

Contribución al estudio de polifenoles y aceites esenciales en el genero *Thymus* L.

Roser Vila Casanovas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universidad de Barcelona

Facultad de Farmacia

Laboratorio de Farmacognosia y Farmacodinamia

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE POLIFENOLES Y ACEITES

ESENCIALES EN EL GENERO THYMUS L.

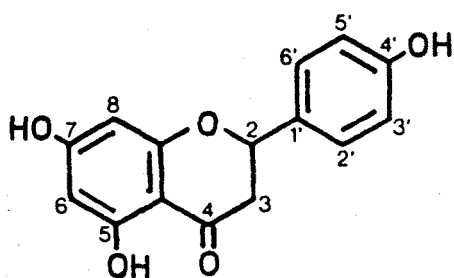
*Memoria presentada por Dña.
ROSER VILA CASANOVAS, diri-
gida por los Dres. Tomás
Adzet Porredón y Francesc
Martínez Vergés, para optar
al Grado de Doctor en Farma-
cia.*

Barcelona, Abril de 1987.

M) Estructura de la sustancia M.

La sustancia M ha sido aislada del extracto clorofórmico e identificada en base a sus datos analíticos como la 5,7,4'-(OH)₃-flavanona o naringenina:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-45.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-46.
- Espectroscopía ¹H-NMR: figura IV-44.



Sustancia M: 5,7,4'-(OH)₃-flavanona (naringenina).

