

ESTUDIO FITOQUIMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE PIPER LENTICELLOSUM C. DC.

PRIMERA PARTE

JAIRO CALLE A., Q. F.

SALOMÓN FERREIRA A., Q. F., M. S. *

Trabajo realizado en el Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Director del Laboratorio: DR. EDUARDO CALDERÓN G.

INTRODUCCION

Colombia es un país inmensamente rico en especies vegetales de importancia indudable. La gran mayoría de estas plantas no han sido estudiadas y el conocimiento fitoquímico que de ellas se tiene es casi nulo.

La medicina popular ha utilizado por siglos enteros muchas de esas plantas como único medio de tratamiento a su alcance, de las enfermedades de seres humanos y animales, y en la gran mayoría de los casos aún no se conoce el fundamento científico de su acción terapéutica.

A nadie escapa la importancia que tiene el estudio fitoquímico de las plantas colombianas o de sus productos de extracción, como es el caso de los aceites esenciales. El conocimiento de los compo-

* Profesores Asistentes de la Universidad Nacional.

mentes de un aceite, sus características fisicoquímicas, su estabilidad y su acción biológica, pueden permitir explicar la acción terapéutica por la cual un determinado aceite volátil se ha venido utilizando, la razón, bondad o absurdo de su empleo pueden determinarse otros posibles usos en terapéutica y en la industria ya sea como agente terapéutico propiamente dicho o para la obtención de algún compuesto que pueda ser utilizado para la semisíntesis de otro medicamento.

Además es muy importante tener en cuenta que aunque en el momento actual la obtención de componentes de aceites volátiles por vía sintética ha aumentado considerablemente, aún quedan bastantes aceites volátiles y sus compuestos que por una u otra razón son utilizados en perfumería y en la fabricación de medicamentos y siempre existirán aceites volátiles naturales que no podrán ser substituídos por productos de síntesis (1).

El propósito del presente trabajo es adelantar un estudio fitoquímico del aceite volátil del "cordoncillo aromático u oloroso" (Piper lenticellosum C.DC.).

Además del estudio fitoquímico propiamente dicho los autores se propusieron desarrollar un trabajo que sirviera como base en las investigaciones futuras, sobre el mismo tema, que se adelanten en el Departamento de Farmacia y que pueden incluir aspectos microbiológicos, farmacológicos y utilización del producto a escala industrial en la producción de medicamentos.

La planta objeto del estudio es muy utilizada para el tratamiento de enfermedades dermatológicas en forma de baños con las infusiones de las hojas o con el polvo obtenido después de tostar y moler las hojas, el cual se aplica sobre las erupciones de la piel y las heridas infectadas.

Además la infusión de las hojas y las hojas molidas mezcladas con sal se utilizan para curar diarreas y eliminar parásitos intestinales en animales y para curar heridas, especialmente en vacunos y equinos. También se utiliza como antiflogístico y agente dermatológico en humanos.

La descripción de la planta (Piper lenticellosum C.DC.) fue hecha por primera vez en 1866 (2) y luego fue clasificada varias veces bajo distintos nombres (3).

Las plantas de esta especie están distribuidas profusamente en Colombia y Ecuador. En Colombia se halla distribuida, entre otros lugares, en:

Norte de Santander: Alrededores de Ocaña.

Antioquia: Amagá.

Valle del Cauca: Valle del Río Albán, Quebrada Robada, Alto Bonito.

Cauca: Río Blanco, cerca de Popayán. Tunía, cerca de Popayán. De Río Ortega a San Antonio. Faldas del cerro Munchique, cerca de Minatapada.

Huila: Palermo.

Nariño: Barbacoas.

Todas las colecciones se han hecho entre 1.200 y 2.000 metros sobre el nivel del mar.

El material vegetal, objeto de este estudio, fue clasificado por el doctor Jesús M. Idrobo y el correspondiente ejemplar figura en el Herbario Nacional bajo el número 124071 (ver fotografía adjunta).

Se han obtenido aceites esenciales de varias especies de Piperáceas, comúnmente conocidos como aceites de "Matico" (4). Entre estas especies se pueden citar las siguientes:

Piper angustifolium Ruiz y Pavón.

Piper camphoriferum C.DC.

Piper lineatum Ruiz y Pavón.

Piper angustifolium var. *ossanum* C.DC.

Piper acutifolium Ruiz y Pavón var. *subverbascifolium*.

Teniendo en cuenta las condiciones en que se hacía la recolección y el envío del material vegetal a Londres, para la obtención del aceite, era muy difícil predecir la composición y las características del aceite volátil obtenido y menos probable aún obtener un producto de composición constante.

Según Gildemister y Hoffman (5) las propiedades fisicoquímicas del aceite de "Matico" son las siguientes:

Gravedad específica a 15°C.	0,940 — 1,135
Rotación óptica	—27° 28 — + 5° 34'
Índice de refracción	1,496 — 1,529
Número de ácido	hasta 4
Número de ésteres	2,5 — 5,1
Número de ésteres después de acetilación	26 — 47
Solubilidad	3—25 vol. de alcohol de 80° 0,3 — .6 vol. de alcohol de 90°

Debido a la extensión del trabajo, el cual incluye establecimiento y evaluación de métodos de aislamiento y purificación de los componentes del aceite y en algunos casos determinación de alguno o algunos de ellos, los resultados se publicarán gradualmente a medida que avance la investigación.

MATERIALES Y METODOS

El material vegetal

El material fue recogido y procesado por secado al aire libre en una vereda de Río de Oro, Departamento del Cesar, a 1.200 metros sobre el nivel del mar y temperatura promedio de 24°C, durante los primeros días del mes de agosto de 1970, en mayo y junio de 1971 y enero de 1972.

Posteriormente se sometió a secado en estufa con circulación de aire a 27°C durante 24 horas. El material seco se sometió a molienda en molino para granos hasta polvo medianamente grueso. El producto de la molienda se almacenó en frascos de vidrio ambar, al abrigo de la luz y a una temperatura promedio de 15°C. Este material se utilizó para los procesos de extracción.

El polvo es verde, grueso al tacto, de olor agradable penetrante, parecido al olor del paico (*Chenopodium ambrosioides*), y menos denso que el agua.

Extracción del aceite esencial.

La extracción del aceite esencial a partir del material seco se hizo por arrastre con vapor de agua por medio de los dos métodos siguientes:

Método A.

En un balón de fondo redondo de 1.000 ml. se colocaron 200 gm. de material seco. El aceite se removió por arrastre con vapor de agua, utilizando 2 refrigerantes de tubo recto colocados en línea. El producto de la condensación se recogió en un matraz refrigerado externamente con agua. Este destilado se recogió hasta agotamiento del aceite esencial y el olor del aceite era poco perceptible.



Figura Nº 1.—Ejemplar botánico clasificado en el Herbario Nacional de Colombia bajo el número 124071.

En cada destilación se recogieron unos 1.000 ml. de destilado, blanco, con una capa de aceite en la parte superior y con un olor muy similar al que se observa en el material de extracción.

La mezcla de aceite y agua se sometió a extracción saturando el medio líquido con cloruro de sodio. El aceite se sitúa como una capa en la parte superior del recipiente.

A la mezcla se adicionó un volumen pequeño de agua destilada de manera que permitiera la separación de la capa oleosa, por medio de una pipeta. La capa oleosa separada se colocó luego en una

ampolla de separación y al líquido se agregó más cloruro de sodio. A la parte acuosa restante se agregaron pequeños volúmenes de éter de petróleo (P.E. 30 —50°C) y los extractos etéreos se reunieron en una ampolla de separación.

La extracción con solvente orgánico se continuó hasta agotamiento del aceite. Los extractos etéreos reunidos se concentraron, para remover el éter de petróleo, por calentamiento en baño de vapor de agua. El aceite así purificado es de color amarillo pálido y de olor característico muy parecido al olor del material sometido a la extracción. Se envasó en frascos de vidrio ámbar y se mantuvo bajo refrigeración hasta el momento de proceder a los análisis y después de ellos.

Método B.

El material para la extracción se colocó en un alambique de cobre de fondo plano, usando 4 kg. de material en cada extracción. Se sometió a destilación con arrastre de vapor generado en una caldera formada por una olla de presión dotada de un manómetro y conectada al alambique por un tubo de vidrio que llegaba casi hasta el fondo del recipiente de cobre.

Se utilizaron dos refrigerantes de tubo recto colocados en línea. El destilado se recogió en un frasco florentino adaptado en el laboratorio, provisto de un sistema de flotación de manera que el volumen del líquido tiene un límite máximo de acumulación antes de perder agua por el sistema de sifón. El aceite se separó como una capa de color amarillo pálido en la parte superior. Los glóbulos pequeños suspendidos en el agua se separaron por adición de cloruro de sodio. La capa oleosa se separó con ayuda de una pipeta y el producto se recolectó en un embudo de separación. Se adicionó luego más cloruro de sodio y el aceite se filtró luego a través de sulfato de sodio anhidro. El líquido se recogió en frascos de vidrio ámbar y se manejó de la misma manera ya descrita para el aceite obtenido por el método A de extracción.

Determinación del rendimiento.

El rendimiento se determinó por destilación con arrastre de vapor a partir de 20 gm. de material seco, siguiendo la técnica indicada por E. Calderón (6). La determinación se hizo 5 veces consecutivas operando siempre en las mismas condiciones. Se tomó el valor promedio de los resultados.

Determinación de las constantes fisicoquímicas.

Densidad.

Se determinó en picnómetro de 5 ml. de capacidad, a 18°C.

Índice de acidez.

Se colocaron 5 ml. del aceite esencial, 50 ml. de etanol neutralizado y 1 ml. de solución reactivo de fenolftaleína. Se tituló con solución de hidróxido de sodio 0,1 N. El índice de acidez, expresado en mg. de hidróxido de potasio se calculó con la fórmula:

$$I_A \text{ mg. de KOH} = \frac{56,10 \times \text{ml. de titulante} \times \text{normalidad del titulante}}{\text{Gm. de aceite}}$$

Índice de saponificación.

En un matraz de vidrio de fondo plano, previamente tarado, se pesó exactamente una cantidad de aceite esencial, comprendida entre 1,5 y 2,0 gm. Se adicionaron 25 ml. de hidróxido de potasio 0,5 N y se calentó a reflujo por 0,5 — 1hr.

Después del calentamiento, el matraz se enfrió y el líquido se tituló con ácido clorhídrico 0,5 N. Además se procesó un blanco en las mismas condiciones del problema. Se hicieron 5 determinaciones y se calculó el valor promedio.

El índice de saponificación se calculó por medio de la fórmula:

$$\frac{(a - b) N}{P} \times 56,10$$

donde:

a = ml. de ácido clorhídrico 0,5 N gastados en la titulación del blanco.

b = ml. de ácido clorhídrico 0,5 N gastados en la titulación del problema.

P = peso en gm. de aceite empleado en la saponificación.

N = normalidad del ácido clorhídrico utilizado en la titulación.

Indice de ésteres antes de acetilación.

Se calculó por medio de la fórmula:

$$IE_{AA} = IS - IA$$

donde: IS = índice de saponificación.

IA = índice de acidez.

Indice de refracción.

Se determinó en un refractómetro Spencer 473, a 18°C.

Rotación óptica.

Se determinó en un polarímetro.

Se utilizó un tubo de 1,0 decímetro. Se hicieron 6 determinaciones a 18°C y se calculó el valor promedio.

Determinación de aldehídos totales

Se hizo por el método de Cassia (7), empleando 2 y 5 ml. del aceite. Se hicieron 10 determinaciones y se tomó el valor promedio.

Indice de ésteres después de acetilación.

Se hizo de acuerdo a la técnica descrita por E. Guenther (8).

Cromatografía en columna.

Se utilizó para separar los diferentes componentes del aceite esencial, con el objeto de hacer un análisis cualitativo preliminar.

