

Estudio de aceites esenciales colombianos II

**ESTUDIO FITOQUIMICO DEL ACEITE ESENCIAL
DE PIMENTA OFFICINALIS**

EDUARDO CALDERÓN GÓMEZ, STELLA DE NIGRINIS,
JAIRO CALLE ALVAREZ. (Trabajo, copatrocinado por
Colciencias, realizado en el Laboratorio de Investi-
gaciones Fitoquímicas).

INTRODUCCION

Las pimentas son árboles de gran importancia comercial por la calidad del aceite que se obtiene de ellos.

La pimenta racemosa Miller J. W. Mooren o Pimenta acris Wight Anomis a. Bg myrcia a. DC myrtus cariohillata Jacq. se encuentra tanto silvestre como cultivada en varias islas de las Antillas como Puerto Rico y República Dominicana. En la región de la Guayana se calcula que anualmente se destilan 3.500.000 libras de hojas de Pimenta con un rendimiento de 1 a 2% de aceite esencial dando una producción total de 35.000 a 40.000 libras de aceite.

Los principales constituyentes de este aceite son fenoles (eugenol y chavicol) y su calidad se valora generalmente por el contenido de eugenol. Según la bibliografía, un buen aceite contiene por lo general del 55 al 65% de fenoles. El resto de constituyentes está formado por hidrocarburos (terpenos y sesquiterpenos). (1).

En Colombia se encuentra Pimenta officinalis silvestre en forma abundante en una región que va desde Bahía Solano hasta

*Panamá a todo lo largo de la Costa Pacífica. En esta región se conoce con el nombre de "canelo". Al efectuar el análisis de una muestra de hojas de *Pimenta officinalis* enviada a nuestro laboratorio nos llamó la atención su riqueza en aceite esencial (1%), con un alto contenido de eugenol (96%).*

En vista de los resultados obtenidos se organizó un viaje a Bahía Solano con el fin de recolectar más material. Los datos que aparecen a continuación corresponden a los resultados de la investigación realizada sobre las muestras recogidas.

Queremos agradecer al experto botánico señor Roberto Jaramillo M. del Instituto de Ciencias Naturales, la colaboración que nos prestó para la recolección del material y para su clasificación botánica.

1. MATERIALES.

1.1. Para la obtención del aceite se trabajó con las hojas recolectadas de árboles adultos en la Costa Pacífica del Departamento del Chocó en el sitio denominado Nabugá, el 17 de septiembre de 1972.

El material fue empacado en costales y transportado por vía aérea desde el sitio de recolección hasta Bogotá.

1.2. *Patrón de referencia.*

Se empleó como patrón de referencia Eugenol BDH (99.9% de pureza).

2. METODOS.

2.1. *Obtención del aceite.*

Se ensayaron dos métodos de extracción: el primero consistió en someter las hojas enteras a un arrastre de vapor y separación del aceite en el destilado por decantación.

En el segundo método las hojas fueron tratadas, antes de someterlas al proceso de destilación, con una solución de cloruro de sodio 5 M, para facilitar la plasmólisis del tejido celular, lo cual aumenta el rendimiento en el aceite (2).

A continuación se sometieron a destilación con arrastre de vapor. Del destilado se separó el aceite por decantación; se filtró por sulfato de sodio anhidro y se almacenó bajo refrigeración en recipientes adecuados.

El aceite obtenido es de color amarillo dorado, olor parecido al del aceite de clavos, sabor picante y causa anestesia de las membranas bucales.

Nota: Para obtener el máximo de rendimiento debe hacerse tratamiento con arrastre de vapor lo más pronto posible después de la preparación de las muestras.

2.2. *Determinación de las constantes físicas.*

Utilizando las técnicas de Guenther (3) se determinaron: Índice de refracción, densidad y rotación angular.

2.3. *Ensayos químicos.*

Se siguieron las técnicas dadas por la U.S.P. XV para el aceite esencial de clavos debido al parecido de estos dos aceites esenciales y por no existir técnicas específicas para el aceite de Pimenta.

2.4. *Ensayos de pureza.*

Para investigar la presencia de metales pesados provenientes de una posible contaminación durante el proceso de destilación, se realizaron los ensayos ordenados por la U.S.P. XVIII (5).

2.5. *Estudio espectrofotométrico.*

2.5.1. *Espectrofotometría al infrarrojo.*

Se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 700. La muestra se colocó en forma de película entre dos cristales de cloruro de sodio.

2.5.2. *Espectrofotometría al ultravioleta.*

Se empleó un espectrofotómetro Hitachi Perkin Elmer - 139 -. Se determinaron los espectros de absorción entre 220 y 310 milimicras.

2.6. *Ensayos cromatográficos.*

2.6.1. *Cromatografía en capa delgada.*

Después de varios ensayos se establecieron técnicas para cromatografía mono y bidimensional en capa delgada.

Solventes: 1) Benceno - Acetato de Etilo 95:5.

2) Benceno.

3) Cloroformo.

Para la bidimensional se empleó como solvente para el primer recorrido cloroformo y para el segundo benceno - acetato de etilo 95:5.

Cámara saturada durante 24 horas.

Temperatura interior 22°C.

Recorrido 15 cms.

Tiempo aproximado entre 25 y 45 minutos.

