

ESTUDIO COMPARATIVO DE DIVERSOS TIPOS DE ESENCIAS DE ESPLIEGO ESPAÑOLAS

Resumen de la tesis Doctoral realizada por
M. MARTIN MESONERO y dirigida por el
Prof. Dr. J. CABO TORRES.

INTRODUCCION

El presente trabajo tiene por objeto el estudio analítico de esencias de espliego españolas de procedencias distintas.

Siendo evidente que las características climáticas y edáficas de las diversas regiones de nuestro país varían mucho, es lógico pensar, que pueden variar también con ellas los rendimientos y calidades de los aceites esenciales conseguidos en las mismas.

Debido a esta circunstancia, juzgamos interesante saber cuales pueden ser estas variaciones, ya que en la actualidad a la industria transformadora le interesa, tanto como la calidad de los productos que recibe y manipula la uniformidad de los mismos.

Tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, los aceites esenciales plantean un doble problema: Primero, el de rendimiento en determinados componentes; segundo, el de su tipificación.

Dentro de las plantas productoras de aceites esenciales, nos ha parecido oportuno el estudio del espliego porque, aparte de ocupar un lugar destacado dentro de la producción nacional de esencias, Granada es una zona de gran extensión, donde se encuentran enclavadas calderas de destilación en gran número.

Por ello, realizamos un estudio de las diversas clases de esencia de espliego españolas, con vistas a establecer la diferenciación entre unas y otras, según su origen geográfico, e influencia de estas características en las calidades.

PLAN DE TRABAJO

Muestras en estudio: Hemos dispuesto de esencia de espliego procedente de Zaragoza, Soria, Sigüenza (Guadalajara), Salvacañete (Cuenca), Pineda (Cuenca), Quesada (Jaén), Sotillo (Granada) y Cogollos (Granada). También de los llamados "Conjuntos" de exportación, así como de espliegos artificiales tipos Bélgica, Francia y U. S. A.

A). PARTE TEORICA

Se ha realizado una amplia revisión bibliográfica en lo referente a la monografía farmacognóstica del espliego y su esencia, así como de las técnicas empleadas a lo largo del trabajo.

B). PARTE EXPERIMENTAL

I.—*Determinación de caracteres y constantes en las diversas muestras de esencia:*

Físicos: Densidad, índice de refracción, poder rotatorio, solubilidad en alcohol.

Químicos: Esteres, alcoholes.

II.—*Cromatografía en papel.*

III.—*Cromatografía en capa fina.*

IV.—*Cromatografía en fase gaseosa.*

V.—*Espectroscopia infrarroja.*

MATERIAL Y METODOS

I.—*DETERMINACION EN LAS DIVERSAS MUESTRAS DE LAS CONSTANTES FISICAS Y QUIMICAS USUALES.*

Comenzamos por establecer los índices más clásicos en la definición y tipificación de los aceites esenciales con un doble fin:

De un lado porque, las muestras estudiadas son de garantizada pureza y de procedencia geográfica diversa, dentro de España, lo que nos permitirá contribuir, de forma efectivas.

De otro lado, intentamos comprobar si las pequeñas variaciones en tales índices, tienen repercusión en los resultados cromatográficos; ello permitirá además juzgar del interés de dichas variaciones.

I. 1.—*Densidad*. Se ha determinado por el método del picnómetro a la temperatura del laboratorio. Hemos hecho la corrección adecuada sumando o restando al valor obtenido 0,00082 por grado, según que la temperatura a la que se efectuó la determinación fuese superior o inferior, respectivamente, a 15°. El empleo de este factor de corrección es el señalado por Bosart y nos ha parecido el más aconsejable dentro de la bibliografía consultada.

I. 2.—*Poder rotatorio*. Se ha utilizado un polarímetro tipo Laurent (Winkel-Zeiss).

I. 3.—*Índice de refracción*. Para nuestras experiencias hemos utilizado un refractómetro tipo Abbé (Carl Zeiss), que tiene una escala de 1,3 a 1,7 (suficientemente amplia para el análisis de los aceites esenciales). Trabajamos exclusivamente a temperatura constante de 20°, por lo cual el refractómetro está conectado a un termostato muy sensible.

I. 4.—*Solubilidad en alcohol*. Para esta determinación se ha seguido la técnica descrita según los "Methodes D'analyse des Huilles Essentielles du Syndicat des Fabricants et importateurs D'Huilles Essentielles". Se ha empleado alcohol de 65° exactamente titulado y operado a la temperatura de 15°.