La columna se preparó suspendiendo en benceno, sílica gel G (0,05 - 0,2 mm. de diámetro) previamente activada por calentamiento en estufa a 150°C durante 3 horas. Con este material se llenó un tubo de vidrio de 35 cm. de largo y ocho mm. de diámetro, hasta que la columna de sílica gel tuvo una longitud de 27 cm. En la parte inferior del tubo se colocó un tubo de plástico resistente, con llave de Mohr.

Luego se hizo pasar una mezcla de benceno y éter de petróleo 1:1 v/v, hasta que el benceno original fue desplazado de la columna, entonces se cerró el tubo utilizando la llave (9).

Luego se colocó 1 ml. del aceite en la parte superior de la columna, se abrió la llave y se hizo elución con la mezcla de benceno

y éter de petróleo. Se recolectaron 7,5 ml. de líquido en cada tubo de ensayo de 10 ml. de capacidad. Se obtuvieron así 93 fracciones de 7,5 ml. (Las fracciones se marcaron con números arábigos de acuerdo al orden de elución).

Se hizo además evaluación de la técnica de preparación de la columna de sílica gel, llenándola primero en seco y adicionando luego el solvente y suspendiendo el material de adsorción en el medio líquido y llenando luego la columna.

Cromatografía en capa fina de las fracciones N° 1 a N° 93.

Sobre láminas de vidrio (20 x 20 cm.) recubiertas con sílica gel G para cromatografía en capa fina (sílica gel G según Stahl, E. Merck A. G.), con espesor de 250 micrones y activadas por calentamiento en estufa a 150°C durante 30 minutos, se colocaron 20 microlitros de cada fracción. Las placas se desarrollaron monodimensionalmente con benceno: acetato de etilo (95:5 v/v). (10).

Las placas se secaron al aire libre y luego se asperjaron con solución reactivo de tricloruro y pentacloruro de antimonio (1:1 v/v) en tetracloruro de carbono. Luego las placas se calentaron a 105°C en estufa, hasta aparición del color y después de que se enfriaron se asperjaron con solución reactiva de 2,4 - Dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico. Las 12 primeras fracciones se trataron solamente con el reactivo de cloruros de antimonio y las otras se trataron además con el reactivo de 2,4 - Dinitrofenilhidrazina, con el objeto de detectar terpenos, alcoholes, fenoles, ésteres y compuestos carbonílicos respectivamente (11).

Fenoles totales.

Se hizo prueba cualitativa para fenoles totales presentes en el aceite esencial, aplicando 10 microlitros del aceite en una placa de sílica gel G de 250 micrones de espesor. Se hizo un recorrido monodimensional ascendente y luego se fumigó con reactivo de ácido sulfanílico diazotado, recientemente preparado (12).

FENOLES

Debido a que en el examen preliminar de los componentes del aceite presentes en las diferentes fracciones (N° 1 a N° 93) obte-

nidas por separación cromatográfica en columna, se obtuvieron resultados positivos para fenoles en muchas de las fracciones, se procedió luego a hacer aislamiento de los fenoles de manera que pudieran obtenerse cantidades suficientes y en forma completamente pura para su identificación.

Con este propósito se ensayaron varios métodos de aislamiento y purificación los cuales se describen a continuación:

1. *Método de aislamiento de fenoles totales, N° 1.*

Se tomaron 5-10 ml. de aceite esencial y se trataron, en una ampolla de separación, con 75 ml. de hidróxido de potasio 1 N y luego se agregó ácido clorhídrico 2 N hasta pH 2 - 3 y los fenoles de la solución alcalina. Se mezclaron los líquidos de extracción y luego se separó la capa acuosa. Se repitió la extracción con 25 ml. de la solución alcalina. Se mezclaron los líquidos de extracción y luego se agregó ácido clorhídrico 2 N hasta pH 2-3 y los fenoles se extrajeron con porciones de 30 ml. de éter etílico hasta que este solvente no tomó coloración amarilla y dió prueba negativa para fenoles en la capa acuosa restante.

La prueba para agotamiento de fenoles se hizo colocando unas gotas de la capa acuosa remanente sobre placas de sílica gel G activadas, de 250 micrones de espesor, secando la mancha y asperjando con reactivo de ácido sulfanílico diazotado.

Los extractos etéreos se filtraron por sulfato de sodio anhidro y luego se concentraron a baja temperatura, sobre baño de vapor. Este extracto concentrado contiene los fenoles totales presentes en el aceite.

2. *Método de aislamiento de fenoles totales, N° 2.*

Este método es una adaptación del esquema de aislamiento seguido por R. N. Acharya (13) para el aceite de Mansa. El proceso de extracción está indicado en la figura número 2.

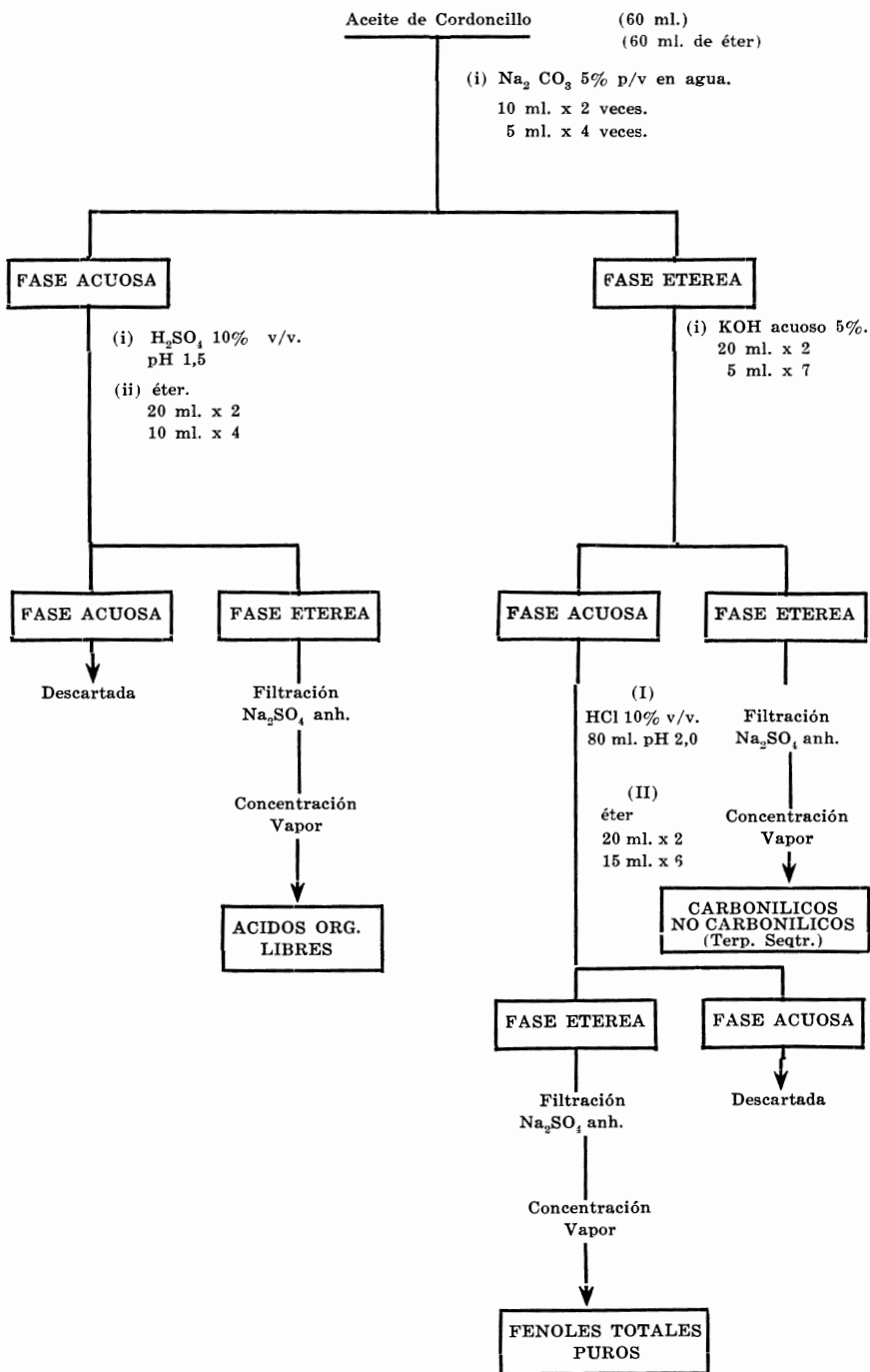


Figura Nº 2.— Esquema de separación de los componentes del aceite.

Examen preliminar de los fenoles.

Este examen se hizo con el objeto de conocer aproximadamente el número de compuestos fenólicos presentes en el aceite.

Para ello se aplicaron cantidades variables del extracto etéreo que contiene los fenoles, en placas de sílica gel G de 250 micrones de espesor y se desarrollaron en forma mono y bidimensional con varios solventes. Las placas secas se asperjaron con reactivo de ácido sulfanílico diazotado.

Con estas cromatografías se analizó el comportamiento cromatográfico de los compuestos frente a los diferentes solventes y se determinó el número de compuestos fenólicos presentes en el aceite.

Cromatografía comparativa.

El extracto etéreo que contiene los fenoles totales aislados por el método N^o 1, se colocó en cantidades de 20 microlitros, sobre placas de sílica gel G de 250 micrones, junto con soluciones clorofórmicas de eugenol, isoeugenol, carvacrol (Lucta) y timol (B. D. H.) patrones. Las placas se desarrollaron con benceno: acetato de etilo 95:5 v/v en forma ascendente. Las placas secas se asperjaron con reactivo de ácido sulfanílico diazotado. Se anotaron los valores R_f y los colores obtenidos.

El extracto etéreo que contiene los fenoles totales obtenidos por el método de extracción N^o 2, se colocó, junto con el extracto etéreo que contiene los ácidos orgánicos aislados por el mismo método, sobre placas de sílica gel G de 250 micrones. Las placas se desarrollaron con benceno: acetato de etilo 95:5 v/v.

Los fenoles se desarrollaron con reactivo de ácido sulfanílico diazotado y los ácidos se revelaron con reactivo de ácido fosfomolibdico (reactivo 120_a de Stahl) (14). Otras placas se revelaron en toda su extensión con reactivo de ácido sulfanílico diazotado.

Se registraron los colores producidos con los dos reveladores y el número de compuestos revelados.

Aislamiento y purificación de los fenoles.

Se hizo de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento cromatográfico de los compuestos fenólicos

presentes en el extracto etéreo de los fenoles totales, utilizando la técnica de banda. Para esto, se aplicaron 200 microlitros del extracto etéreo, en banda, sobre 20 placas de sílica gel G, de 500 micrones de espesor. Las placas se desarrollaron 2 veces en forma ascendente con benceno; acetato de etilo 95:5 v/v.

Luego se revelaron zonas de aproximadamente 2 cm. localizadas en los extremos de la placa, con reactivo de ácido sulfanílico diazotado. Se demarcaron las zonas correspondientes a cada compuesto, trazando líneas entre los extremos revelados y las bandas se denominaron fenol N° 1, N° 2 y N° 3, en forma descendente, siendo el fenol N° 1 la banda más móvil.

Se ensayó la localización de las bandas por medio de luz ultravioleta (365 m μ) y se demarcaron las bandas opacas, las cuales se llamaron de la misma manera que las bandas localizadas por desarrollo de color. Las bandas correspondientes a una misma denominación se rasparon y la sílica gel se trató con cloroformo para remover los fenoles. Se hizo elución hasta agotamiento de fenoles.

Los extractos clorofórmicos fueron filtrados sobre sulfato de sodio anhidro y luego se concentraron hasta unos 3 ml. Cada concentrado se denominó como la banda correspondiente.

Además se hizo cromatografía del extracto etéreo que contenía los fenoles, aplicando 5-20 microlitros del extracto sobre placas de sílica gel G de 250 micrones, junto con soluciones clorofórmicas de timol, eugenol, isoeugenol y carvacrol patrones y se desarrollaron con benceno - acetato de etilo 95:5 v/v. Como revelador se empleó el reactivo de ácido sulfanílico diazotado. Se anotaron los colores de las manchas y los valores Rf.