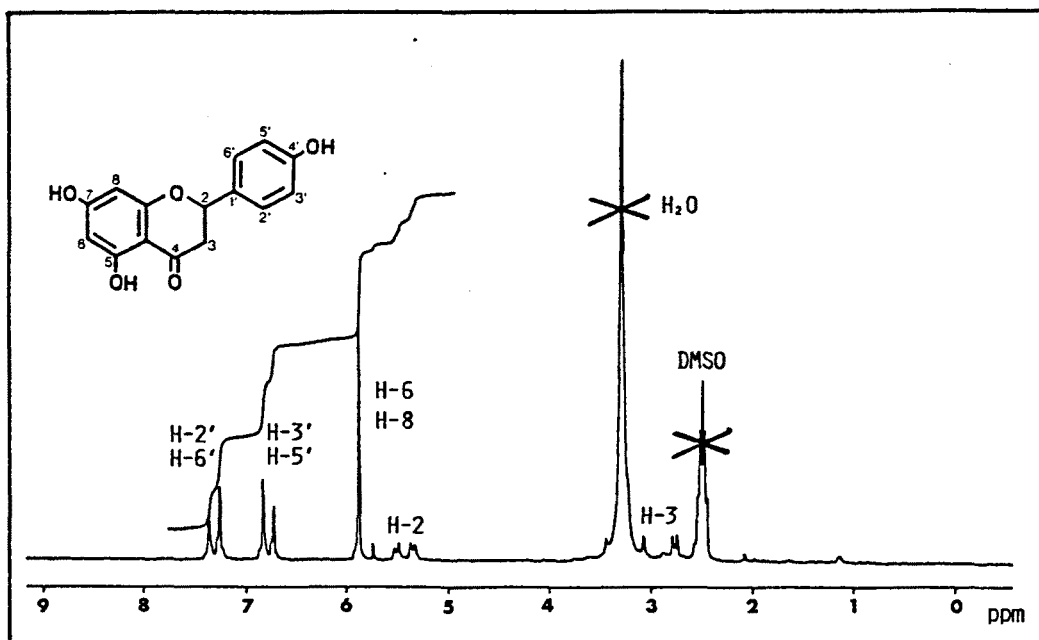
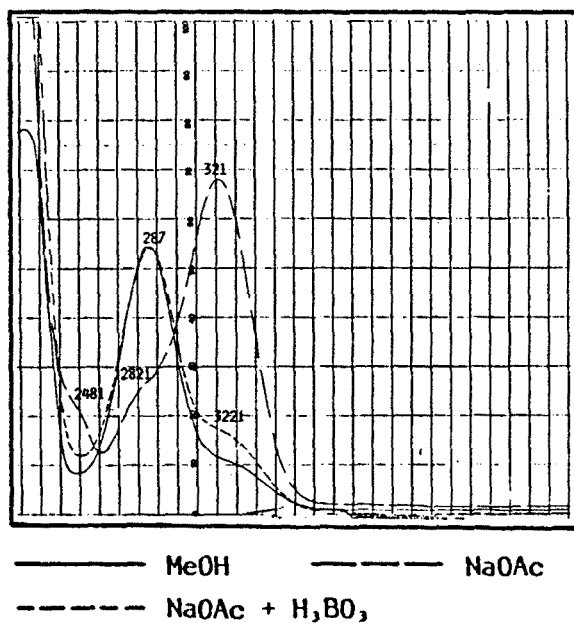
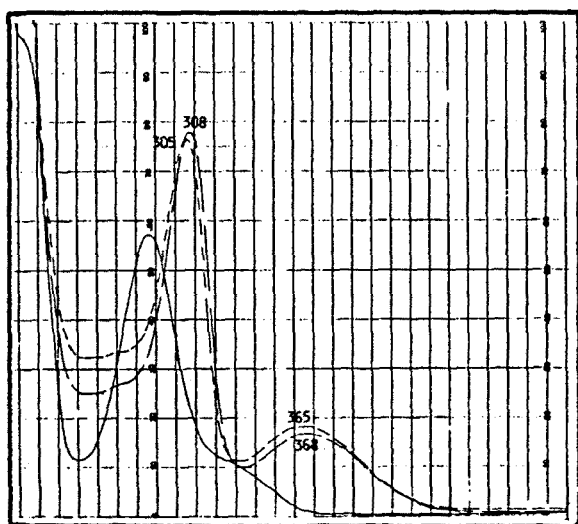
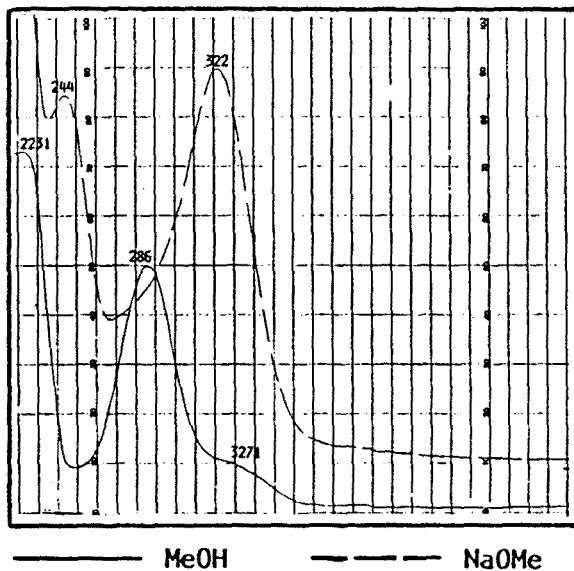
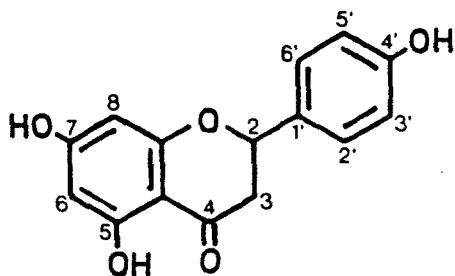


FIGURA IV-44: Espectro ¹H-NMR (80 MHz, d-DMSO) de la sustancia M.

FIGURA IV-45: Espectros UV-visible de la sustancia M.



Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	223i	286	327i
NaOMe:	244	322	
AlCl ₃ :	308	368	
AlCl ₃ , + HCl:	305	365	
NaOAc:	248i	282i	321
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	287	322i	

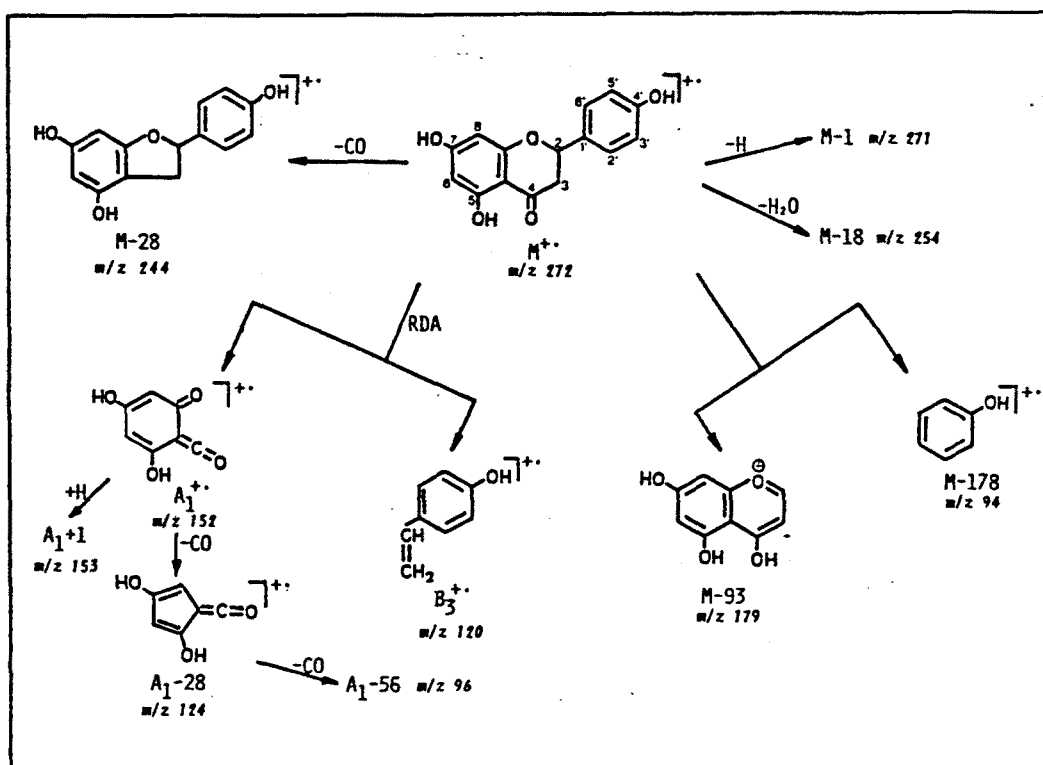
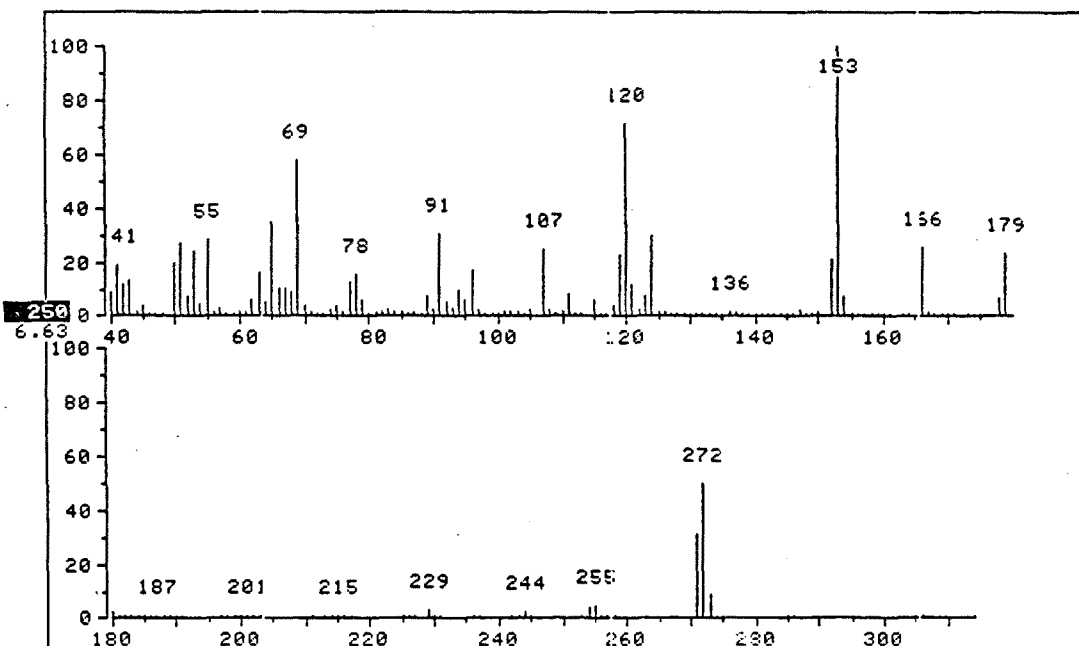
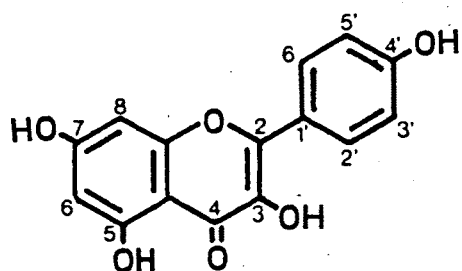