Muestra aplicada: 3 microlitros de una solución al 10% del aceite en acetona o de eugenol al 10% en acetona.

Reveladores: (6, 7).

Compuestos carbonílicos: 2, 4 dinitro fenil hidrazina modificado.

Fenoles: ácido sulfanílico diazotado; 2, 4 dicloroquinón - cloramida.

Alcoholes: ácido fosfomolibdico.

Terpenos: anisaldehído, tricloruro de antimonio y vainillina.

Peróxidos: yoduro de potasio en ácido acético glacial.

2.7. *Valoración del eugenol en el aceite.*

2.7.1. *Determinación colorimétrica.*

Se ensayó el método propuesto por M. S. Karawaya y S. K. Whaba (8). Se basa en la reacción que presenta el eugenol y la 2, 6 dicloro - quinón - clorimida en medio isopropílico a un pH de 8.6; la coloración alcanza su máximo de intensidad a los 15 minutos después de iniciada la reacción. A medida que transcurre el tiempo empieza a decrecer

rápidamente, por lo cual es indispensable cronometrar exactamente el tiempo de la reacción. La absorbancia se determina a 650 milimicras.

Nota: Es importante trabajar al pH anotado porque de lo contrario no se obtienen valores reproducibles.

2.7.2. *Determinación del eugenol por espectrofotometría diferencial (9).*

Se basa en los cambios de las propiedades cromóforas de los fenoles debidos a desplazamientos batocrómicos por influencia del pH formándose el ión fenóxido a pH alcalino. La determinación se efectuó a 296 milimicras determinándose previamente el Δ e para el eugenol patrón.

2.8. *Valoración del eugenol en la fracción fenólica aislada.*

Para aislar los fenoles se ensayaron dos métodos:

2.8.1. *Método 1.*

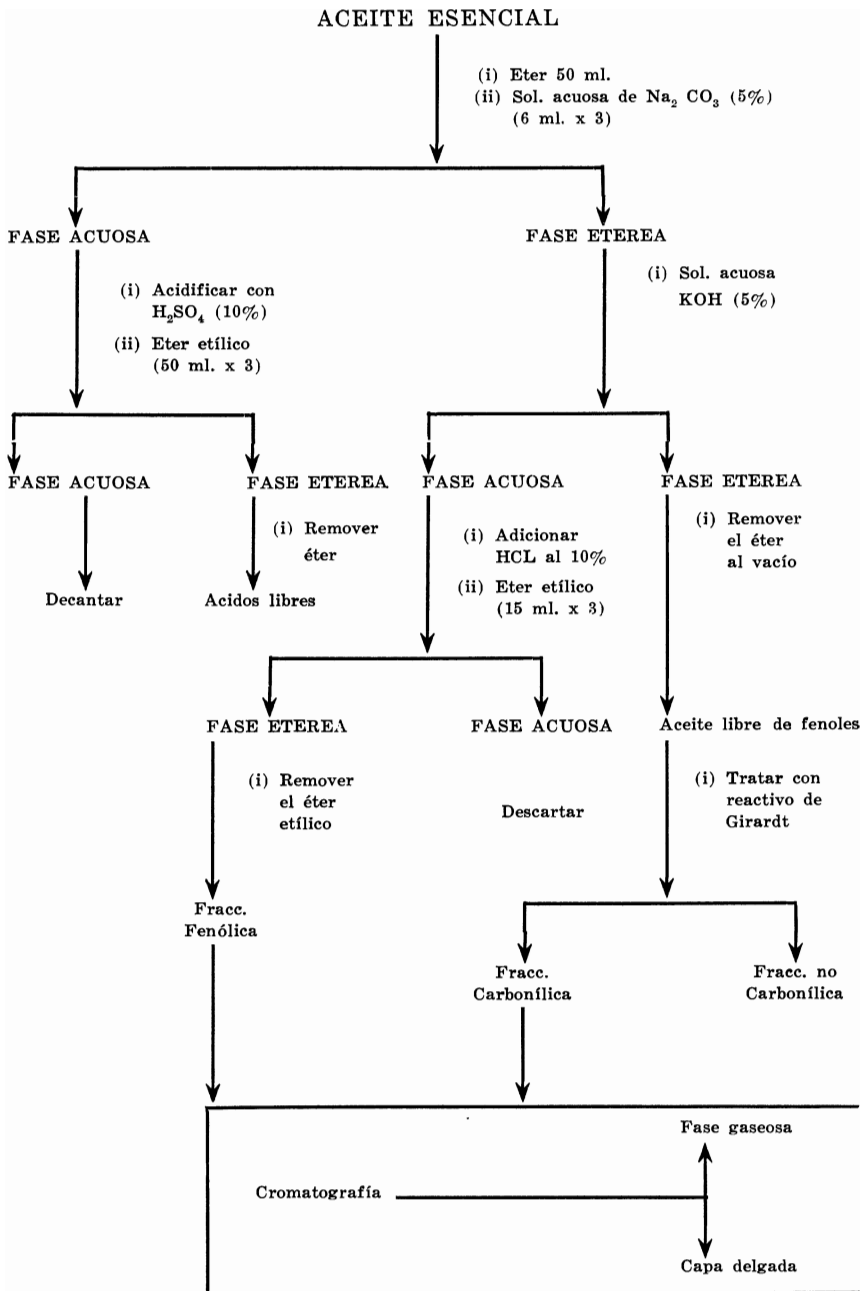
Los fenoles se aislaron a partir de 20 g de muestra. (10), siguiendo el esquema anotado en la página 42.