Placas preparadas en las mismas condiciones, pero con los concentrados etéreos de las bandas de los fenoles N° 1, N° 2, y N° 3, se desarrollaron con varios solventes y se revelaron con varios reveladores.

Como solventes se emplearon benceno y acetato de etilo en proporciones de 95:5 v/v y 80:20 v/v y cloroformo. Como reveladores se emplearon los reactivos de ácido sulfanílico diazotado, vainillina-ácido clorhídrico, (15), anisaldehído-ácido sulfúrico (16) y mezclas de reactivos de tricloruro y pentacloruro de antimonio (17).

En las mismas placas se utilizaron como patrones soluciones clorofórmicas de timol, eugenol, isoeugenol, safrol, guayacol y resorcinol. Se registraron los valores Rf y los colores obtenidos con los distintos reveladores.

Purificación de los fenoles.

Con el objeto de obtener los fenoles en forma pura y en cantidades suficientes para proceder al estudio de sus características de absorción a la luz ultravioleta y para la obtención de sus espectros al infrarrojo, se aplicaron 20 microlitros del extracto total de los fenoles sobre placas de sílica gel G y sílica gel HF 254, de 250 micrones (20 x 20 cm.) y se desarrollaron con benceno-acetato de etilo 95:5 v/v en la dirección N° 1 y con benceno puro en la dirección N° 2.

Los compuestos separados se localizaron primero por observación bajo luz ultravioleta de onda corta y onda larga, asperjando luego las placas con reactivo de ácido sulfanílico diazotado.

Las placas de sílica gel fluorescentes se demarcaron bajo luz U. V. de 254 milimicras y luego se revelaron con el mismo reactivo; se comparó la extensión de las manchas demarcadas bajo luz ultravioleta con la observada después de revelar.

Las manchas correspondientes al compuesto más abundante, observadas en las placas de sílica gel fluorescente bajo luz U. V. de 254 m μ , se rasparon, reunieron y eluyeron con cloroformo. Los eluatos se filtraron por sulfato de sodio anhidro, el cual se lavó con cloroformo para arrastrar el compuesto retenido por la sílica. El líquido se concentró a baja temperatura, con vapor de agua, hasta aproximadamente 1 ml.

El concentrado clorofórmico anterior se aplicó luego sobre placas de sílica gel G y sílica gel HF 254 de 250 micrones, en cantidades de 20 microlitros.

Las placas se desarrollaron bidimensionalmente con benceno puro en la dirección N° 1 y benceno: acetato de etilo 95:5 v/v en la dirección N° 2. Se observaron bajo luz U. V. de onda corta y de onda larga y después de asperjar con el reactivo de ácido sulfanílico diazotado. Se observó el comportamiento cromatográfico del compuesto, el número de manchas reveladas y la pureza del compuesto presente en el concentrado clorofórmico.

Con este concentrado se tomaron los espectros al U. V. utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer, Mod. 450, con celdas de 1,0 cm. de espesor y empleando éter de petróleo como solvente.

Como patrones se emplearon soluciones de timol (B.D.H.) y eugenol (B.D.H.) en éter de petróleo.

Con el concentrado clorofórmico se tomaron los espectros al infrarrojo, en un espectrofotómetro Perkin Elmer Mod. 700, con celdas de cloruro de sodio y en fase de película.

Operando en las mismas condiciones que para el fenol N° 1, se registró el espectro al infrarrojo, del timol patrón y el eugenol patrón. En iguales condiciones se determinó el espectro a los compuestos fenólicos denominados fenol N° 2 y fenol N° 3. En estos dos casos se empleó el total del compuesto fenólico extraído.

Determinación cuantitativa del timol.

Debido a que se observó que el fenol N° 1, el cual fue identificado como timol, era el compuesto fenólico más abundante en la fracción fenólica del aceite volátil, se procedió luego a su determinación cuantitativa, con el objeto de obtener valores reales de contenido de timol, que puedan servir como punto de referencia para estudios posteriores de su acción bacteriostática o bactericida, su acción farmacológica general o su acción antihelmíntica en animales de experimentación.

Los valores de contenido de timol y de fenoles totales pueden emplearse también para relacionarlos con el uso del aceite en medicina folclórica o popular, con el objeto de explicar científicamente la bondad del uso del aceite en ciertos casos específicos.

Para la determinación cuantitativa del timol se emplearon varios métodos:

Método N° 1.

Es una adaptación del método del bromuro-bromato (18).

Se tomaron 30 ml. de aceite y los fenoles totales se extrajeron por lavados sucesivos con solución acuosa de hidróxido de potasio al 10% p/v. La extracción se continuó hasta fin de fenoles, comprobado porque al aplicar unas gotas del aceite en tratamiento sobre placa de sílica, gel G, 250 micrones y asperjarla con reactivo de ácido sulfanílico diazotado no produjo ninguna coloración.

El extracto acuoso se llevó con ácido clorhídrico (1:10 v/v) hasta pH 2,0 y los fenoles totales se extrajeron con cloroformo, hasta fin de fenoles, comprobando el punto final como se describió anteriormente. El extracto etéreo se concentró a baja temperatura con ayuda de vapor y se llevó luego con éter etílico hasta un volumen de 50 ml., en un matraz aforado.

De este líquido se tomaron 25 ml., se evaporó el solvente, y se agregaron 20 ml. de ácido clorhídrico (1:1 v/v) caliente. Se adicionó un volumen exactamente medido de solución de bromuro-bromato 0,1 N. La solución se calentó en baño maría a 70-80°C, en matraz de 250 ml. con tapa de vidrio esmerilado, agitando durante el calentamiento.

Al líquido caliente se agregaron 2 gotas de solución reactivo de anaranjado de metilo y se tituló luego con la misma solución de bromuro-bromato hasta desaparición del color rosado. Se anotó este primer volumen de solución titulante gastado para la titulación directa. La solución se guardó para la siguiente titulación por retroceso.

A la solución anterior se agregó un volumen exactamente medido (3 - 5 ml.) de solución de bromuro - bromato 0,1 N indicador de almidón y 1 gm. de yoduro de potasio. El matraz se agitó y las paredes se lavaron con agua destilada. Se tituló luego por retroceso, con una solución de tiosulfato de sodio 0,1 N hasta desaparición del color violeta. El volumen de solución de bromuro-bromato 0,1 N necesario para la titulación directa corresponde a una cierta cantidad de timol según la fórmula :

1,0 ml. de solución 0,1 N de bromuro-bromato = 0,003753 gm. de timol.

El volumen de solución de tiosulfato de sodio 0,1 N necesario para la titulación por retroceso se restó del volumen total de solución de bromuro-bromato 0,1 N adicionado y el resultado se empleó para calcular la cantidad de timol presente en la alícuota, de acuerdo a la fórmula anterior.

Los resultados se relacionaron con el volumen de aceite empleado para la extracción y la alícuota tomada, y los resultados se expresaron finalmente como gramos de timol por 100 gm. de aceite. En todos los casos se tuvieron en cuenta los factores de concentración de las diferentes soluciones. Se hicieron varias determinaciones y se tomó el valor promedio.

Método N° 2.

Este método es una aplicación del método desarrollado por L. Fibranz y M. I. Blake (19). El reactivo de coloración es p-dimetilaminobenzaldehído y el color obtenido es amarillo.

Se trató de establecer la curva de calibración empleando cantidades de timol patrón entre 2 y 10 miligramos y leyendo a 430

milimicras en un colorímetro Coleman Junior, Mod. 6 C, con tubos de vidrio de 19 x 105 mm. Los volúmenes de solución patrón utilizados, con 10 mg. de timol por mililitro, los volúmenes de cloroformo y de reactivo de coloración pueden apreciarse en la tabla siguiente:

TABLA NUMERO 1

Valoración de timol con reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído.

<i>Solución</i> Nº	<i>Solución</i> <i>patrón</i> ml.	<i>Timol</i> mg.	<i>Cloroformo</i> ml.	<i>Reactivo</i> <i>de coloración</i> ml.
1	0,2	2,0	0,8	6,0
2	0,4	4,0	0,6	6,0
3	0,6	6,0	0,4	6,0
4	0,8	8,0	0,2	6,0
5	1,0	10,0	0,0	6,0

Método número 3.

Este método es una adaptación del método aplicado por J. C. Demetrius y J. E. Sinsheimer (20) para valoración de eugenol, basado en el desplazamiento batocrómico que se produce por modificación selectiva del cromóforo.

Se preparó una solución de timol en alcohol de 95°, con una concentración de 0,4 mg. de timol por mililitro.

A partir de esta solución se prepararon soluciones ácidas y soluciones alcalinas por adición de ácido sulfúrico 0,1 N e hidróxido de sodio 1 N, respectivamente, en volúmenes apropiados. Cada solución se llevó luego a 100 ml. con agua destilada. La forma de preparación de las soluciones puede observarse en las siguientes tablas:

TABLA NUMERO 2

Soluciones ácidas de timol.

<i>Solución</i> Nº	<i>Solución</i> <i>timol</i> <i>ml.</i>	<i>A. sulfúrico</i> <i>0,1 N-ml.</i>	<i>Agua</i> <i>c.s.p.</i> <i>ml.</i>	<i>pH.</i>	<i>Concentración</i> <i>de timol</i> <i>mg./100 ml.</i>
1	1,0	0,2	100	3,85	0,4
2	2,0	0,4	100	3,80	0,8
3	3,0	0,6	100	3,50	1,2
4	4,0	0,8	100	3,20	1,6
5	5,0	1,0	100	3,25	2,0
6	1,0	0,2	100	—	0,4
7	2,0	0,4	100	—	0,8
8	3,0	0,6	100	—	1,2
9	4,0	0,8	100	—	1,6
10	5,0	1,0	100	—	2,0

TABLA NUMERO 3

Soluciones alcalinas de timol

<i>Solución</i> Nº	<i>Solución</i> <i>timol</i> <i>ml.</i>	<i>H. de sodio</i> <i>1 N-ml.</i>	<i>Agua</i> <i>c.s.p.</i> <i>ml.</i>	<i>pH.</i>	<i>Concentración</i> <i>de timol</i> <i>mg./100 ml.</i>
1	1,0	0,2	100	10,25	0,4
2	2,0	0,4	100	11,50	0,8
3	3,0	0,6	100	11,70	1,2
4	4,0	0,8	100	11,70	1,6
5	5,0	1,0	100	11,85	2,0
6	1,0	0,2	100	—	0,4
7	2,0	0,4	100	—	0,8
8	3,0	0,6	100	—	1,2
9	4,0	0,8	100	—	1,6
10	5,0	1,0	100	—	2,0

Las soluciones problema se prepararon a partir de los fenoles totales presentes en 50 ml. de aceite, por separación según el método de aislamiento N° 2. El extracto concentrado se llevó a 10 ml. con cloroformo. De esta solución se tomó 1,0 ml., se evaporó el solvente y se llevó a 10,0 ml. con etanol de 95%. De esta solución se tomó 1,0 ml. y se adicionó 1,0 ml. de ácido sulfúrico 0,1 N para la solución ácida y 1,0 ml. de hidróxido de sodio 1 N para la solución alcalina. Las soluciones se completaron a 100 ml. con agua destilada.

Con cada una de estas diluciones se hicieron las lecturas correspondientes en un espectrofotómetro Perkin Elmer Mod. 139 a 292 m μ , con celdas de 1,0 cm. de espesor, utilizando las soluciones ácidas correspondientes como blanco para las soluciones alcalinas.

Con las soluciones de timol patrón se calculó luego el valor de Δe e de acuerdo con la fórmula:

$$\Delta e = \frac{\Delta A \times 150,22}{C}$$

donde:

Δe = Absorbancia, a 292 m μ , de una solución 1 M de timol en medio alcalino menos la absorbancia de una solución 1 M de timol en medio ácido.

ΔA = La absorbancia observada de una solución de timol de concentración dada, en medio alcalino, menos la absorbancia de una solución con la misma concentración de timol en medio ácido.

