 minutos.

4) Aun caliente se somete al vacío de 0,5 mm. a 1 mm. de Hg. sobre OHK durante 1 hora. Después de romper el vacío con aire seco y sin pérdida de tiempo se procede a colocar las sustancias.

Luego de esto se introduce la placa en la cuba cromatográfica saturada con vapores del solvente; cuando el frente ha recorrido 15 cm. se retira la placa y deja secar al aire. El desarrollo tarda 90°.

Para revelar la posición de los hidrocarburos se pulveriza primero con solución de fluoresceína y luego somete a los vapores de bromo.

Se forma un fondo rosado de bromofluoresceína y donde están los hidrocarburos se notan manchas amarillas pues el bromo se fija sobre las dobles ligaduras.

Se hicieron distintos ensayos.

1) Poniendo como solvente eptano.

sustans: 100 γ trementina, 100 γ limoneno,
100 γ e. de Molle.

Al revelar se vió que no habían corrido nada.

2) Solvente: eter de petróleo 60°-70° con 15%
acetato de etilo.

sust.: 100 γ trementina, 100 γ limoneno, 100 γ
e. de Molle.

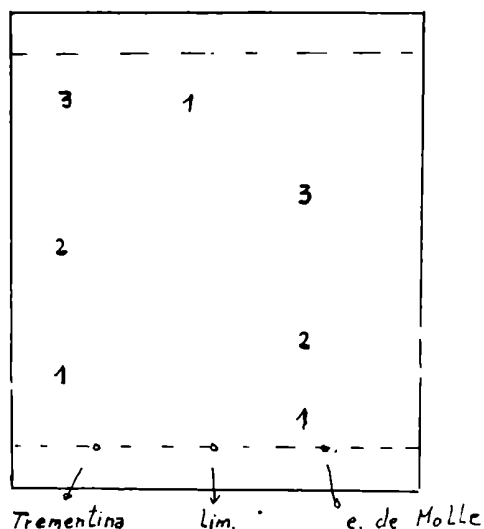
Las sustancias habían corrido con el frente.

3) Se encontró, después de hacer varios ensayos
sobre cromatogrips que la concentración adecuada era:

eter de petróleo 60°-70° con 3% de acetato de
etilo.

sust.: 100 γ trementina; 100 γ limoneno; 100 γ
e. de Molle.

Aspecto de la placa después de revelada.



$$Rf_1 = \frac{1}{15,3} = 0,065$$

Trementina $Rf_2 = \frac{6}{15,3} = 0,39$

$$Rf_3 = \frac{14,1}{15,3} = 0,92 \quad \text{Limoneno} \quad Rf = \frac{14,2}{15,3} = 0,92$$

$$Rf_1 = \frac{0,5}{15,3} = 0,032$$

E.de Molle $Rf_2 = \frac{3,7}{15,3} = 0,24$

$$Rf_3 = \frac{10,7}{15,3} = 0,69$$

IX

Comparación con cromatografía en columna.

En los dos casos: esencia de Molle y trementina, los dos métodos detectaron igual número de componentes.

En la trementina, uno de los componentes tenía igual Rf . que el limoneno, pudiendo suponerse que se trataba de éste; por el método en columna, y ésta es la ventaja, pueden hacerse con cada fracción derivados característicos y gracias a éstos comprobar que se trataba de dipenteno.

Si bien es cierto que con la columna, en muchos casos, según la clase de resencia debe buscarse la concentración y eluyente que permite obtener escalones netos, en las placas también es necesario buscar el solvente justo que de un revelado fácil de interpretar y determinar Rf.

En ambos casos, y al igual que con otros métodos de identificación analítica, como es el corriente de destilación fraccionada, lo ideal sería contar con una escala patrón de muchas sustancias, que a una concentración y eluyente determinados indique los índices de refracción o Rf característicos respectivamente. Así mismo, poseyendo componentes puros, pueden agregarse a la muestra desconocida, ver si un determinado escalón se alarga, verificando la igualdad y naturaleza de ambos.-

CONCLUSIONES

La ventaja encontrada en el método en columna es que aun con un eluyente distinto siempre se brinda la oportunidad de separar los componentes y posteriormente identificarlos mediante distintos derivados de pf. bien determinado.