2.8.2. *Método 2.*

A 10 g. de aceite esencial se agregan 30 ml. de éter de petróleo (p. e. 30 - 60°C), en un embudo de separación y se extrae con tres porciones de KOH (20 ml.) al 5%. Los extractos alcalinos reunidos se tratan con HCl al 10% hasta reacción francamente ácida. El extracto ácido se extrae con éter etílico hasta fin de fenoles, luego se lleva a un volumen conocido.

Si se trata de aislar únicamente los fenoles se aconseja emplear el segundo método, pero el primero es muy útil para aislar las demás fracciones además de los fenoles.

2.8.3. La valoración final de eugenol se hace empleando los métodos 2.7.1 y 2.7.2 a partir de la solución etérea la cual contiene los fenoles aislados por cualquiera de los dos métodos aconsejados (2.8.1 y 2.8.2).



3. RESULTADOS.

3.1. *Rendimiento en la obtención del aceite esencial.*

Sin tratamiento previo con solución 5 M de cloruro de sodio: 0.6%.

Con tratamiento previo con solución de cloruro de sodio 5 M. 1%.

3.2. *Solubilidad.*

Un mililitro de aceite esencial se disuelve completamente en 1.8 ml. de alcohol etílico de 70%.

3.3. *Constantes físicas.*

Indice de refracción	1.5390
Densidad	1.659
Rotación angular	-0.75°

3.4. *Ensayos químicos.*

3.4.1. Acidez: Cumple con los requisitos dados por la U.S.P. para aceite de clavos.

3.4.2. Fenoles: Las pruebas para fenoles son francamente positivas.

3.5. *Metales pesados.*

El aceite esencial no contiene metales pesados.

3.6. *Estudio espectrofotométrico.*

3.6.1. *Espectrofotometría al infrarrojo.*

El espectro de absorción en el infrarrojo del aceite esencial es casi idéntico al espectro de absorción en el infrarrojo del eugenol tomado como referencia.

A la fracción fenólica aislada por el método 2.8.2 se le determinó el espectro de absorción I. R. siendo este igual al espectro del eugenol patrón.

A la fracción terpénica aislada por el método 2.8.1 se le determinó el espectro I. R.; el cual corresponde a la totalidad de los terpenos presentes. (Figuras 1, 2, 3, 4).

3.6.2. *Espectrofotometría en el ultravioleta.*

El espectro de absorción U. V. del aceite esencial

en éter de petróleo presentó un máximo a 230 milimicras.

El eugenol tomado como referencia y la fracción fenólica aislada presentaron el máximo de absorción a 230 milimicras. Por otra parte los tres espectros son muy semejantes. Se adjuntan los espectros correspondientes. (Figuras 5, 6, 7).

3.7. *Estudio cromatográfico.*

3.7.1. *Cromatografía en capa fina.*

El análisis cromatográfico en capa fina dió resultados positivos para fenoles y terpenos. Resultados negativos para compuestos carbonílicos ácidos y peróxidos.

Al estudiar la fracción fenólica por cromatografía bidimensional en capa fina, utilizando varios sistemas de solventes se encontró un solo fenol, el cual fue identificado como eugenol.

La fracción terpénica reveló la presencia de cinco productos de los cuales se han identificado dos. Esto será objeto de una comunicación posterior. (Figuras 8, 9, 10, 11).

3.8. *Valoración del eugenol en el aceite esencial.*

3.8.1. Método colorimétrico: 96% de eugenol.

3.8.2. Espectrofotometría diferencial: 95% de eugenol.

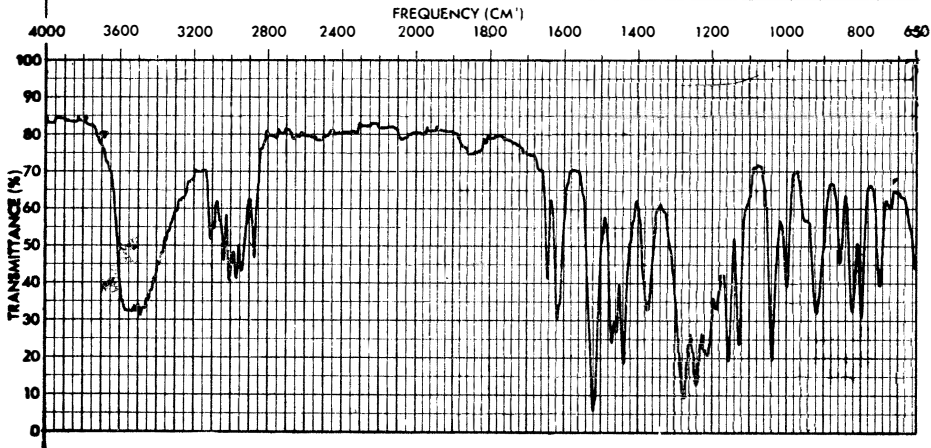
4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

4.1. En la obtención del aceite esencial de las Pimentas es absolutamente indispensable el tratamiento previo del material con solución de cloruro de sodio 5 M, durante 24 horas antes de empezar el proceso de destilación. De lo contrario el rendimiento y el contenido de fenoles es muy bajo por la dificultad que presenta el material debido a su estructura para liberar el aceite esencial.