150,22 = Peso molecular del timol.

C = Concentración de la solución en gm./litro.

El cálculo del valor de Δe se hizo para cada solución patrón y luego se calculó el valor promedio.

La concentración de timol en la solución problema se calculó por medio de la fórmula:

$$C = \frac{\Delta A \times 150,22}{\Delta e}$$

donde:

C = Concentración de timol en gramos por litro de solución.

ΔA = Absorbancia leída para el problema.

150,22 = Peso molecular del timol.

Δe = Valor calculado anteriormente para la solución de timol
1 M.

Cromatografía en fase gaseosa.

Se hicieron ensayos tendientes a lograr separación de los fenoles presentes en la fracción etérea de extracción de estos compuestos. Se tomaron como referencia las condiciones de trabajo especificadas por R. N. Acharya y M. G. Chaubal (21) y por I. Kushnir; P. A. Barr, etc. (22).

En los dos casos se empleó un cromatógrafo Perkin Elmer Mod. 880, con detector de ionización de llama y con nitrógeno como gas de arrastre.

Las condiciones de la técnica tuvieron que ser cambiadas para adaptarlas a las condiciones del laboratorio, según el siguiente cuadro:

Temperatura del puerto de inyección: 200°C.

Temperatura de la columna: 180°C.

Temperatura del detector: 250°C.

Fase estacionaria: ECNSS-M (Cianoetil Silicona) (23) sobre Cromosorb (R) W malla 80.

Gas de arrastre: nitrógeno.

Presión de entrada: 50 lb/pulg.².

Columna de vidrio: $\frac{1}{4}$ pulgada de diámetro y 10 pies de longitud.

Alícuotas aplicadas: 3 y 5 microlitros de solución de timol en éter de petróleo en concentración de 10 mg. por 100 ml.

Tiempo de registro: 65 minutos.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El material vegetal.

Se observó que aunque el material de estudio fue recolectado en tres épocas diferentes, las hojas, que constituyen la parte de la planta que fue sometida a extracción, presentan el mismo aspecto general con su olor pronunciado, quenopodiáceo y muy diferenciado.

Extracción del aceite.

Durante el proceso de destilación por arrastre de vapor se observó la presencia de un olor penetrante característico, en toda la zona de destilación.

Se observó además que el método A de extracción es mucho más engorroso que el método B. Además el primer método, por causas atribuibles probablemente al solvente y al cloruro de sodio tiende a adquirir una coloración amarilla. Este color podría explicarse si se tiene en cuenta que el mismo proceso de destilación, las impurezas presentes en el cloruro de sodio y el éter de petróleo pueden causar oxidaciones. Por otra parte, el método resulta más costoso que el segundo porque en las condiciones normales de laboratorio, no se puede hacer recuperación del solvente.

El método B. permite obtener más eficiencia y rendimiento en la destilación debido a que se puede colocar más material para cada extracción. Además este método elimina el uso de cantidades apreciables de cloruro de sodio y de solvente, reduciendo al mínimo la presencia de impurezas capaces de causar oxidaciones. Además, el proceso resulta más cómodo y seguro debido al sistema de recolección del destilado y separación del aceite. Además es práctico y económico para trabajos de esta naturaleza a nivel de laboratorio y a escala semindustrial.

Determinación del rendimiento.

Se determinó 5 veces en las condiciones ya citadas y el valor promedio es de 3,6% p/p.

Determinación de las constantes fisicoquímicas.

Los siguientes valores son resultados promedios de varias determinaciones:

Índice de acidez: 0,325 — 0,510 mg. de hidróxido de potasio por 10 gm. de aceite.

Índice de saponificación: 2,55 mg. de hidróxido de potasio por 100 gm. de aceite.

Índice de ésteres antes de acetilación: 2,125 mg. de hidróxido de potasio.

Índice de ésteres después de acetilación: 8,20 mg. de hidróxido de potasio.

Rotación óptica: = + 3,11° — + 3,56°

Densidad a 18°C = 1,0303. Aldehídos totales: 20%.

Solubilidad (24): Insoluble en alcohol de 60°. Ligeramente soluble en alcohol de 80°. Muy soluble en alcohol de 90°, 1 ml. de aceite se disuelve en 0,9 ml. de alcohol de 90°. Perfectamente soluble en alcohol de 97°, 1 ml. de aceite se disolvió en 0,1 ml. de alcohol.

Indice de refracción a 18°C: 1,5217 — 1,5232.

Comparando los valores anteriores con los correspondientes al aceite de "Matico" se observa que guardan gran relación entre ellos.

Cromatografía en capa fina de las fracciones N° 1 a N° 93.

Los resultados obtenidos en el examen cualitativo, por cromatografía en capa fina, de las fracciones obtenidas por separación cromatográfica en columna, están resumidos en la tabla siguiente:

TABLA NUMERO 4

<i>Fracción N°</i>	<i>Vol. Acum. ml.</i>	<i>Fenol</i>	<i>Terp. Alch. ésteres</i>	<i>Comp. carbon.</i>	<i>Comentarios</i>
1	7,5	—	—	—	No hay compuestos.
2	15,0	—	+	—	Reacción fuerte, azul.
3	22,5	—	+	—	Azul negruzco.
4	30,0	+	—	—	Dos manchas fuertes.
5	37,5	+	—	—	Una mancha fuerte.
6	45,0	+	+	—	Fenoles más móviles.
7	52,5	+	+	—	Idem.
8	60,0	+	+	—	Idem.
9	67,5	—	+	—	Fracción bastante móvil.
10	75,0	—	+	—	Idem.
11	82,5	+	+	—	Fenoles y terpenos muy abundantes.
12	90,0	+	+	—	Idem.
13	97,5	+	+	—	Terpenos muy abund.
14	105,0	+	+	—	Idem.
16-19	127,5	+	—	+	Terpenos negativos.
20	135,0	—	—	+	Reacción abundante.
21	142,5	+	—	+	Reacción regular.
22-24	157,5	+	—	+	Idem.

<i>Fracción Nº</i>	<i>Vol. Acum. ml.</i>	<i>Fenol</i>	<i>Terp. Alch. ésteres</i>	<i>Comp. carbon.</i>	<i>Comentarios</i>
25-27	172,0	±	—	+	Carbonílicos muy abundantes.
28	180,0	+	—	+	Idem. Buena separación.
29-33	210,5	+	—	—	Reacción tenue.
34-38	240,5	±	—	+	Carbonílicos muy abundantes.
39-49	315,5	—	—	+	Muy abundantes.
50-57	438,0	—	—	—	Negativa.
58	445,5	—	—	+	Color dudoso.
59	453,0	—	—	—	Totalmente negativo.
60-63	475,5	—	—	±	Rojo violeta dudoso.
64-70	420,5	—	±	—	Color violeta tenue que cambia a pardo por calentamiento. Reactivo 2,4 DNFH.
70-93	593,0	—	—	—	Extracción agotada.

La separación de los componentes del aceite por cromatografía en columna resulta apropiada para hacer un examen general de la naturaleza de los componentes por cromatografía en capa fina y puede permitir su identificación si se dispone de medios suficientes para trabajar en cromatografía en fase gaseosa, debido a la sensibilidad de este método.

Métodos de aislamiento de los fenoles.

Se observó diferencia de comportamiento del medio durante el proceso de extracción de los fenoles. En el segundo método de extracción, con el cual se logran separar los ácidos antes de extraer los fenoles, se nota que la coloración impartida al líquido de extracción de los fenoles es menos acentuada que en el método N^o 1, debido a que muchos de los ácidos extraídos con el carbonato alcalino, pueden ser responsables del color amarillo naranja impartido al medio extractor, el cual en el método N^o 1 extrae conjuntamente ácidos y fenoles.

El método de extracción N^o 2 es entonces mucho más conveniente que el N^o 1 porque permite obtener 3 fracciones bastante puras de ácidos orgánicos, fenoles y compuestos carbonílicos y no carbonílicos (terpenos, sesquiterpenos, ésteres, alcoholes, etc.). Además descarta cualquier interferencia de los ácidos con los fenos-

les, cuando se separan conjuntamente como en el método N^o 1, aumentando la eficiencia de la separación y la pureza de los compuestos para los análisis de identidad.

Examen preliminar de los fenoles.

Los resultados obtenidos en el examen preliminar de los fenoles pueden verse en la tabla siguiente:

TABLA NUMERO 5

Material: Extracto etéreo de los fenoles totales. (Método de extracción N^o 1).

Placas: Sílica gel G, 250 micrones.

Revelador: Reactivo de ácido sulfanílico diazotado.

Desarrollo: Monodimensional ascendente.

<i>Solvente</i>	<i>Mancha N^o</i>	<i>Rf.</i>	<i>Comentarios</i>
Benceno	1	0,53	Amarillo oro con halo pardo. Muy prominente.
	2	0,25	Violeta.
	3	0,15	Rojiza, tenue.
	4	0	Poco visible.
Benceno:	1	0,42	Amarillo, halo pardo. Dos cm. de diámetro. Muy prominente.
Acetato de etilo 95:5 v/v	2	0,27	Violeta.
	3	0,18	Rojiza.
	4	—	Pardo, muy poco visible.

De estos resultados se pudo concluir que hay por lo menos 4 compuestos diferentes en el extracto etéreo de los fenoles y que de ellos por lo menos el compuesto N^o 1, el más móvil, es definitivamente un fenol, debido a que presenta la coloración amarilla característica de los fenoles al reaccionar con el reactivo de ácido sulfanílico diazotado.

Por la intensidad de las coloraciones se puede concluir que en el extracto etéreo obtenido por el método N^o 1, el compuesto más abundante representa más del 90% del contenido total de fenoles en el extracto y por ende en el aceite.

Se concluye además que el solvente de benceno: acetato de etilo 95:5 v/v ofrece buenas capacidades de separación de los diferentes compuestos y que su eficiencia como solvente para separación masiva podría aumentarse haciendo dos recorridos en lugar de uno, en la misma dirección.

Cromatografía comparativa.

Los resultados obtenidos pueden apreciarse en la tabla siguiente:

TABLA NUMERO 6

Solvente: Benceno: acetato de etilo 95:5 v/v. Una vez ascendente.

Placas: Sílica gel G, 250 micrones.

Revelador: Reactivo de ácido sulfanílico diazotado.

<i>Compuesto</i>	<i>Mancha N^o</i>	<i>Rf.</i>	<i>Colores y comentarios</i>
Ext. fenoles	1	0,40	Amarillo halo pardo. Muy prominente.
	2	0,23	Violeta.
	3	0,15	Rojiza.
	4	—	Pardo. Poco perceptible.
Timol		0,47	Amarillo halo pardo.
Eugenol		0,39	Rojizo oscuro.
Isoeugenol		0,39	Pardo.
Carvacrol		0,33	Amarrillo anaranjado, halo pardo. Impuro.

De aquí se pudo concluir que el compuesto fenólico presente en la mancha N^o 1, se aproxima bastante en sus características cromatográficas y su reacción frente al revelador, a las propiedades del timol patrón.

Se concluyó además que la muestra de carvacrol suministrada como compuesto patrón, no puede emplearse como tal por estar impurificada.

Los resultados obtenidos en las cromatografías comparativas de las fracciones etéreas que contienen los ácidos orgánicos y los fenoles, permiten concluir que en el extracto etéreo que contienen los fenoles se extraen 5 compuestos. El compuesto más importante representa por lo menos el 90% del total de los fenoles extraídos. Además, se trata de un fenol, puesto que produce el color característico de los fenoles al reaccionar con el reactivo de ácido sulfánico diazotado (25).

Los otros compuestos son mucho menos abundantes y no producen las reacciones características de los fenoles.

Los cromatogramas nos permiten concluir igualmente que el método de extracción de fenoles N° 2, permite separar efectivamente los fenoles de los ácidos orgánicos. Además se observa que por sus características cromatográficas, la extracción conjunta de ácidos y fenoles tal como se hace en el método de extracción de fenoles N° 1, podría causar interferencia en el análisis cualitativo y aun cuantitativo de los fenoles.