Cabe pues, agregar, a los métodos cromatográficos ya conocidos, éste nuevo de separación e identificación de hidrocarburos terpénicos evitando cualquier isomerización de los mismos, a la vez que se trabaja con cantidades mínimas, y ampliando así, un poco más los límites que abarca el análisis de los distintos componentes existentes en aceites esenciales y tan abundantes en nuestro país.

CROMATOGRAFIA GASEOSA

Gracias a la colaboración del Doctor M.A. Arber pudimos completar nuestro trabajo mediante la realización de cromatografía gaseosa, siendo este método uno de los mayores avances realizados en los últimos años.

Se usa el término "cromatografía gaseosa para aquellas técnicas en las cuales la tradicional fase líquida es reemplazada por un gas. Las separaciones que son efectuadas, por este método dependen de la repetida distribución de las sustancias a ser separadas entre el gas y la fase fija empaquetada en la columna. La fase fija puede ser un adsorbente (cromatografía de adsorción) o un adsorbente líquido con un material soporte inerte (gas-líquido, cromatografía de partición).

Las sustancias a ser separadas se moverán a través de la columna en una corriente gaseosa y la mayor parte a temperatura inferior a su temperatura crítica así que ellas son técnicamente vapores.

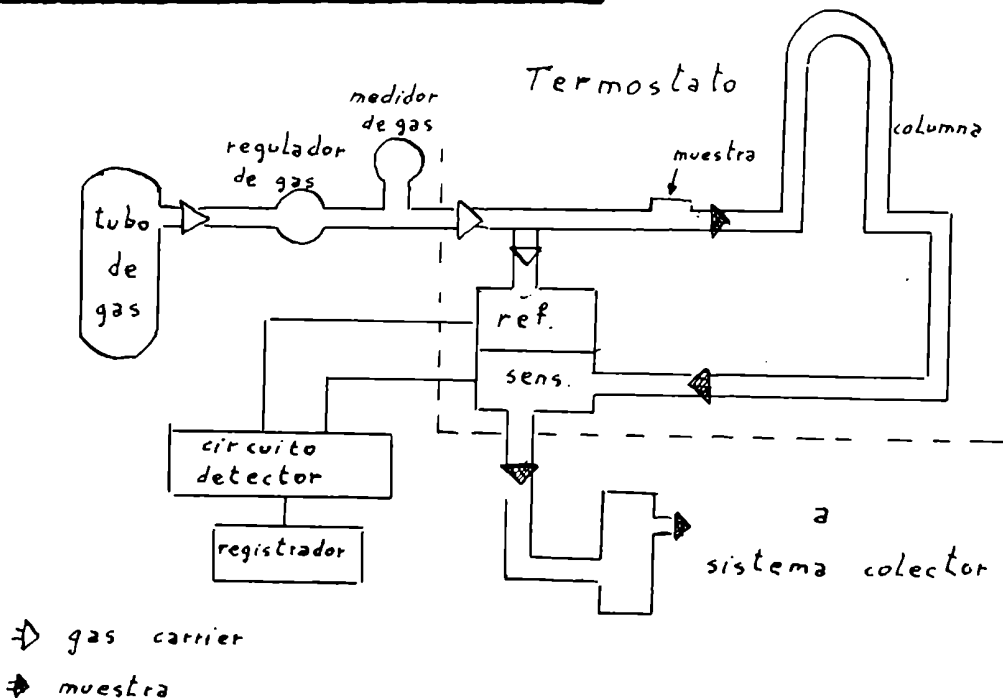
La muestra para ser analizada se introduce en el cromatógrafo, ya sea al estado gaseoso o líquido pues como el aparato está aproximadamente a la temperatura de ebullición de dicha muestra, pasa enseguida al estado gaseoso y es arrastrada en un sistema de N_2 , H_2 , He, o aire. Esta técnica

se llama análisis de elusión y su cromatograma consiste en una serie de picos representando cada uno un componente puro.