Con la Pimienta estudiada se obtienen valores que se aproximan a los consignados en la bibliografía consultada, la cual anota como rendimiento normal 1% en la destilación de hojas de Pimienta *officinalis* cultivada.

NO. 007-1061

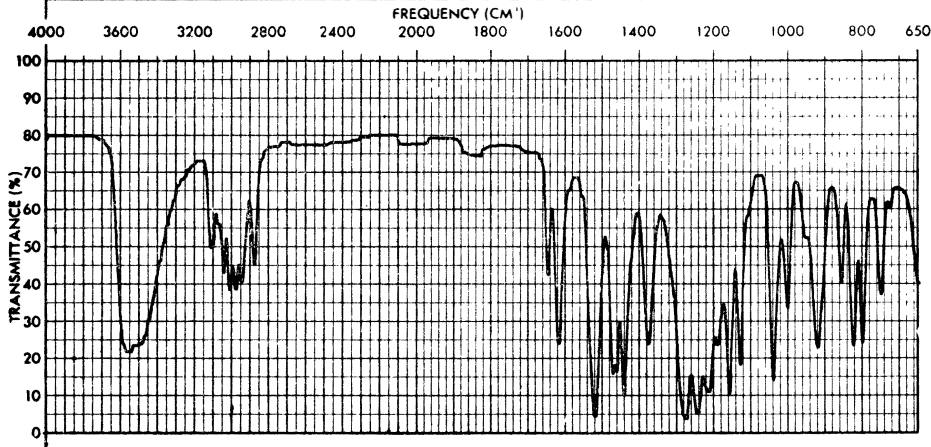
REMARKS Extracción con arrastre de vapor partir de las hojas	ORIGIN <u>NABUGA (Choco)</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700 SPECTRUM NO <u>1</u> SAMPLE 1 <u>Acete Esencial de Pimenta</u> <u>Officialis</u> SAMPLE 2 _____
	PURITY _____	
	PHASE <u>Liquida</u>	
	CONCENTRATION _____	
	THICKNESS <u>Película</u>	
	DATE <u>Octubre de 1972</u> OPERATOR <u>L.S. de Nigrinis</u>	



SAMPLE _____
SPECTRUM NO _____

NO. 007-1061

REMARKS	ORIGIN <u>CASA MOYCO</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700 SPECTRUM NO <u>2</u> SAMPLE 1 <u>Eugenol</u> SAMPLE 2 _____
	PURITY <u>99.9%</u>	
	PHASE <u>Liquida</u>	
	CONCENTRATION _____	
	THICKNESS <u>Película</u>	
	DATE <u>Octubre de 1972</u> OPERATOR <u>L.S. de Nigrinis</u>	