FIGURA IV-46: Espectro EI-MS y fragmentación de la substancia M.

N) Estructura de la sustancia N.

El compuesto N ha sido aislado tanto del extracto clorofórmico como del extracto etéreo, e identificado como la 3,5,7,4'-(OH)₄-flavona, a partir de los siguientes datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-48.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-49.
- Espectroscopía ¹H-NMR: figura IV-47.



Sustancia N: 3,5,7,4'-(OH)₄-flavona (kempferol).

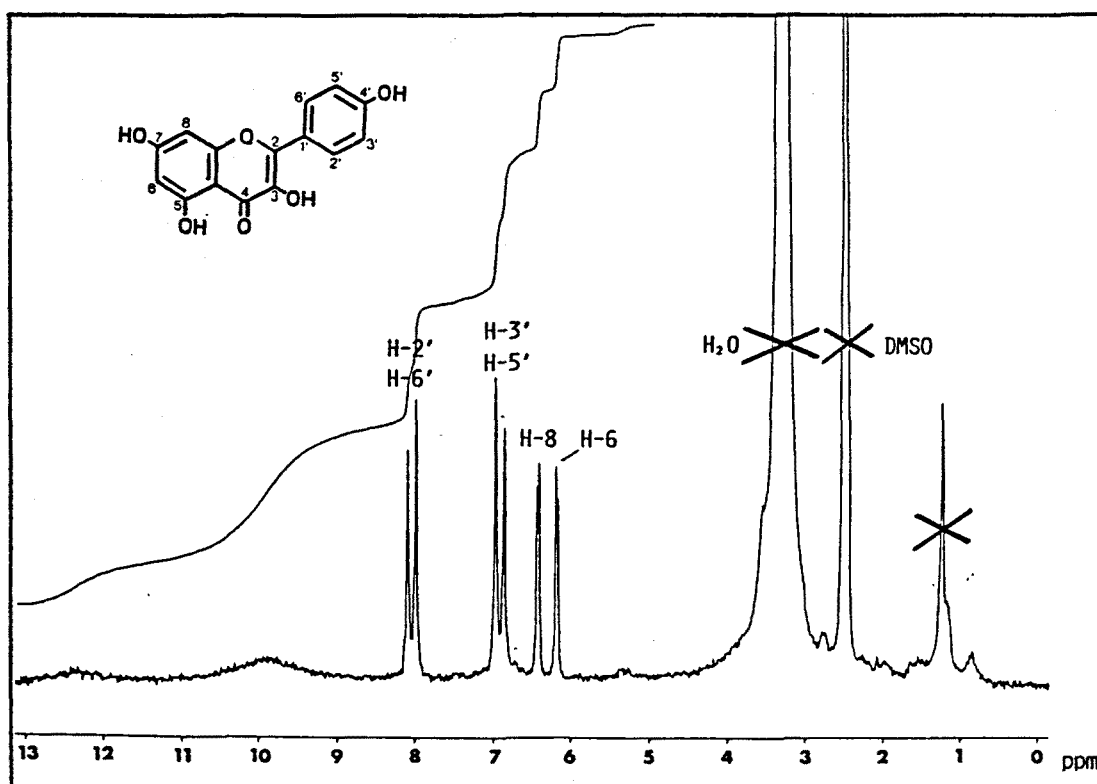
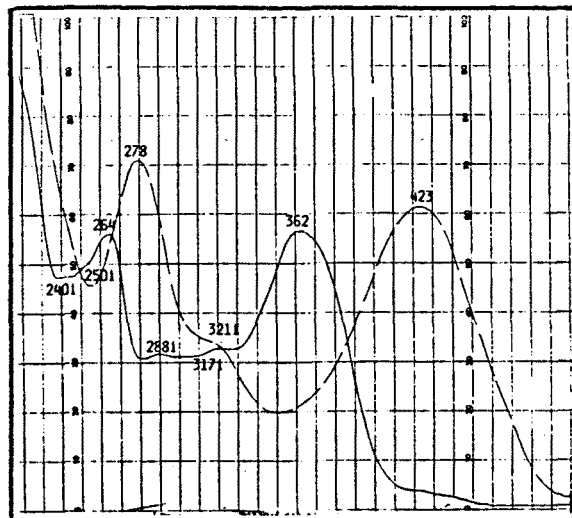
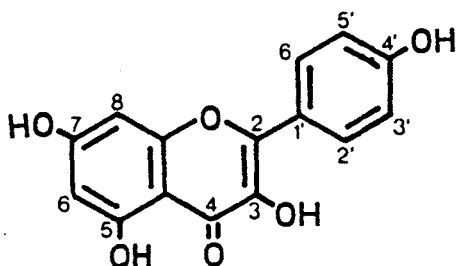
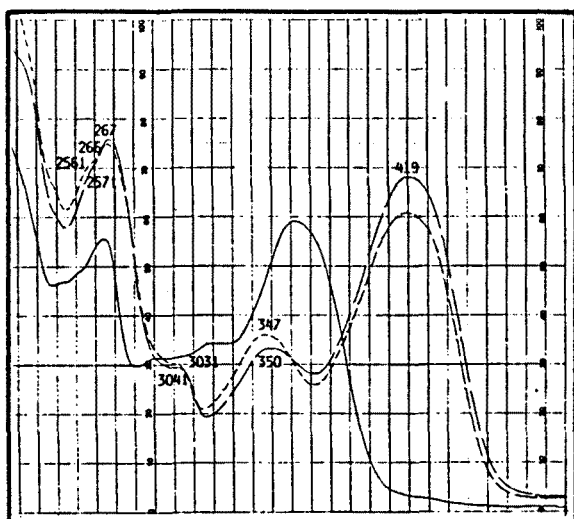


FIGURA IV-47: Espectro ¹H-NMR (80 MHz, d-DMSO) de la sustancia N.