Además las condiciones de la cromatografía permiten separar efectivamente unos 7 ácidos diferentes y unos 5 fenoles. Algunos ácidos, especialmente los localizados a la altura de la mancha más prominente de compuestos fenólicos, producen el color característico de los fenoles y en consecuencia puede tratarse de ácidos fenólicos puesto que reaccionan como ácido y como fenol. Esto refuerza la conclusión anterior, puesto que si los compuestos ácidos tienen grupos fenólicos en su molécula son extraídos con los fenoles de acuerdo con el método de extracción N° 1 y podrían estar enmascarados con los fenoles en la separación cromatográfica, mucho más si se tiene en cuenta que el compuesto fenólico es mucho más abundante.

Puede entonces concluirse que es muy importante extraer previamente los ácidos y luego los fenoles como se hizo en el método de extracción de fenoles N° 2.

Aislamiento y purificación de los fenoles.

El aislamiento en placas de sílica gel de 500 micrones de espesor y con la técnica de banda permite concluir que los dos reco-

rridos con el solvente producen buena separación de las diferentes bandas para las purificaciones posteriores.

La localización de las bandas con ayuda de la luz U. V., permite una mejor demarcación de ellas, aumenta el rendimiento y facilita la operación y la obtención de bandas más puras, que el método de coloración por aspersion del reactivo sobre los extremos de las placas, puesto que las bandas tienen tendencia a desplazarse más rápidamente en sus extremos que en el centro, dando bandas ligeramente curvas, las cuales dejarían parte de la banda por fuera de las líneas paralelas de demarcación obtenidas por unión de las zonas coloreadas localizadas a ambos lados de la placa.

Por otra parte, la concentración de los compuestos removidos resulta mucho mayor en el eluato correspondiente a la banda del compuesto que produce el color amarillo oro al reaccionar con el reactivo de coloración.

Los resultados obtenidos en las cromatografías de los extractos clorofórmicos de los compuestos presentes en las bandas denominadas fenol N° 1, N° 2 y N° 3 pueden observarse en las tablas siguientes:

TABLA NUMERO 7

Sílica gel G, 250 micrones (20 x 20 cm.).

Solvente: Benceno: acetato de etilo 80:20 v/v.

Revelador: Reactivo de vainillina - ácido clorhídrico.

<i>Compuesto</i>	<i>Rf.</i>	<i>Color</i>	<i>Comentarios</i>
Fenol N° 1	0,84	Rosado	Se comporta como el timol patrón.
Fenol N° 2	a) 0,68 b) 0,63 c) 0,23	Violeta Rojo punzó Rojo punzó	Muy parecido al resorcinol patrón.
Fenol N° 3	a) 0,69 b) 0,64	Violeta Anaranjado-rojizo	
Timol	0,84	Rosado	
Eugenol	—	—	No aparece.
Isoeugenol	0,76	Violeta	
Safrol	—	—	No aparece.
Guayacol	0,73	Rosado pálido	Tenue, reacción retardada.
Resorcinol	0,24	Rojo punzó	

TABLA NUMERO 8

Sílica gel G, 250 micrones (20 x 20 cm.).

Solvente: Benceno: acetato de etilo 95:5 v/v.

Revelador: Reactivo de ácido sulfanílico diazotado.

<i>Compuesto</i>	<i>Rf.</i>	<i>Color</i>	<i>Comentarios</i>
Fenol N° 1	0,45	Amarillo-halo pardo	Mancha clara, diferenciada.
Fenol N° 2	0,025	Rojo ladrillo amar.	Condensada, tenue, poco móvil.
Fenol N° 3	0,22	Rojo parduzco	Tenue. Difícil de distinguir.
Timol	0,45	Amarillo-halo pardo	Mancha clara, diferenciada.
Eugenol	0,41	Pardo rojizo	Diferenciada.
Isoeugenol	0,41	Pardo rojizo	Diferenciada.
Safrol	—	—	No aparece.
Guayacol	0,41	Amarillo anaranjado	Diferenciada.
Resorcinol	0,025	Amarillo oscuro	Condensada, poco móvil.

TABLA NUMERO 9

Sílica gel G, 250 micrones (20 x 20 cm.).

Solvente: Cloroformo.

Revelador: Anisaldehído - ácido sulfúrico.

<i>Compuesto</i>	<i>Rf.</i>	<i>Color</i>	<i>Comentarios</i>
Fenol N° 1	0,61	Rojo	Color y posición como timol patrón.
Fenol N° 2	a) 0,92 b) 0,61	Violeta Violeta	
Fenol N° 3	a) 0,92 b) 0,64 c) 0,59	Violeta Pardo Violeta	Condensada y pura.
Timol	0,62	Rojo	
Isoeugenol	0,75	Violeta	
Eugenol	0,75	Gris	
Safrol	0,91	Violeta	
Guayacol	0,74	Rosado	Reacción retardada hasta 24 horas.
Resorcinol	0,0	Rojo oscuro	Inmóvil.

TABLA NUMERO 10

Sílica gel G, 250 micrones (20 x 20 cm.).

Solventes: benceno: acetato de etilo 80:20 v/v.

Cloroformo.

Reveladores: Mezcla 1:1 v/v de reactivos de tricloruro y pentacloruro de antimonio, antes y después de calentar 10 minutos a 100-105°C.

<i>Compuesto</i>	<i>Antes</i>	<i>Color</i>	<i>Después</i>	<i>Valores Rf.</i>	
				<i>B:A.Et.80:20</i>	<i>Cloroformo</i>
Fenol N° 1	Rosado-violáceo		Rojo azulado	0,81	0,63
Fenol N° 2	—		Pardo-claro	—	0,68
Fenol N° 3	Pardo-violáceo		Pardo	0,60	0,60
Timol	Rosado-violáceo		Rojo azulado	0,83	0,62
Eugenol	Pardo-violáceo		Pardo-grisáceo	0,83	0,85
Isoeugenol	Violeta		Violeta	0,75	0,70
Guayacol	Gris		Gris-oscuro	0,25	0
Resorcinol	Anaranj. Parduz.		Pardo	0,73	0,71
Safrol	—		Gris-violáceo	0,89	0,92

Los resultados consignados en la Tabla N° 7, permiten concluir que el compuesto denominado fenol N° 1 es igual al timol patrón en su comportamiento cromatográfico y sus reacciones de color frente al revelador. También se observa que los compuestos denominados fenol N° 2 y fenol N° 3 no son un solo compuesto sino una mezcla de 3 y 2 compuestos respectivamente.

Se observa además que el compuesto menos móvil del fenol N° 2, se comporta cromatográficamente y frente al revelador, en forma igual al resorcinol patrón.

La Tabla N° 8 pone de manifiesto que el fenol N° 1 se comporta lo mismo que el timol patrón. Aunque se emplearon las mismas cantidades que en el cromatograma de la Tabla N° 7, los compuestos denominados fenol N° 2 y fenol N° 3 no dan sino una sola mancha con este solvente y su comportamiento cromatográfico y las reacciones de color no corresponden a ninguno de los patrones empleados y son difíciles de observar.

La Tabla N° 9 permite concluir que el comportamiento cromatográfico y las reacciones de color del fenol N° 1 son iguales a las del timol patrón. Los fenoles N° 2 y N° 3 producen manchas múltiples con este solvente. La mancha más móvil del fenol N° 2 se comporta en forma similar al safrol patrón, lo mismo que la mancha más móvil del fenol N° 3. Las otras manchas de estos compuestos no se parecen a ninguno de los patrones empleados y su concentración es muy baja.

La Tabla N° 10 permite concluir que el fenol N° 1 se comporta igual al timol patrón. Los fenoles N° 2 y N° 3 no se parecen en su comportamiento general a ninguno de los patrones empleados.

El comportamiento del fenol N° 1 frente a los diferentes solventes y reveladores permite concluir que se trata de timol. Sus valores Rf. y sus reacciones de coloración no dejan lugar a dudas sobre su identidad. Los fenoles N° 2 y N° 3 sufren separaciones en 2 y hasta 3 compuestos diferentes con algunos de los solventes, sus reacciones de coloración y sus movilidades relativas son diferentes a las de los compuestos patrones empleados.

Se observa además que sus concentraciones en relación con la concentración del compuesto más importante en el extracto de los fenoles totales es tan baja que sería muy difícil lograr separar cantidades suficientes y en forma pura para proceder a su identificación.

Debido a estos factores se decidió concentrar todos los esfuerzos en el estudio del compuesto más abundante, o sea el fenol N° 1.

Purificación de los fenoles.

Se observó que la combinación de solventes empleados en la cromatografía bidimensional produce separación de 5 compuestos diferentes. El compuesto más abundante se mueve hacia el centro de la placa y su concentración es varias veces mayor que la del resto de compuestos. Se observó además que la sílica gel HF₂₅₄ ofrece buen medio de contraste para la localización de las manchas.

Al revelar las placas con el reactivo de coloración, se observó que las manchas resultan un poco más grandes que las demarcadas bajo luz U. V. Esto da cierto margen de seguridad en la pureza del compuesto aislado, pero el fenómeno debe tenerse en cuenta si se pretende emplear este método como medio de separación en un análisis cuantitativo.

En la cromatografía bidimensional hecha para comprobar la pureza del compuesto aislado se observó una sola mancha compacta, del mismo color y con las mismas características que el compuesto correspondiente y en consecuencia se concluyó que podría emplearse para tomar los espectros al U. V. y al infrarrojo.

Espectrofotometría al ultravioleta y al infrarrojo.

Los resultados obtenidos al registrar los espectros de absorción a la luz U. V. pueden apreciarse en las figuras números 3 y 4 y en la tabla N° 11.

TABLA NUMERO 11

Características de absorción al ultravioleta.

<i>Compuesto</i>	<i>Max. 1 mμ.</i>	<i>Max. 2 mμ.</i>	<i>Max. 3 mμ.</i>
Fenol N° 1	280,0	272,5	220,0
Timol patrón	280,0	272,2	220,0
Eugenol patrón	285,8	278,2	

Los valores consignados en la Tabla N° 11 y las figuras números 3 y 4 permiten concluir que el fenol N° 1 se comporta íntegramente como el timol patrón. Hay coincidencia en la forma de los espectros y en la longitud de onda de los máximos. Esto corrobora la conclusión alcanzada por análisis del comportamiento cromatográfico y las reacciones de coloración, en el sentido de que el fenol N° 1 es timol.

Los resultados obtenidos al tomar los espectros al infrarrojo pueden observarse en las figuras números 5, 6 y 7. Observando estos espectros se advierte que los espectros correspondientes al fenol N° 1 y al timol son claramente superponibles y en consecuencia no hay lugar a dudas sobre la identidad de este compuesto.