En una modificación del método, introducido por Claesson en 1946, los vapores son desplazados del adsorbente mediante un vapor desplazador el cual es introducido continuamente en la columna, al estado gaseoso, siendo adsorbido más fuertemente que cualquiera de los componentes en la muestra; resulta así una serie de escalones correspondientes a cada uno de los componentes.

El avance más importante es el método gas-líquido partición de James y Martin (1952); ellos usaron una fase líquida fija de silicona y ácido esteárico, soportado en Kieselguhr para la separación de ácidos grasos. El cromatograma consiste también en una serie de picos.

Esquema de un cromatógrafo gaseoso



Con respecto al detector debe cumplir las siguientes características:

- 1) Alta resolución con pequeño volumen.
- 2) Simplicidad de operación.
- 3) Que muestre igual amplitud del signo independiente de la naturaleza del componente.
- 4) Construcción simple.
- 5) Costo razonable.
- 6) Aplicable a gran número de compuestos.

La célula de conductividad térmica guarda todos estos requisitos y es el detector más simple y económico.

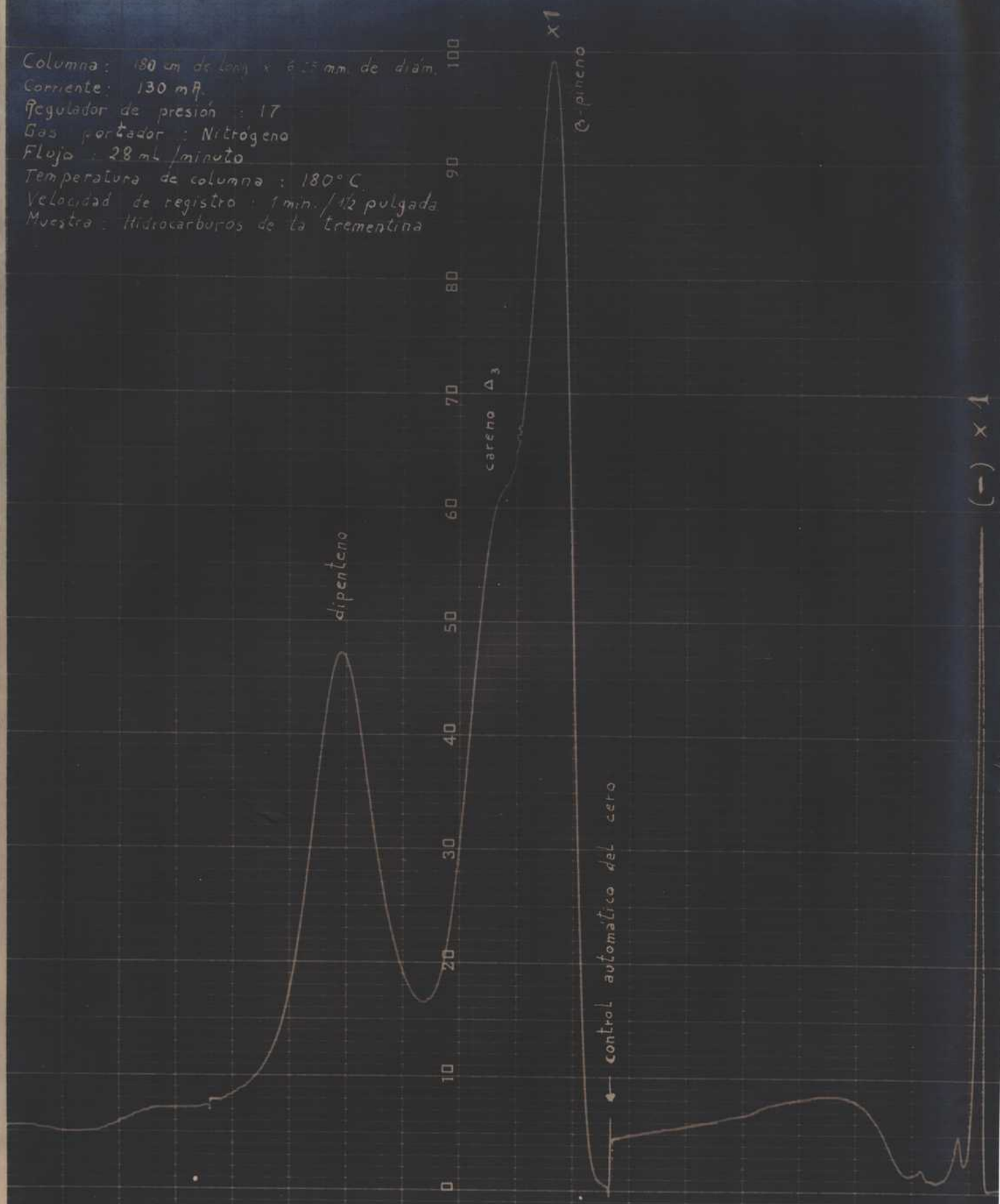
Columna: En forma de U, W o espiral; es llenada con 25% de líquido 75% de sólido soporte de partículas pequeñas (100 mesh) tierra de diatomeas. La fase estacionaria líquida es mezclada con sólido por medio de un solvente (éter) que luego es eliminado. Se empaqueta la columna tratando de lograr máxima uniformidad.