SAMPLE _____
SPECTRUM NO _____

NO. 007-1061

REMARKS

Fracción fenólica aislada por el
método 282

ORIGIN ACEITE ESENCIAL DE PIMENTA
OFFICINALIS

PURITY _____

PHASE Líquida

CONCENTRATION _____

THICKNESS Película

DATE Octubre de 1972

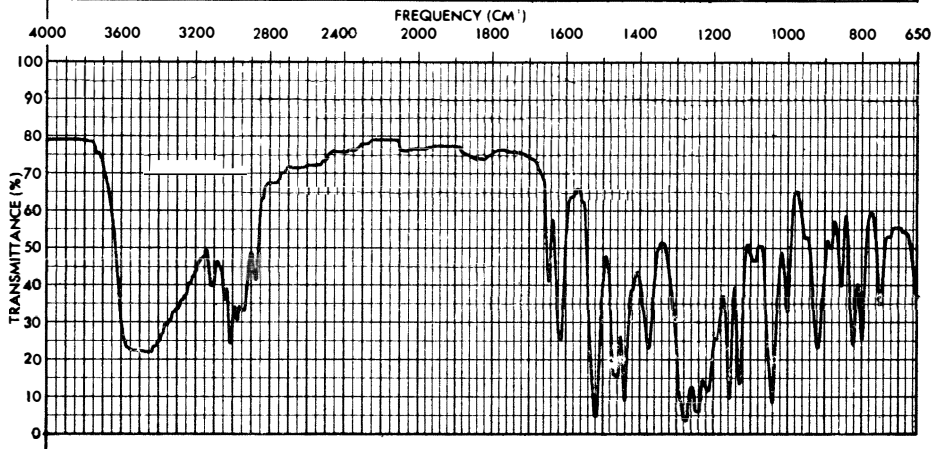
OPERATOR LS de Nigrinis

PERKIN-ELMER
MODEL 700

SPECTRUM NO. 3

SAMPLE 1 Fracción fenólica

SAMPLE 2 _____



NO. 007-1061

REMARKS

Fracción terpénica aislada por el
método 281

ORIGIN ACEITE ESENCIAL PIMENTA
OFFICINALIS

PURITY _____

PHASE Líquida

CONCENTRATION _____

THICKNESS Película

DATE Octubre de 1972

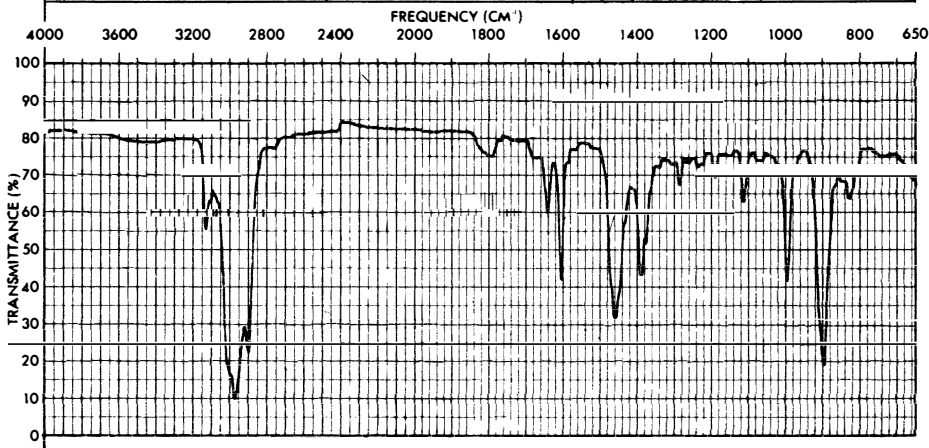
OPERATOR LS de Nigrinis

PERKIN-ELMER
MODEL 700

SPECTRUM NO. 4

SAMPLE 1 Fracción Terpénica

SAMPLE 2 _____



SAMPLE

SPECTRUM NO.

SAMPLE

SPECTRUM NO.