I. 5.—*Esteres*. Los métodos utilizados para la determinación de esta constante química en esencias, son la saponificación en frío y en caliente. La primera se emplea en la determinación de formiatos por ejemplo, pero generalmente no es un buen método analítico, ya que no todos los ésteres contenidos se saponifican en estas condiciones. Debido a esto hemos empleado la saponificación en caliente.

I. 6.—*Alcoholes*. Entre los métodos de determinación de alcoholes en esencias hemos seleccionado el de la acetilación, dada la clase de alcoholes presumibles en esta esencia.

II.—CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Dificultada por un tratamiento previo: inversión de la fase. El papel hidrofugado conseguido tiene un valor empírico. De otra parte, el tiempo empleado en el desarrollo de estos cromatogramas es muy grande y dependiente del grado lipófilo del papel, por lo que la experiencia adolece de claros defectos.

III.—CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Para esta técnica hemos seguido el método más generalizado, preconizado por Stahl: placas de 20 x 20 cm. Sin embargo, en un estudio más siste-

mático de ensayo de fases móviles es mejor un soporte más reducido, que presentaría algunas ventajas tales como: menor capa de adsorbente (economía), rapidez en el desarrollo del cromatograma...

Se llevó a cabo sobre porta-objetos de los corrientemente empleados en microscopia, disponiéndolos cada cuatro en cámaras de fácil construcción (vasos tapados con cajas petri cubiertas en el interior con cinta adherente "tesamol" que permite hacer un cierre perfecto y evitar la evaporación). Es esta una técnica sencilla y original de nuestro laboratorio. Los ensayos presuntivos han sido confirmados al trasladar la cromatografía a placas. Se economiza tiempo y a la vez se obtienen copiosos datos.

III. 1.—*Adsorbentes utilizados:*

Silicagel G Merck
 Silicagel GF-254 Merck
 Silicagel H Merck
 Silicagel H-254+366 Merck
 Silicagel F-5 Camag

III. 2.—*Fases móviles estudiadas: Unas veces hemos variado el disolvente y otras las proporciones relativas en las mezclas.*

Cloroformo
 Diclorometano
 Tetraclorometano
 Eter isopropílico
 Eter-Cloroformo (15/85)
 Eter-Cloroformo (25/75)
 Benceno-Cloroformo (50/50)
 Benceno-Cloroformo (25/75)
 Sulfuro de carbono-Alcohol (90/10)
 Hexano-heptano-Eter (85/15)
 Hexano-heptano-Eter (75/25)
 Benceno-Eter (85/15)
 Benceno-Eter (75/25)
 Benceno-Eter isopropílico (5/1)
 Diclorometano-Eter
 Hexano-Acetato de etilo (85/15)
 Cloroformo-Eter (90/10)
 Cloroformo-Eter (100/10)
 Benceno-Alcohol (100/2)

III. 3.—*Reveladores:*

Luz ultravioleta (ha precedido al empleo de cualquier otro revelador).

Vainillina sulfúrica (vainillina al 3% en alcohol más 4 ml. de SO_4H_2 conc./100 ml. de sol).

Anisaldehído sulfúrico (1 ml. de anisaldehído en 97 ml. de acético más 2 ml. de SO_4H_2 conc.).

Sulfúrico con anisaldehído (al 3%).

2-4 D. N. F. H. (al 0,4% en ClH 2N).

Acido fosfomolibdico (al 5% en etanol).

Pentacloruro de antimonio (disuelto en Cl_4C 1/4 vv).

Bromofluoresceína (sódica, sol. acuosa al 0,04%).

Vapores de iodo.

Vainillina en acetona (al 3%)

Acido sulfúrico concentrado.

IV.—*CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA*

Hemos trabajado con un cromatógrafo Perkin-Elmer mod. F-11 con columna de silicona Rubber E. 301 al 5% sobre chromosorb W, y carbowax 20 M al 10 % sobre chromosorb G, en las siguientes condiciones experimentales:

Temperatura: Bloque de inyección: 195°

Horno: Inicial de 85°; a los 12 minutos programación con una velocidad de 10° por minuto hasta alcanzar 130°

Atenuación: 50 x 10²

Gas portador: Nitrógeno; flujo: 2ml/minuto.

Velocidad de registro: 5 mm/minuto.

V.—*ESPECTROSCOPIA INFRARROJA*

Hemos utilizado un aparato Perkin-Elmer mod. 157; el aceite esencial se ha depositado entre células de cloruro sódico.

RESULTADOS

I.—*INDICES*

Los índices usuales son considerablemente uniformes al comparar entre sí las diversas muestras analizadas.