Se observó, al registrar los espectros, que las bandas de aromaticidad y sustitución que debieran verse en la zona comprendida entre 5 y 7 micrones (2.000 a 1.429 cm^{-1}) no son muy claras, aun en el caso del patrón, y aunque se trata indudablemente de un compuesto aromático. Sin embargo, los espectros resultan

SAMPLE _____
 ORIGIN _____
 SOLVENT _____
 CONC. _____

CELL PATH _____
 REFERENCE _____
 OPERATOR _____
 REMARKS _____

SLIT WIDTH _____
 RESOLUTION _____
 SCAN SPEED _____

CURVE NO. _____
 ORD. EXP. _____
 PEN RESPONSE _____
 DATE _____

UV -
 130-1054

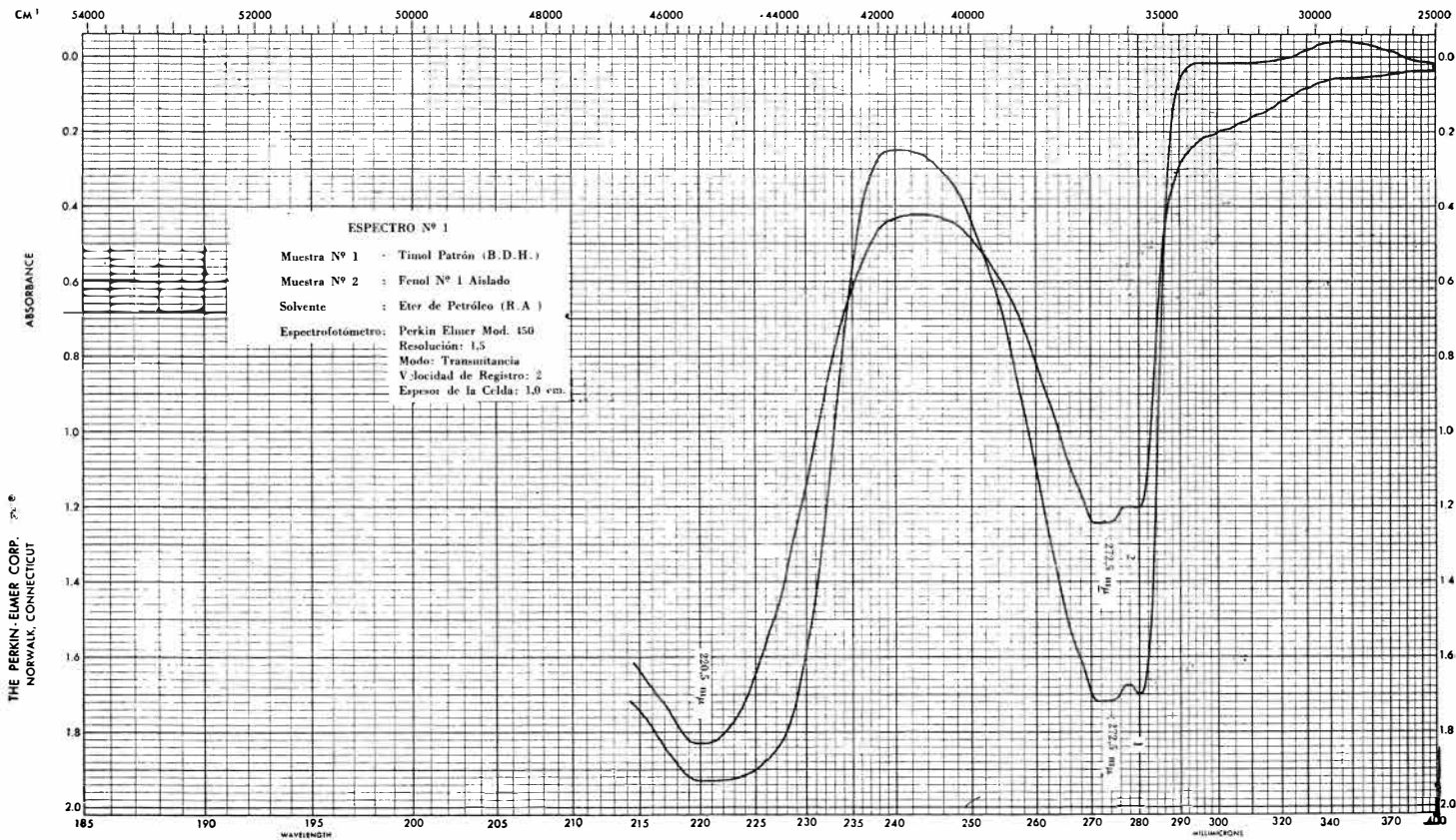


Figura Nº 3.— Espectros de absorción del fenol número 1 y del timol patrón.

SAMPLE _____
 SOLVENT _____
 CONC. _____
 CELL _____

THE PERKIN-ELMER CORP.
 NORWALK, CONN.



SERIAL NO. _____
 SLIT _____
 SCANNING TIME _____
 DATE _____

3999

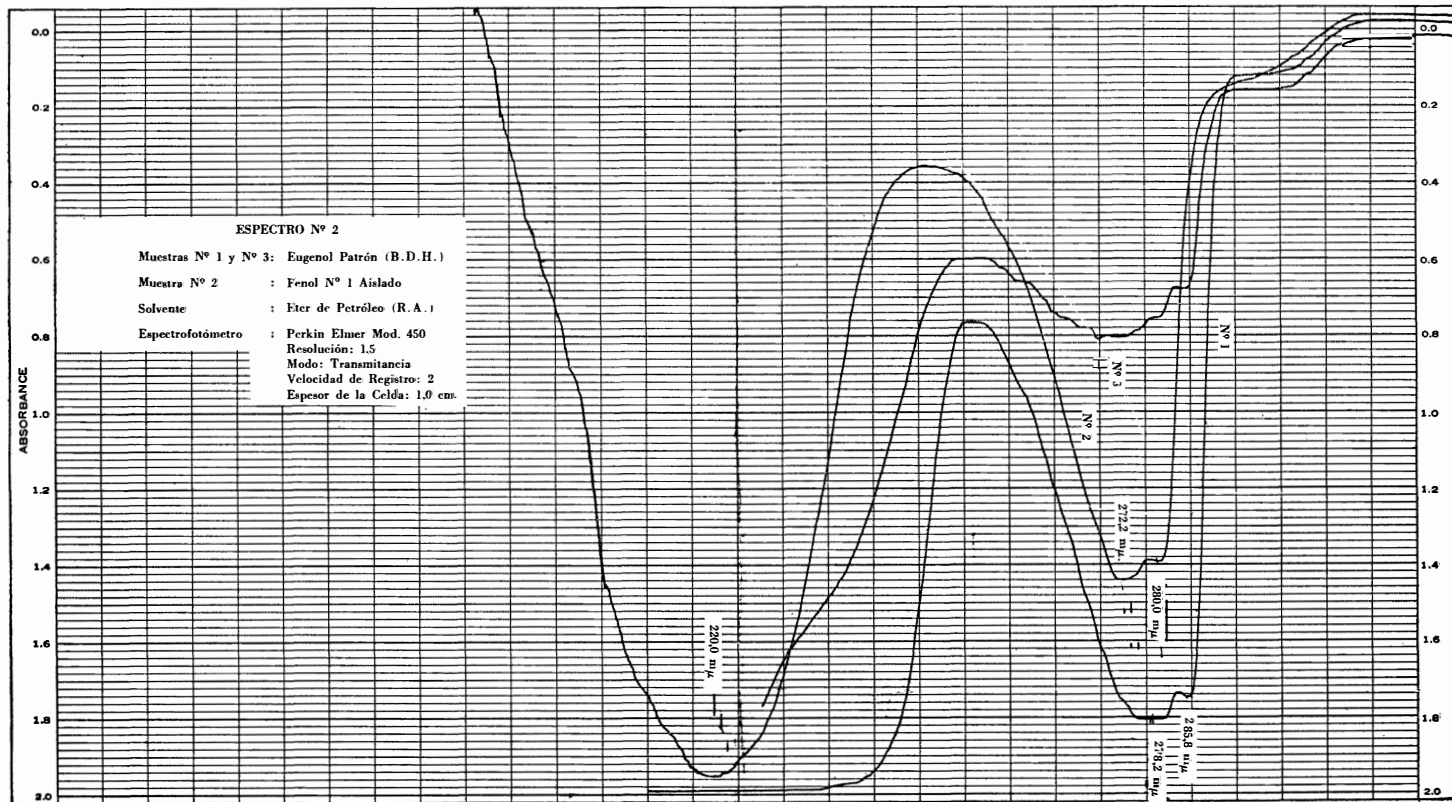


Figura Nº 4. — Espectros de absorción del fenol número 1 y del eugenol patrón.

NO. 007-1061

REMARKS	ORIGIN: <u>Aislado de Aceite Esencial de Piper</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700
	<u>lentirellosum C.D.C.</u>	
	PURITY _____	
	PHASE <u>Película en Cloroformo</u>	
	CONCENTRATION _____	
	THICKNESS _____	
DATE <u>Octubre 22 de 1971</u>	SPECTRUM NO. <u>3</u>	
OPERATOR <u>Stella de Nigrinis</u>	SAMPLE 1 <u>Fenol N° 1</u>	
	SAMPLE 2 _____	

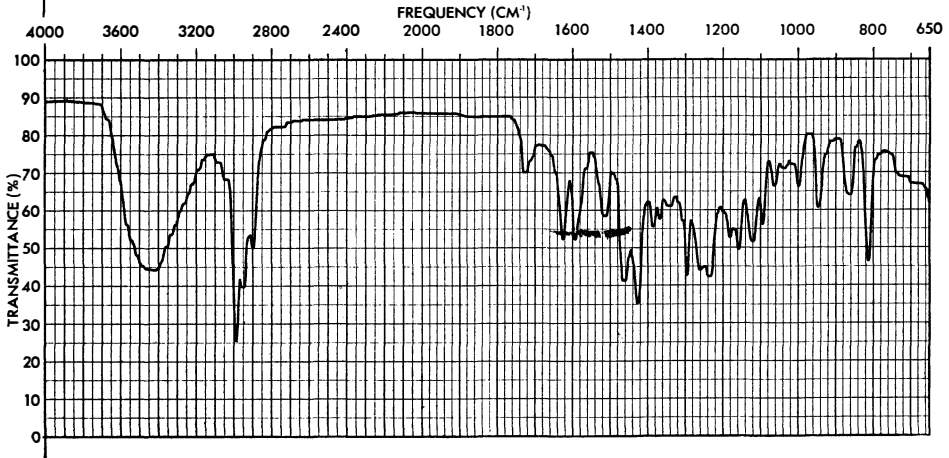


Figura N° 5

NO. 007-1061

REMARKS	ORIGIN <u>B. D. H.</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700
	PURITY <u>99.97 %</u>	
	PHASE <u>Película en Cloroformo</u>	
	CONCENTRATION <u>1 %</u>	
	THICKNESS _____	
	DATE <u>Octubre 5 de 1971</u>	
OPERATOR <u>Stella de Nigrinis</u>	SAMPLE 1 <u>Timol Patrón</u>	
	SAMPLE 2 _____	

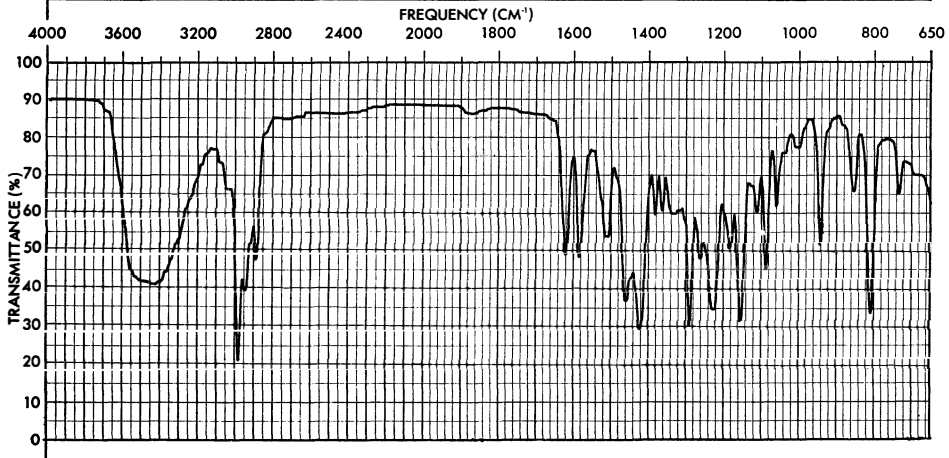


Figura N° 6

NO. 007-1061

REMARKS	ORIGIN <u>Aislados de Aceite Esencial de Piper</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700
	<u><i>lenticillosum</i> C.DC.</u>	
	PURITY _____	
	PHASE <u>Película en Cloroformo</u>	
	CONCENTRATION _____	
	THICKNESS _____	
DATE <u>Octubre 15 de 1971</u>	SPECTRUM NO. <u>5</u>	
OPERATOR <u>Stella de Nigrinis</u>	SAMPLE 1 <u>Fenoles Totales</u>	
	SAMPLE 2 _____	