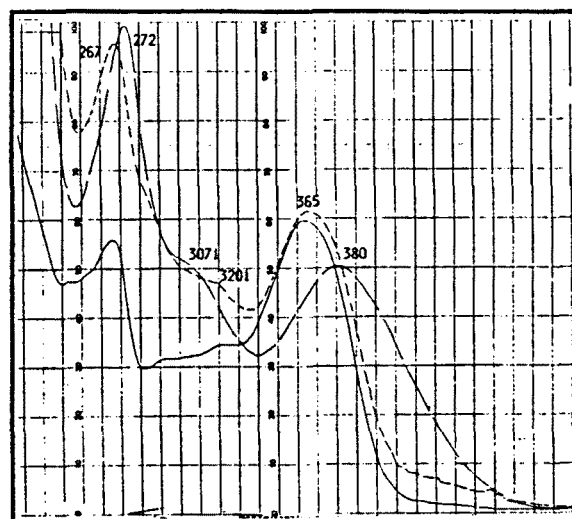
FIGURA IV-48: Espectros UV-visible de la sustancia N.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
- - - - AlCl₃ + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
- - - - NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	240i	250i	264	288i	317i	362
NaOMe:	278	321i	423	(descomposición)		
AlCl ₃ :	257i	267	304i	350	419	
AlCl ₃ + HCl:	256i	266	303i	419		
NaOAc:	272	307i	380			
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	267	320i	365			

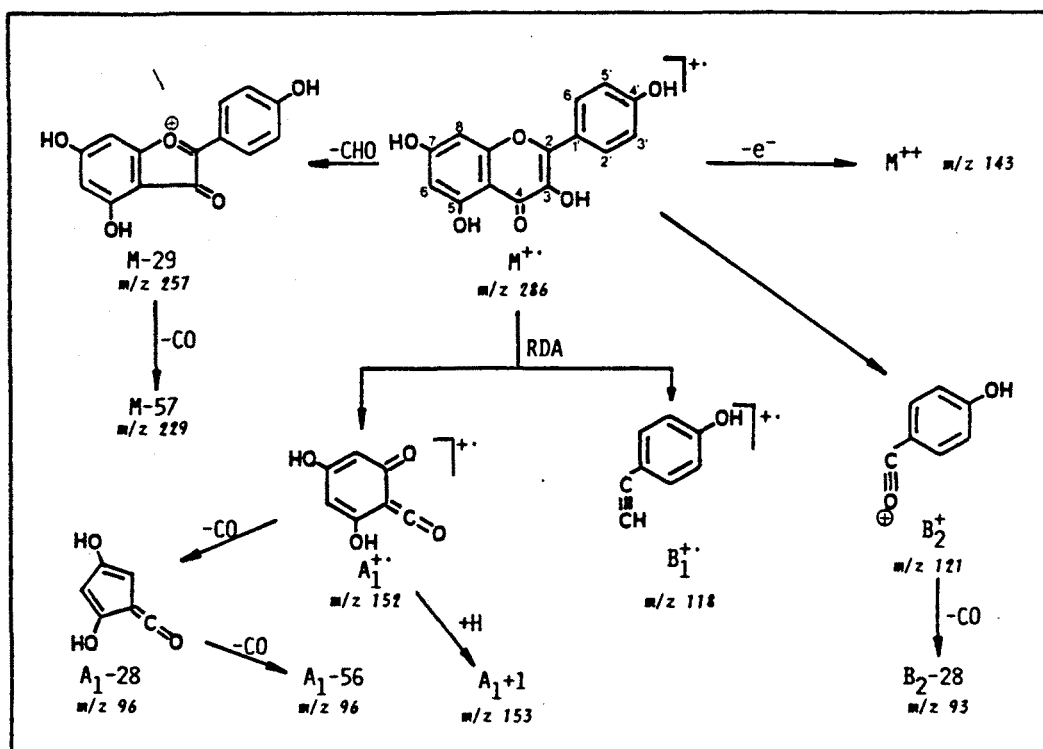
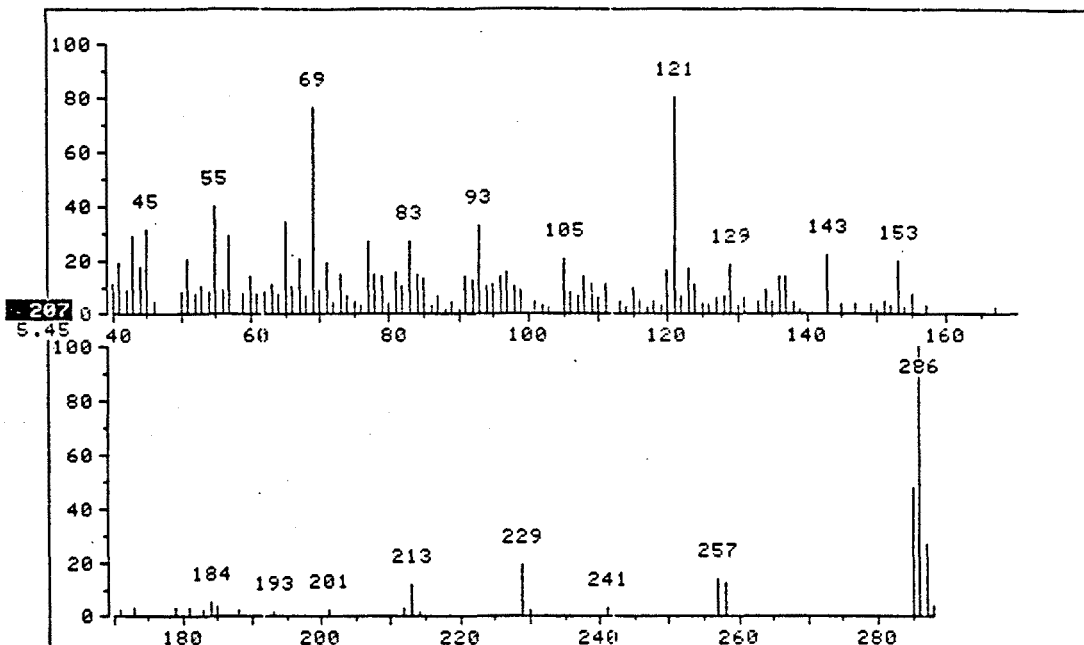
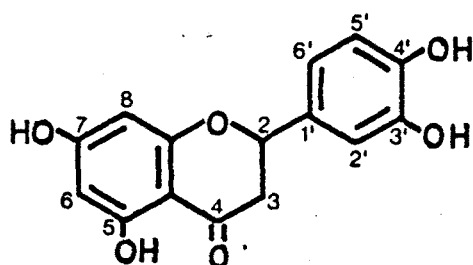