Además, los datos obtenidos suelen entrar de lleno en los márgenes admitidos por los autores que han analizado esencias de espliego, como son el

francés Fesneau (que trabajó varios años en España, en una industria de aceites esenciales), el conocido especialista Guenther, el Prof. Dorronsoro, en su meritorio trabajo sobre esencias españolas y el farmacognosta portugués Fernández Costa.

Sin embargo estimamos conveniente hacer respecto a los resultados obtenidos.

Por ejemplo el poder rotatorio, además de ser algo más levógiro de lo que suele citarse en la bibliografía, nos ofrece la circunstancia de que la actividad óptica ha variado siempre, partiendo de 0°, hacia la izquierda, no habiendo encontrado ninguna muestra dextrógira, como es usual en los datos de otros autores.

El índice de refracción tiende a ser ligerísimamente inferior.

Los datos referentes a los ésteres expresados en acetato de linalilo, no presentan diferencias superiores a 0,24

le sigue o precede, excepto al valor correspondiente a la muestra procedente de Zaragoza que, siendo el más elevado,

Al cotejar nuestros datos referentes a alcoholes totales con los obtenidos para ésteres, es digno de señalar que no existe correlación alguna.

II.—CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Dejamos esta técnica porque pronto demostraron los primeros ensayos que no era equiparable con la de capa fina en cuanto a la buena calidad de resultados conseguidos con esta. Y además la cromatografía en papel aplicada a este tipo de sustancias no polares, resulta mucho más dificultosa y mucho menos pulcra.

III.—CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Realizado un estudio comparativo del poder eluyente de fases móviles —tanto mezclas como reactivos únicos— nos ha permitido establecer un criterio de selección aplicado a los fines propuestos en este trabajo.

Las fases seleccionadas son:

Heptano/Acetato de etilo (85/15)

Cloroformo/Eter sulfúrico (100/2)

Cloroformo/Alcohol etílico 96° (100/2)

Como reveladores, aparte del empleo constante de la luz ultravioleta antes y después de la pulverización de cualquier reactivo de revelado, se ha seleccionado la vainillina alcohólica en medio sulfúrico.

En ocasiones, según hemos comprobado, dá magníficos resultados combinar la vainillina con el empleo previo de vapores de yodo, pues tal com-

binación produce variaciones de las tonalidades en algunas manchas respecto a las que presentaban sin tratamiento previo. Ello constituye un nuevo criterio diferenciativo adicional.

La reproductibilidad de los resultados de la C. C. F., ha sido fácil de demostrar. Pero además tal conclusión es ratificada por el hecho independiente de la constancia entre los cromatogramas obtenidos de muestras de esencia de espliego estudiadas, pese a su origen geográfico distinto. Constancia, por otra parte, paralela a la observada en los índices clásicos.

Tal invariabilidad no implica en absoluto falta de sensibilidad, como lo demuestra la leve diferencia en la imagen cromatográfica de la muestra procedente de Zaragoza, que también se había diferenciado ligeramente en algún dato analítico.

La demostrada constancia en el comportamiento cromatográfico en capa fina de las esencias de espliego, aún con las señaladas variaciones específicas, da lugar a una incuestionable diferencia entre las esencias verdaderas y las "esencias de espliego artificiales" (falsificaciones comerciales) incluso cuando los parecidos en aromas y en los índices físicos y químicos clásicos, son aceptables,

El estudio minucioso y sistemático de las imágenes cromatográficas de las diferentes muestras de esencias de espliego españolas, comparativamente con las diversas sustancias puras (componentes-patrón), cuyo comportamiento cromatográfico también ha sido estudiado, nos ha permitido establecer o negar su presencia en ellas.

En las condiciones experimentales establecidas, mediante el uso de sustancias-patrón puras e incrementando la sensibilidad, poder diferenciativo y otras cualidades mediante nuestro sistema de doble revelado (iodo-vainillina), se puede llegar a la conclusión inicial de que en las esencias de espliego, las dos manchas de mayor tamaño que las restantes y que aparecen una tras la otra, son de eucaliptol y linalol respectivamente. Otra mancha también patente aunque menor que las anteriores, parece deberse a terpineol.

La mancha correspondiente a la fracción terpénica se ha fraccionado a su vez en tres, que hemos identificado

Operando con silicagel fluorescente y aplicando posteriormente la luz U. V. hemos

Por último, la mancha que distingue de las demás muestras de espliego, al de Zaragoza, todo lleva a concluir que es de acetato de linalilo.