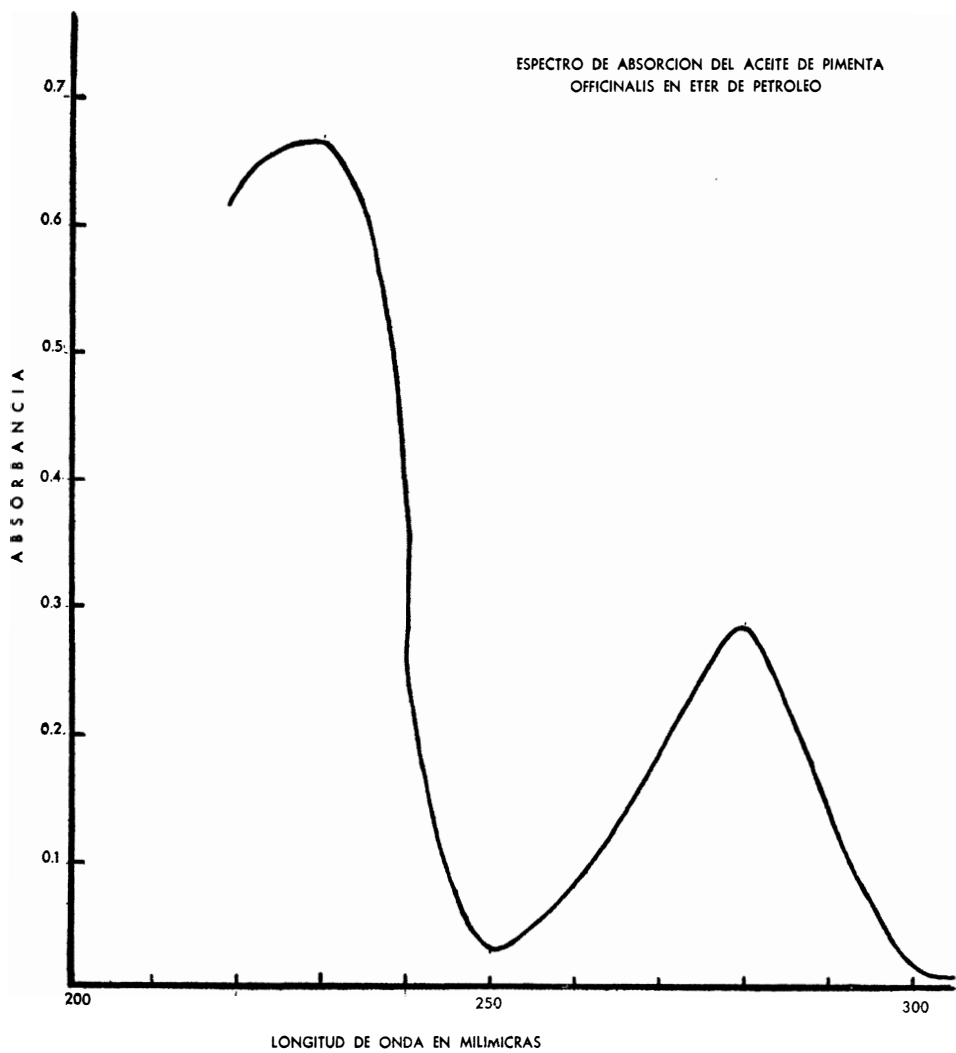


FIGURA No. 5

ESPECTRO DE ABSORCION DE EUGENOL
EN ETER DE PETROLEO

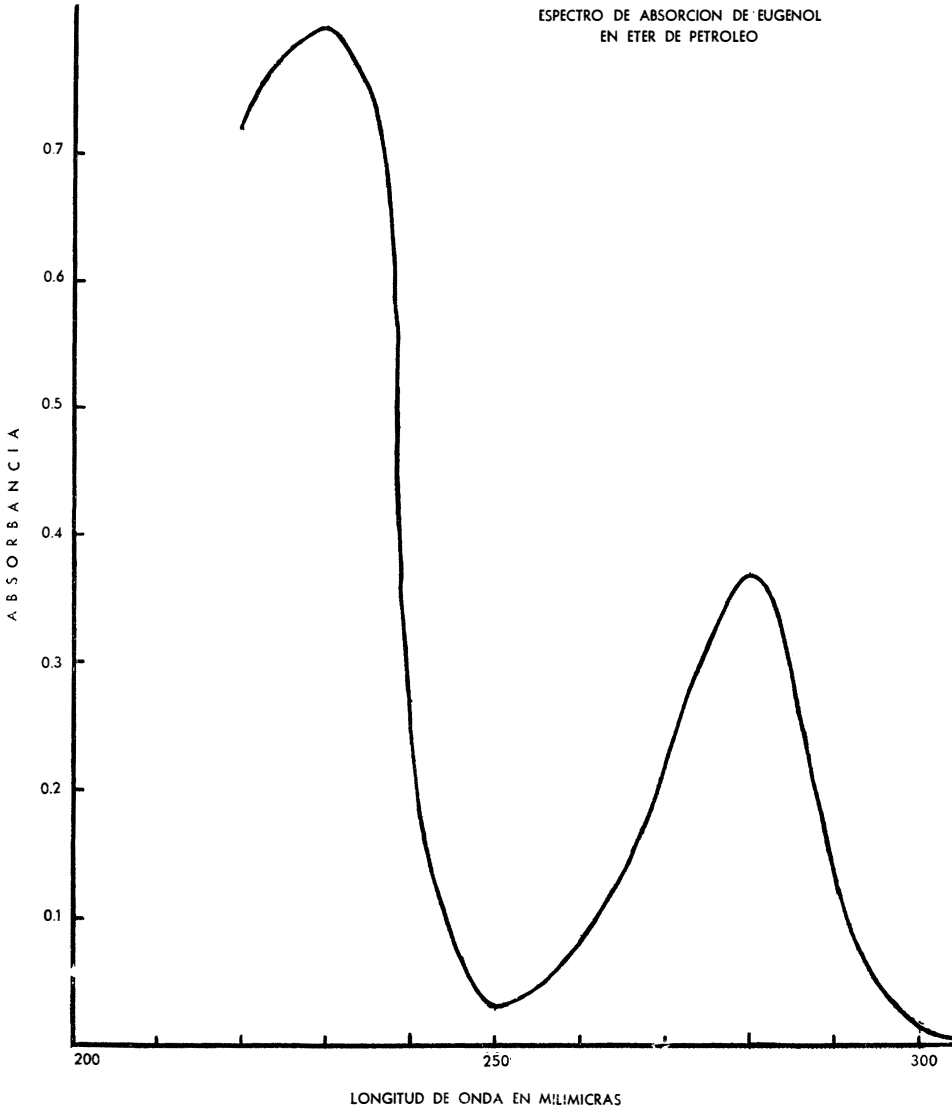


FIGURA No. 6

ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FRACCION FENOLICA