Parte práctica.

Se hizo la cromatografía gaseosa de la trementina, previo tratamiento con Na, en las condiciones tales como se indica en gráfico N°.

Como puede observarse en él, aparecen tres componentes y además un cuarto pico muy chico debido a pequeñas

Columna: 180 cm de long x 6.35 mm. de diám.
Corriente: 130 mA.
Regulador de presión: 17
Gas portador: Nitrógeno
Flujo: 28 ml/minuto
Temperatura de columna: 180°C
Velocidad de registro: 1 min./1/2 pulgada
Muestra: Hidrocarburos de la trementina



trazas de algún hidrocarburo que en cromatografía líquida no podía detectarse.

Se identificaron los tres componentes agregando a la muestra, sucesivamente pequeñas cantidades de cada componente puro, y viendo cual pico aumentaba.

En caso de querer separar el β pineno y careno, se debe utilizar un flujo menor para conseguir dos picos, o si se cuenta con los elementos necesarios, recoger esa fracción del cromatograma y aplicar una posterior cromatografía.

Cuando en el cromatograma salen valores negativos, puede tratarse de gases con conductividad térmica mayor que el H_2 , (o sea peso molecular menor ej. H_2) o sustancias que transmitan calor por conducción (ej. H_2O) como sucedió en nuestro caso al no estar la muestra perfectamente seca).

Comparación con cromatografía líquida.

De lo que pudimos observar en este nuevo método, aplicable a sustancias hasta de p.e. $250^\circ C$, puede establecerse las siguientes comparaciones con cromatografía líquida:

- 1) Debido a la baja viscosidad del gas, es posible trabajar con columnas muy largas, obteniéndose alta eficiencia.
 - 2) Las columnas operan a altas velocidades de goteo así que el análisis es conducido rápidamente (término medio 20 minutos).
 - 3) Son métodos muy convenientes para detectar concentraciones
-