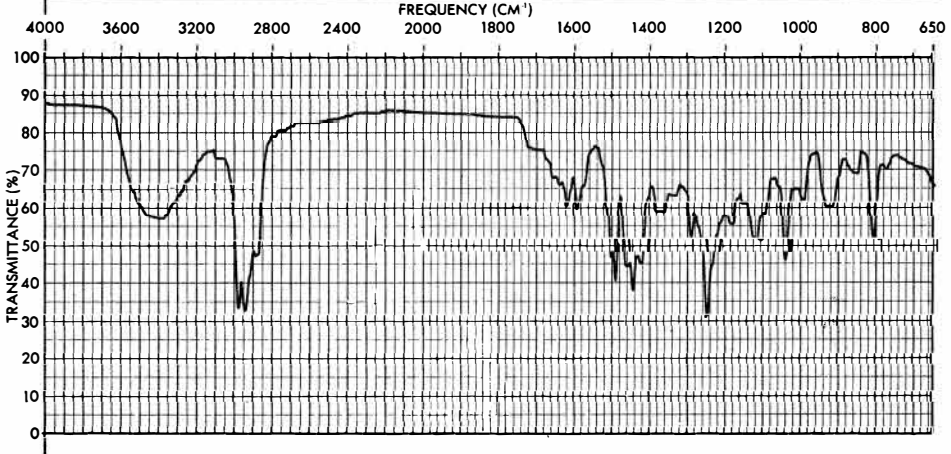


Figura N° 7

NO. 007-1061

REMARKS Se empleó el total del compuesto aislado.	ORIGIN <u>Aislado de Aceite Esencial de Piper</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700
	<u><i>lenticillosum</i> C.DC.</u>	
	PURITY _____	
	PHASE <u>Película en Cloroformo</u>	
	CONCENTRATION _____	
	THICKNESS _____	
DATE <u>Octubre 29 de 1971</u>	SPECTRUM NO. <u>6</u>	
OPERATOR <u>Stella de Nigrinis</u>	SAMPLE 1 <u>Fenol N° 2</u>	
	SAMPLE 2 _____	

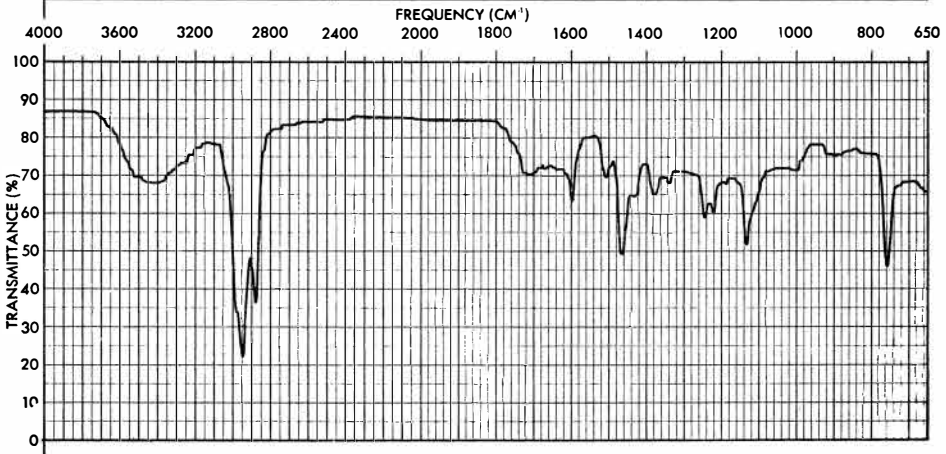


Figura N° 8

SAMPLE

SPECTRUM NO.

SAMPLE

SPECTRUM NO.

tan claramente superponibles que no es necesario depender de esas bandas para concluir que efectivamente el fenol N° 1 y el timol son los mismos compuestos.

Con el propósito de obtener alguna información adicional sobre la naturaleza de los fenoles N° 2 y N° 3 se determinaron los espectros al infrarrojo. En este caso se empleó el total de extracto de cada compuesto o mezcla de compuestos presentes en el aceite.

Las cantidades de estas sustancias presentes en las mezclas denominadas fenol N° 2 y fenol N° 3, es tan baja que sería difícil tratar de obtener los diferentes compuestos suficientemente puros para su identificación por este método.

Esto puede observarse en los cromatogramas y en los espectros I. R., (figuras números 8 y 9) puesto que aun empleando el total de los compuestos presentes en el volumen de aceite empleado para la extracción (60 ml.), el instrumento no puede dar resolución suficiente como para proceder a un análisis estructural. A pesar de las limitaciones inherentes a este tipo de investigaciones, se considera que la espectrofotometría al ultravioleta y al infrarrojo son complemento en la identificación y valoración de los componentes del aceite volátil. Con fines de comparación se incluye el espectro I. R. del eugenol patrón (Figura N° 10).

Determinación cuantitativa de timol.

A continuación se presenta la manera de calcular el contenido de timol en el aceite, por el método N° 1.

Titulación directa.

Alicuota: 25 ml. de extracto clorofórmico de los fenoles totales extraídos a partir de 30 ml. de aceite.

Volumen de titulante: 22,08 ml. de solución de bromuro-bromato 0,1 N.

La alícuota tomada contiene los fenoles presentes en 15 ml. de aceite, los cuales corresponden a 15,4545 gm. de aceite (densidad 1,0303).

El contenido de timol presente en los 15,4545 gm. de aceite se calculó así:

22,085 ml. de bromuro-bromato 0,1 N x 0,003753 = 0,08288 gm. de timol.

El contenido total sería de 0,536 gm. de timol por 100 gm. de aceite.

NO. 007-1061

REMARKS Se empleó el total del compuesto aislado. ^{sto}	ORIGIN <u>Aislado de Aceite Esencial de <i>Piper lenticellusum</i> C. DC.</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700 SPECTRUM NO. <u>7</u> SAMPLE 1 <u>Fenol N° 3</u> SAMPLE 2 _____
	PURITY _____	
	PHASE <u>Película en Cloroformo</u>	
	CONCENTRATION _____	
	THICKNESS _____	
	DATE <u>Noviembre 5 de 1971</u> OPERATOR <u>Stella de Nigrinis</u>	

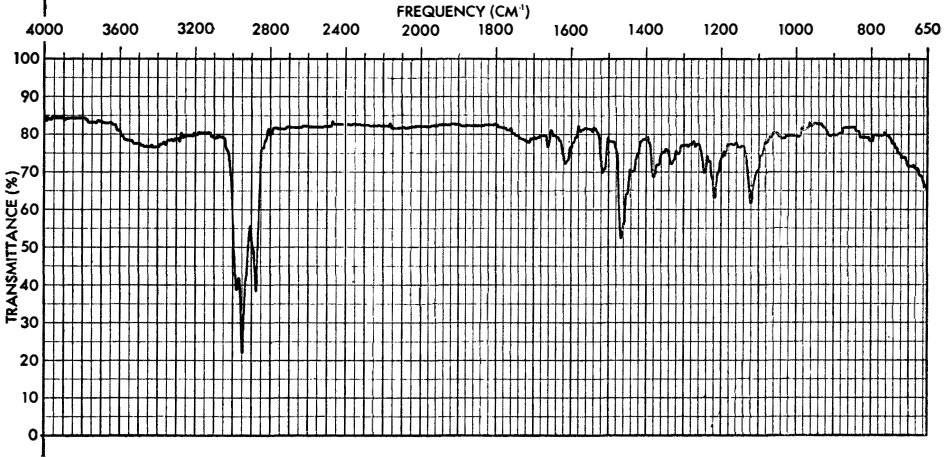


Figura N° 9

NO. 007-1061

REMARKS	ORIGIN <u>B. D. H.</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700 SPECTRUM NO. <u>8</u> SAMPLE 1 <u>Eugenol Patrón</u> SAMPLE 2 _____
	PURITY _____	
	PHASE <u>Película en Cloroformo ormo.</u>	
	CONCENTRATION <u>1 %</u>	
	THICKNESS _____	
	DATE <u>Noviembre 3 de 1971</u> OPERATOR <u>Stella de Nigrinis</u>	

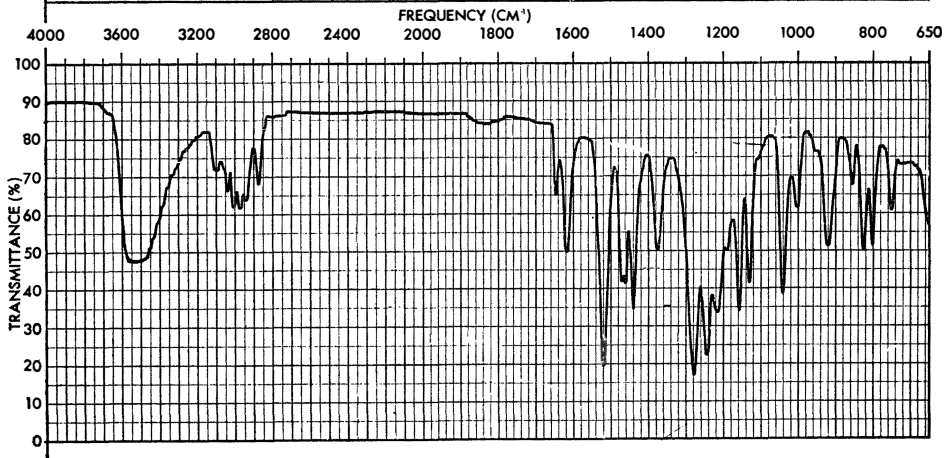


Figura N° 10

SAMPLE

SPECTRUM NO.

SAMPLE

SPECTRUM NO.

Titulación por retroceso.

Volumen total de solución de bromuro-bromato 0,1 N factor 0,631 adicionado igual a 38,0 ml., los cuales corresponden a 23,978 ml. de solución 0,1 N.

Se gastaron 1,25 ml. de tiosulfato de sodio 0,1 N factor 1, 146, los cuales equivalen a 1,473 ml. de solución 0,1 N.

Volumen real de titulante gastado para la bromación igual a 22,505 ml. de solución 0,1 N, los cuales equivalen a 0,0845 gm. de timol.

Esto representa un contenido de timol de 0,546 gm. por cada 100 gm. de aceite.

Los resultados obtenidos en titulaciones simultáneas se pueden observar en la siguiente tabla:

TABLA NUMERO 12

Gm. de timol por 100 gm. de aceite.

Titulación directa	0,536	0,504
Titulación por retroceso	0,546	0,497
Promedio total	0,521	

Como se observa en la tabla anterior, los resultados logrados por titulación directa y por titulación por retroceso son bastante reproducibles. En las condiciones de valoración, resulta difícil observar el punto final de la titulación directa y la titulación por retroceso tiene un punto final más fácil de observar y tiende a dar valores mayores que los obtenidos por titulación directa, aunque es difícil impedir completamente la pérdida de halógeno durante la reacción. La temperatura y la acidez juegan papel muy importante en la determinación.

Además, y éste es probablemente el mayor inconveniente, las bases químico-analíticas de la técnica de valoración, pueden conducir a obtener valores mayores que los reales, puesto que cualquier otro compuesto fenólico distinto del timol o un compuesto no saturado pueden intervenir en la reacción de fijación de bromo, lo cual es bastante probable en este caso, dado que el método emplea-

do para la separación del timol puede extraer otros fenoles, y aun ácidos, los cuales también podrían fijar bromo, especialmente si son insaturados.

Todas estas consideraciones permiten concluir que este método podría utilizarse con más confianza para valorar fenoles totales en aceites esenciales en lugar de timol propiamente dicho, expresando los resultados como timol o como el fenol en mayor proporción. Además, es necesario remover los ácidos orgánicos antes de separar los fenoles, con el objeto de evitar posibles interferencias.

Valoración del timol por el método N° 2.

Se observa en este método que las cantidades de timol necesarias para obtener una coloración apropiada para las lecturas espectrofotométricas son mayores que las indicadas por la técnica. Además es necesario hacer una buena mezcla de las dos fases para permitir el desarrollo de un color adecuado y que sea directamente proporcional a la cantidad de timol en la solución.