Observemos que las manchas aparecidas, idénticas a los de las sustancias puras respectivas, sino también la circunstancia de las coloraciones idénticas entre cada una

de estas y aquellas tras el revelado (generalmente con la vainillina) y también cuando previamente se trataron con iodo, pues este se fija —aunque con diferente intensidad— en los compuestos no saturados (acetato de linallo, linalol, terpineol) y no lo hace al revelar con vainillina.

IV.—CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA

Los resultados obtenidos por cromatografía en fase gaseosa, confirman y completan lo que habíamos observado con las cromatografías en capa fina. En efecto, el examen de los cromatogramas muestra:

—que no existen diferencias cualitativas entre las distintas esencias de espliego, salvo una levísima en la muestra zaragozana.

—que en el aceite esencial de espliego se encuentran los siguientes componentes: α -pineno, canfeno, β -pineno, eucaliptol, linalol, alcanfor, terpineol, acetato de terpenilo (no identificado por C. C. F.) y acetato de linallo (sólo la muestra de Zaragoza).

Los análisis cuantitativos realizados por cromatografía gaseosa dan como componentes claramente mayoritarios: linalol, eucaliptol, alcanfor; y dentro de los mismos en orden decreciente, a excepción de los esenciales procedente de Soria, donde se observa un claro predominio del eucaliptol sobre los otros dos.

El orden de los componentes minoritarios varía en las distintas muestras, siendo en todas el primero el terpineol.

V.—ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El estudio inicial de los espectros infrarrojos de cada una de las muestras de esencia de espliego sólo permite establecer el espectrograma I. R. para las esencias de espliego

bargo no hemos detectado diferencias entre ellas, salvo —una vez más—, para la muestra de Zaragoza.

RESUMEN Y CONCLUSION GENERAL

Estimamos que en el estudio de las esencias naturales las más modernas técnicas cromatográficas en capa fina y fase gaseosa constituyen un magnífico complemento de las técnicas analíticas clásicas en este campo.

Ello se aprecia con meridiana claridad en el presente estudio sobre esencias de espliego españolas, pues las conclusiones obtenidas mediante las técnicas aludidas no sólo se han complementado sino que ofrecen en con-

junto gran coherencia. En efecto, se obtienen resultados comunes que ofrecen precisamente los puntos de partida en que se cimentan otras conclusiones específicas aportadas aisladamente por alguna de las técnicas empleadas. Por ejemplo está el caso presentado por la muestra de espliego procedente de Zaragoza, en que el dato analítico clásico de determinación de ésteres acusaba una diferencia timidamente señalada en algún otro índice físico o químico; la cromatografía en capa fina y la cromatografía gaseosa subrayaron la aparente anomalía —más la primera que la segunda— corroborándose después que en efecto, dicha muestra contenía cierta cantidad de acetato de linalilo.

La C. C. F., es particularmente útil en el aspecto cualitativo de los componentes de la esencia. Nos atrevemos a decir que en este aspecto es más aconsejable su empleo que la C. G., ya que a su rapidez une lo sencillo de su instrumental y el ser mucho más económica que ésta; en este aspecto cualitativo queremos puntualizar que la imagen final —el cromatograma— posee en la C. C. F., una fuerza plástica, pues en vez de picos más o menos agudos se estudian manchas de tamaño variable y de tonalidades diferentes para cada reactivo de revelado e incluso frente a uno mismo.

La cromatografía gaseosa además de ratificarse mutuamente con la de capa fina en lo cualitativo, se muestra de gran utilidad especialmente en las consideraciones de tipo cuantitativo de los componentes detectados.

El presente estudio sobre esencias españolas de espliego, referidas a las procedentes de las regiones de mayor producción, nos ha permitido afirmar que los tres componentes principales con diferencia notable sobre los demás son: linalol, eucaliptol y alcanfor, y entre los restantes se han identificado también el terpineol, acetato no; en la única muestra proc apreciable acetato de linalilo.

Al tomar en consideración el interesante aspecto de la posible influencia ecológica, parece es nula como lo demuestra la homogeneidad de las imágenes cromatográficas. Sin embargo, hay que admitir una excepción positiva cual es la esencia de Zaragoza, con su acetato de linalilo que según dijimos no existe en las demás. Naturalmente, es preciso corroborar tal punto estudiando esencias de otras "campanas". Sin embargo, en lo cuantitativo dicha influencia ecológica se hace algo más patente: así, los tres componentes mayoritarios se sitúan en orden decreciente linalol > eucaliptol > alcanfor, excepto en las muestras de Soria en el que el orden es en este sentido: eucaliptol > linalol > alcanfor; por otra parte es variable el orden de los que llamamos componentes minoritarios.