WHEN REORDERING SPECIFY CHART NUMBER 13920 SCIENTIFIC INSTRUMENTS DIVISION BECKMAN INSTRUMENTS INC. FULL

WAVENUMBER CM⁻¹

900

1000

1100

1200

1300

1400

1500

2000

2500

3000

4000

5000

6000

7000

8000

9000

10000

11000

12000

13000

14000

15000

16000

17000

18000

19000

20000

21000

22000

23000

24000

25000

26000

27000

28000

29000

30000

31000

32000

33000

34000

10

9

8

7

6

5

4

3

2

WAVELENGTH IN MICRONS

H₂C

H₂C

CH₃

CH

C≡C

CH

Espectro Infrarrojo de Hidrocarburos de

pequeñas de vapor en un gas, pues resulta más fácil detectar esto último que cantidades pequeñas de soluto en un líquido solvente; además son también métodos muy sensibles, de rápida respuesta, donde pueden adaptarse registradores automáticos.

Estas técnicas con la colaboración valiosísima del análisis infrarrojo constituyen uno de los mayores avances para la química analítica cuali y cuantitativa, y serán elementos indispensables del laboratorio en un futuro cercano.

Adolfo Fuentes

Isabel Galindo

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

- (1) - Gillam, Lynas-Gray, Simonsen. J.C.S. 1941 - pg. 60.
- (2) - Favoraky y Lebedeva. Bull. Soc. Chim. 1939 vol.6,1330
- (3) - Wagner - Jauregg. Annalen 1932 - 496.
- (4) - Leeman. Nature 1929, 124-946.
- (5) - Read. J.S.C. 1929, 48, 786.
- (6) - Hall. Chemico. Reviews, 1933, 13, 479;
- (7) - Smith. A Research on the Eucalyptus and Their Essencial Oils.
- (8) - Tesis del Dr. J. Labat.
- (8') - Tesis del Dr. E. Clavet.
- (9) - Tesis del Dr. A. Gordillo.
- (10) - Tesis del Dr. B. Frydman.
- (11) - Fink, Lewis and Weis. Anal. Chem. 22, 850 (1950).
- (12) - Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi. Band 23-1-2; 1946.
- (13) - Lederer and Lederer. Chromatography pg. 4-290.
- (14) - Claeson. Arkiv för Kemi Min. Geologi 1946-23 A N° 1
- (15) - Arkiv för Kemi Min. Geol. Band 23 - 1, 2 Cap. III.
- (16) - Holman y Hagdahl. Arch. Biochem. 1948, 13 - 301.
- (17) - J. Am. Chem. Soc., 1950 - 72. 3733.
- (18) - J. Am. Chem. Soc. 1951 - 73, 3337.
- (19) - J. Am. Chem. Soc. 1951 - 73. 5285.
- (20) - Arkiv för Kemi. Min. Geol. 1946 - 28, A. N° 1
- (21) - Tratado de Química-Física. Glasstone.
- (22) - Arkiv för Kemi. Min. Geol. 1943 - 16 A.

- (23) - Tratado de Química-Física. Glasstone.
 - (24) - Gallaway y Murray. J.Am. Chem. Soc. 70, 2584 (1948).
 - (25) - Poucher, Williams: Perfums, cosmetics and soaps, with special referens to syntetics. Vol II pg. 34/38. London 1941.
 - (26) - Guenther. Vol. I pg. 87/187. New York (1948).
 - (27) - Guenther. Vol.II pg. 775.
 - (28) - Guenther. Vol.II pg. 67.
 - (29) - Guenther. Vol.II pg. 778.
 - (30) - Guenther. Vol. I pg. 305.
 - (31) - Simonsen. The Terpenes 2da. Edición. Vol.I. pg. 162.
 - (32) - Guenther. Vol. II pg. 788.
 - (33) - Kirchner, Miller. Anales Chem. 1951. 23, 420.
 - (34) - Kirchner, Miller. Anales Chem. 1951. 23, 428.
 - (35) - Doctor A. Montes. Productos Aromáticos.
 - (36) - J. Chem. Soc. 119 (1926) 1644 - 121 (1922) 2292.
 - (37) - Ber. 71 - B (1938) 1163.
 - (38) - Simonsen - The Terpenes. Vol. I.
-