Se observó que para el tamaño de las celdas utilizadas es necesario aumentar el volumen de solución reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído. Este reactivo debe ser preparado inmediatamente antes de su uso. De otra manera se desarrolla una coloración amarilla pronunciada por descomposición del reactivo.

La intensidad del color va aumentando con el tiempo. No pudo obtenerse un tiempo óptimo de máximo desarrollo de color. Los resultados obtenidos en varias determinaciones no son reproducibles y no permiten obtener relación adecuada entre la absorbancia y la concentración de las soluciones.

Por todos estos factores se concluye que este método no es recomendable para la determinación de timol.

Determinación cuantitativa de timol por el método N° 3.

Los resultados obtenidos por este método pueden apreciarse en la tabla siguiente:

TABLA NUMERO 13

<i>Solución N°</i>	<i>A</i> <i>292 mμ</i>	<i>Conc. timol</i> <i>gm./litro</i>	$\Delta e.$	$\Delta e.$ <i>Promedio</i>
1	0,071	0,004	2.662,25	3.491,22
2	0,170	0,008	3.192,18	
3	0,263	0,012	3.292,32	
4	0,383	0,016	3.639,83	
5	0,484	0,020	3.485,32	
6	0,085	0,004	3.192,17	
7	0,179	0,008	3.361,17	
8	0,288	0,012	3.605,28	
9	0,401	0,016	3.764,90	
10	0,484	0,020	3.887,82	
Problema 1	0,592			
Problema 2	0,606			

Los valores de Δe obtenidos fueron sometidos a análisis estadísticos. Se concluyó que el valor obtenido para la solución N° 1 es descartable y que el valor promedio de las 9 soluciones restantes es de 3.491,22 con una desviación estándar de $\pm 238,14$.

Los resultados obtenidos por este método pueden observarse en la siguiente tabla:

TABLA NUMERO 14

<i>Problema</i> <i>N°</i>	Δe <i>Timol</i>	<i>Gm. aceite</i> <i>100 ml. sol.</i>	<i>Timol mg./100</i> <i>gm. aceite</i>	<i>Conc. Pro-</i> <i>media mg./100</i> <i>gm. aceite</i>
1	3.491,22	0,5150	498,45	506,02
2	3.491,22	0,5150	513,59	
3	3.491,22	* 0,400	0,396	

La exactitud del método fue comprobada por valoración del contenido de timol de una solución que contenía 400 mg. de timol por 100 ml. Se obtuvo una recuperación de 396 mg./100 ml. (99%).

* *Concentración de timol patrón por 100 ml. de solución.*

Esto nos permite concluir que el valor de Δe calculado para las soluciones patrones puede ser utilizado para análisis de timol por espectrofotometría diferencial.

Al comparar los valores obtenidos por el método del bromuro-bromato con los obtenidos por espectrofotometría diferencial, se observa que los valores obtenidos por el primero de estos métodos son ligeramente mayores, debido a las mismas características del método de análisis que, como ya se explicó, no resulta tan específico como el espectrofotométrico, para la determinación cuantitativa de timol.

Sin embargo, las diferencias observadas son tan pequeñas (15 mg.) y corroboran nuestra conclusión anterior en el sentido de que el timol representa casi la totalidad de los fenoles presentes en el aceite volátil, lo cual, según los datos analíticos obtenidos, sería superior al 97% del total de fenoles del aceite.

Cromatografía en fase gaseosa.

No pudo obtenerse separación del timol patrón en las condiciones empleadas. La dificultad de este método estriba en el hecho de que no siempre se dispone de las fases estacionarias recomendadas por la literatura y en que las polaridades de las fases estacionarias disponibles en nuestro laboratorio resultaron inadecuadas.

Consideraciones farmacológicas y microbiológicas.

El timol tiene un coeficiente de fenol igual a 30. Es por lo tanto un fungistático y bacteriostático potente y se usa para gérmenes comunes al 1:3.000. Puede utilizarse en casos de dermatofitosis en concentración del 1% en lociones y ungüentos (26).

También es poderoso antihelmíntico y puede utilizarse como vermífida en la anquilostomiasis (*A. duodenale* y *N. americanus*). La dosis igual en humanos es de 1 gm., (0,60 — 1,20 gm.) y 4 gm. en humanos provocan eliminación del 96 al 99% de los helmintos. (27).

Concentración de timol 1:5.000 produce parálisis de los áscaris tanto in vitro como in vivo (28).

Debido a que la concentración de timol en el aceite esencial de cordoncillo aromático (*Piper lenticellosum* C.DC.) es de 506 mg. por 100 gm. sus fenoles totales representan 521 mg. por 100 gm. de aceite, y contiene además numerosos compuestos de natu-

raleza diversa (alcoholes, ésteres, terpenos, sesquiterpenos, compuestos carbonílicos, ácidos, etc.), los cuales podrían ayudar en su acción biológica general, pueden esperarse efectos fungistático, bacteriostático y antihelmíntico estimables.

Estas consideraciones permiten concluir que el aceite esencial podría emplearse en la fabricación de productos farmacéuticos para uso humano y veterinario, como fungistático, bacteriostático y antihelmíntico.

Se sugiere adelantar el estudio de sus propiedades farmacológicas y microbiológicas así como de las condiciones de formulación y estabilización de un producto farmacéutico.

RESUMEN

El presente trabajo constituye la primera parte del estudio fitoquímico del aceite esencial de *Piper lenticellosum* C. DC. e incluye el establecimiento y adaptación de técnicas generales de extracción y análisis de aceites esenciales de plantas colombianas.

El aceite esencial se extrajo por destilación con arrastre de vapor en un aparato diseñado en el laboratorio y el aceite se recuperó sin ayuda de solventes orgánicos. Se determinaron sus constantes fisicoquímicas.

El examen general de los componentes del aceite volátil se hizo por cromatografía en capa fina, a partir de fracciones obtenidas por cromatografía en columna y usando reveladores específicos. Los diversos tipos de compuestos se aislaron con solventes siguiendo un esquema apropiado y a partir del aceite total.

Esta primera parte se refiere especialmente al estudio de los fenoles del aceite. Los diferentes compuestos fenólicos se aislaron y purificaron por cromatografía en capa fina. La identificación se basó en los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina (valores R_f , reacciones coloreadas, etc.), espectros de absorción a la luz ultravioleta y al infrarrojo. De 3 compuestos fenólicos aislados se pudo identificar el fenol N^o 1 como timol.

Se estableció una técnica espectrofotométrica para la determinación cuantitativa del timol presente en el aceite.

Con base en los resultados obtenidos se puede esperar que el aceite presente propiedades antihelmínticas, fungistáticas y bacte-

ricidas muy importantes y podría tener aplicación futura en la preparación de productos farmacéuticos para uso humano y veterinario.

SUMMARY

This work is aimed to establish general techniques for extraction and analysis of essential oils from Colombian plants.

The material was a plant called "cordoncillo aromático u oloroso", (*Piper lenticellosum* C.DC. Colombian Herbarium N° 124071).

The oil was obtained by steam distillation in an apparatus designed in our laboratory. The oil was separated without using organic solvents. The general survey of the different components of the oil was done by TLC, from fractions obtained by column chromatography. The different types of compounds were isolated with solvents, following an isolation scheme.

This first publication refers specially to the phenolic compounds, which were isolated and purified by TLC. Their identification was based on the chromatographic behavior (Rf values, color, reactions, etc.), U. V. and I. R. spectra.

Among three phenolic compounds, one was identified as thymol. A spectrophotometric techniques for thymol determination was set.

Based on the composition, thymol content and general characteristics one may expect the oil to have important antihelmintic, fungistatic and bacteriostatic action and could be used for preparation of pharmaceutical products for human and veterinary use.

RÉSUMÉ

La présente note résume les résultats obtenus au cours de la première partie de l'étude phytochimique de l'huile essentielle de *Piper lenticellosum*, C.DC.

Nous avons adapté les méthodes générales d'extraction et d'analyse des huiles essentielles au cas des plantes colombiennes et le cas échéant, nous avons développé des procédés originaux.

L'huile de *Piper lenticellosum* a été extraite par entraînement à la vapeur et récupéré sans utilisation de solvants dans un appa-

reil d'extraction construit dans nos laboratoires. Les constantes physicochimiques ont été déterminées. L'huile obtenue a été fractionnée par chromatographie sur colonne suivie de chromatographie en couche mince. Les divers groupes de composés ont été isolés à l'aide de solvants appropriés. Ce premier rapport se réfère spécialement aux trois phénols isolés et purifiés par chromatographie en couche mince et caractérisés par les méthodes usuelles. Dans ce mélange on a identifié le thymol et une méthode spectrophotométrique a été mise au point pour son dosage.

Les résultats obtenus montrent que l'huile extraite possède des propriétés helminthiques, fungistatiques et bactéricides importantes qui permettent d'envisager son utilisation dans la fabrication de produits pharmaceutiques et vétérinaires.

BIBLIOGRAFIA

1. H. KÜSTER. "Importancia de los Aceites Esenciales Naturales y sus Perspectivas para el Futuro". Dragoco Report. N° 12, 244, 1971.
2. C. DE CANDOLLE. *Journal of Botany*. 4, 167, 1866.
3. W. TRELEASE. T. G. YUNCKER. "The Piperaceae of Northern South America". University of Illinois Press, 1, 88, 1950.
4. E. GUENTHER. "The Essential Oils". D. Van Nostrand Company, Inc. New York. 5, 157, 1952.
5. *Ibidem*.
6. E. CALDERÓN. "Guía para el Análisis de Plantas y Notas Prácticas sobre Fitoquímica". Conferencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. 47, 1963.
7. E. GUENTHER. "The Essential Oils". D. Van Nostrand Company, Inc. New York, 1, 279, 1949.
8. E. GUENTHER. *Op. cit.* 271, 1949.
9. A. F. SHALABY, G. RICHTER. "Chromatographic Investigation of the Essential Oil of *Achillea fragrantissima*". *Journal of Pharmaceutical Science*. 53, N° 12, 1502, 1964.
10. R. N. ACHARYA, M. G. CHAUBAL. "Essential Oil of *Anemopsis californica*". *Journal of Pharmaceutical Science*. 57, 1020, 1968.
11. *Ibidem*. (9).
12. E. STAHL. "Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook". Academic Press, Publishers, New York, 488, 1965.

13. R. N. ACHARYA, M. G. CHAUBAL. "Essential Oil of *Anemopsis californica*" *Journal of Pharmaceutical Science*; 57, N° 6, 1020, 1968.
14. E. STAHL. *Op. cit.* 498, 1965.
15. E. STAHL. *Op. cit.* 501, 1965.
16. E. STAHL. *Op. cit.* 197, 1965.
17. E. STAHL. *Op. cit.* 198, 1965.
18. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist. Association of Official Agricultural Chemist. Washington. 525, 1960.
19. L. FIBRANZ, M. I. BLAKE. *et al.* "Colorimetric Determination of Thymol in Thyme Oil". *Journal of the American Pharmaceutical Association*; S. E. XLVII, N° 2, 133, 1958.
20. J. C. DEMETRIUS, J. E. SINSHEIMER. "The Application of Δe Analysis to Pharmaceuticals: The Determination of Eugenol". *Journal of the American Pharmaceutical Association*. S. E. 49, 523, 1960.
21. R. N. ACHARYA. *Idem.* (1°).
22. I. KUSHNIR, P. A. BARR. *et al.* "An Improved Quantitative Method for Volatile Phenols". *Analytical Chemistry*. 42, N° 13, 1619, 1970.
23. Applied Science Laboratory, Inc. Cat. 14, 15, 1971.
24. E. GUENTHER. *Op. cit.* 250, 1949.
25. R. N. ACHARYA. *Idem.* (1°).
26. M. LITER. "Farmacología". Editorial El Ateneo, Buenos Aires. 1129, 1961.
27. M. LITER. *Op. cit.* 1384, 1961.
28. M. LITER. *Op. cit.* 1382, 1961.