AISLADA DEL ACEITE DE PIMENTA OFFICINALIS

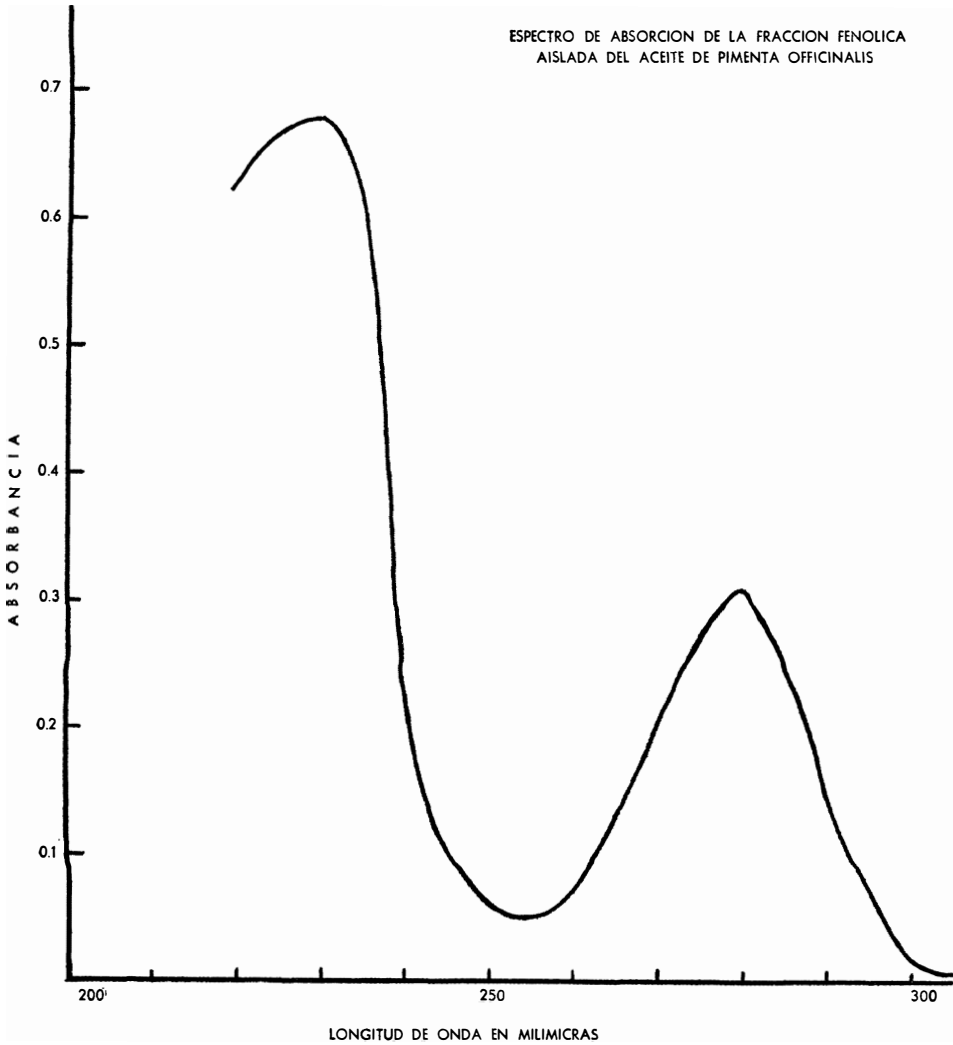


FIGURA No. 7

CROMATOGRAFIA UNIDIMENSIONAL

TERPENOS AISLADOS

P. OFFICINALIS

SOLVENTE: CLOROFORMO: METANOL (95:5)

REVELADOR: ANISALDEHIDO-ACIDO SULFURICO

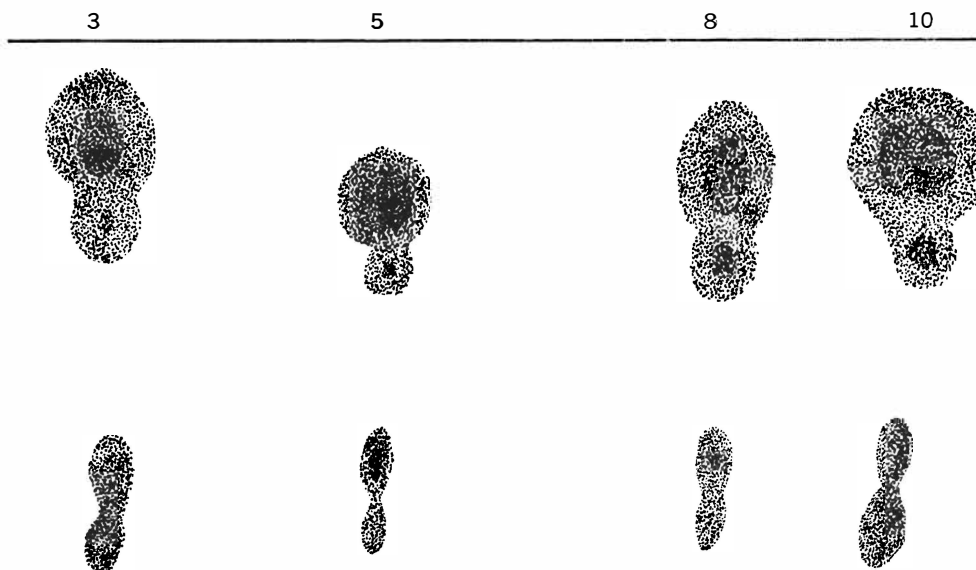


FIGURA No. 8

CROMATOGRAFIA UNIDIMENSIONAL

SOLVENTE: BENCENO

REVELADOR: ACIDO SULFANILICO-DIAZOTADO

FENOLES
AISLADOS
METODO No. 1

FENOLES
AISLADOS
METODO No. 2

ACEITE
ENTERO
P. OFFICINALIS

EUGENOL
PATRON
B D H

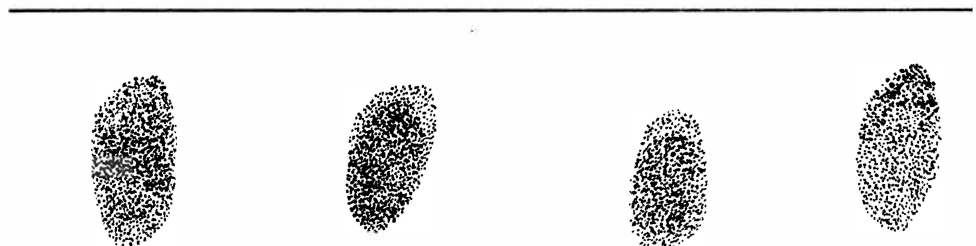


FIGURA No. 9

CROMATOGRAFIA UNIDIMENSIONAL

SOLVENTE: CLOROFORMO

REVELADOR: ACIDO SULFANILICO

EUGENOL
PATRON

P. OFFICINALIS

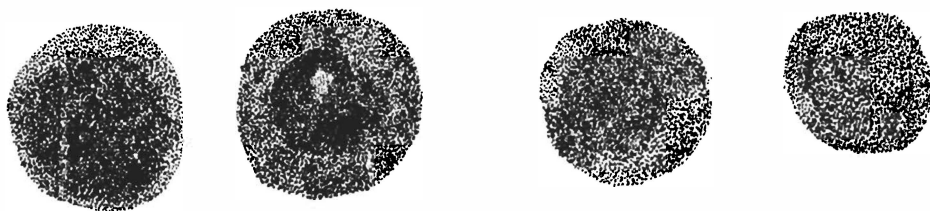


FIGURA No. 10

CROMATOGRAFIA UNIDIMENSIONAL

REVELADOR: 2,6 DICLOROQUINONCLORIMIDA

ACEITE ENTERO P. OFFICINALIS

SE OBSERVA LA PRESENCIA DE UN SOLO FENOL



FIGURA No. 11

Con todo se está realizando actualmente un estudio sobre distintos métodos para la obtención del aceite con el fin de escoger la técnica más apropiada.

- 4.2. Al estudiar los espectros de absorción I.R. del aceite completo y del eugenol tomado como referencia se encuentra que son semejantes en cuanto a las bandas que presentan y la intensidad de las mismas debido posiblemente a que el eugenol se encuentra presente en un 96%.
- 4.3. Por medio de la cromatografía en capa fina se pudo establecer que el único constituyente de la fracción fenólica es el eugenol, siendo esta fracción la que constituye el mayor porcentaje del aceite (96%).

5. CONCLUSIONES.

- 5.1. La *Pimenta officinalis* estudiada suministra un aceite esencial constituido casi exclusivamente por eugenol, con un rendimiento muy aceptable y que seguramente se podrá mejorar al encontrar una técnica más adecuada para su obtención.
- 5.2. Por su gran contenido de eugenol este aceite tiene posibilidades de aplicación en distintos campos tales como: odontología, medicina, farmacia y en la industria. Actualmente se está realizando un estudio sobre su aplicación, por investigadores de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional.
- 5.3. El aceite esencial obtenido en la *Pimenta officinalis* colombiana, de acuerdo a su composición química puede catalogarse como un aceite de muy buena calidad.

RESUMEN

Se obtuvo el aceite esencial de las hojas de *Pimenta officinalis* por destilación con arrastre de vapor dentro de condiciones apropiadas, y se llevó a cabo su análisis.

Al aceite obtenido se le determinaron las constantes físicas y químicas, se le efectuaron ensayos de pureza y se le hizo el estudio espectrofotométrico al U. V. y al I.R.

Sus constituyentes fueron estudiados por cromatografía en capa fina. El eugenol, principal componente del aceite, fue aislado por cromatografía preparatoria (en capa delgada) y valorado posteriormente por métodos colorimétricos. Los resultados obtenidos fueron comparados con los encontrados en la valoración del eugenol por espectrofotometría diferencial.

SUMMARY

The essential oil of *Pimenta officinalis* was obtained by steam distillation. The physical-chemical constants and its purity were determined. The absorption characteristics (U. V. and I.R.) were studied. The different components were isolated by TLC. The eugenol is the major component. It was isolated by preparative TLC and the eugenol content was determined by colorimetric analysis. The values obtained by this method were compared to the values obtained by differential spectrophotometry.

RÉSUMÉ

L'huile essentielle des feuilles de *Pimenta officinalis* a été obtenue par entraînement à la vapeur.

Les constantes physiques et chimiques ont été déterminées ainsi que les spectres U. V. et I. R.

Le principal constituant est l'eugenol (chromatographie sur couche mince). Il a été séparé par la même méthode, à échelle préparative, sa concentration déterminée par colorimétrie et les résultats comparés à ceux obtenus par spectrophotométrie différentielle.

BIBLIOGRAFIA

1. DE MARTÍNEZ, N. New Method of Bay Oil Determination by Chromatographic Separation. *American Perfumer and Cosmetics*. 1957, 6, pág. 27.
2. MERRIAM JONES and NOEMI G., Arrillaga. Use of salt in distilling Bay leaves. *The American Perfumer*, 1942, Vol. 44, Nº 8, pág. 25.
3. GUENTHER. *The Essential Oils*, D. Van Nostrand Company, New York, 1948, vol. 1, pág. 294.
4. *United States Pharmacopea* XV.

5. United States Pharmacopea XVIII, pág. 897.
6. E. STALH, Thin Layer Chromatography, Springer Verlag. Berlin. Seg. ed. 1969, pág. 857: 858.
7. SHRINER L., The Systematic Identification of Organic Compounds, John Wille & Sons Inc. London, cuarta ed. 1960, pág. 219.
8. M. S. KARAWAYA and WHABA. Colorimetric Estimation of Eugenol in oil of clove, allspice, bay. American Perfumer and Cosmetics. 1967, vol. 82, 12.
9. F. PELLERIN et R. CHASSET. Identification et dosage de composés phenoliques par spectrophotométrie dans l'ultraviolet. Annales pharmaceutiques français 1968, vol 26, no. 6, pág. 421.
10. RAMESH N. Acharya and Madhukar G. Chaubal. Essential Oil Anemopsis californica, Journal of Pharmaceutical Sciences 1968, vol. 57, Nº 6, pág. 1020.