FIGURA IV-49: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia N.

Ñ) Estructura de la sustancia Ñ.

La sustancia Ñ ha sido aislada, también, de los extractos clorofórmico y etéreo, e identificada como la 5,7,3',4'-(OH)₄-flavanona o eriodictiol en base a los datos analíticos siguientes:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-51.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-52.
- Espectroscopía ¹H-NMR: figura IV-50.



Sustancia Ñ: 5,7,3',4'-(OH)₄-flavanona (eriodictiol).

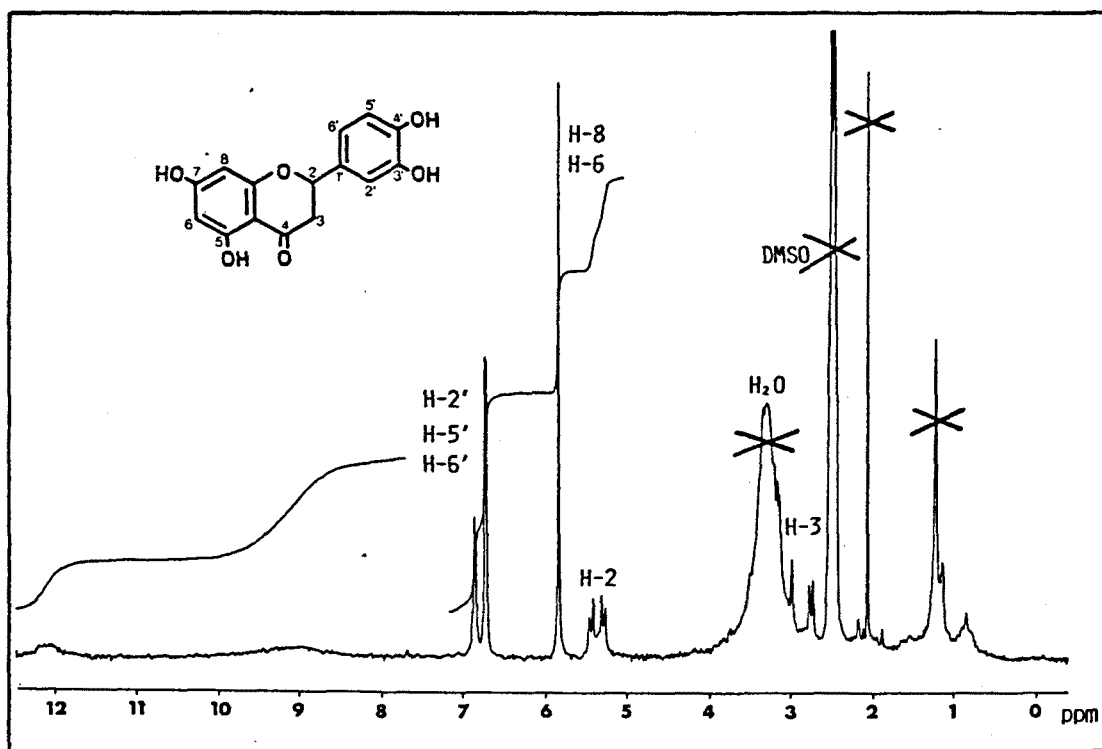
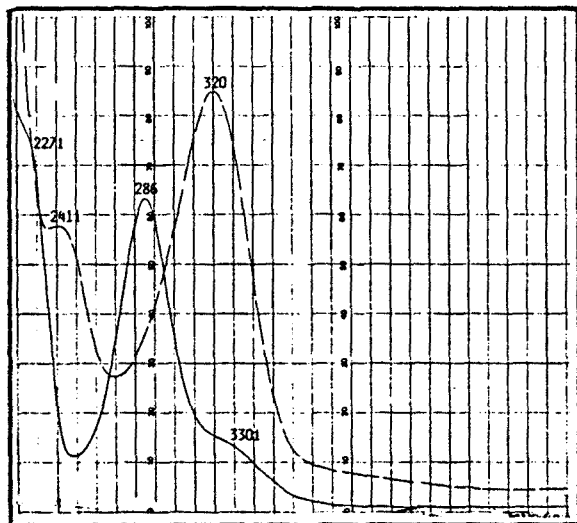
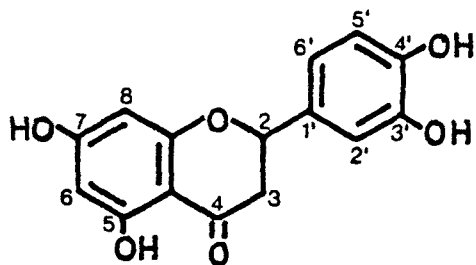
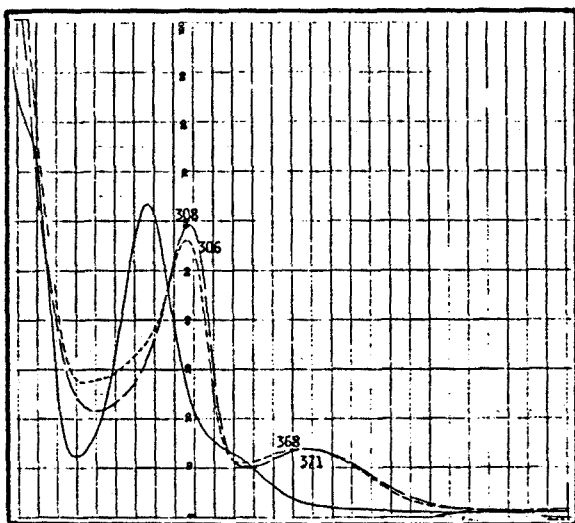


FIGURA IV-50: Espectro ¹H-NMR (80 MHz, d-DMSO) de la sustancia Ñ.

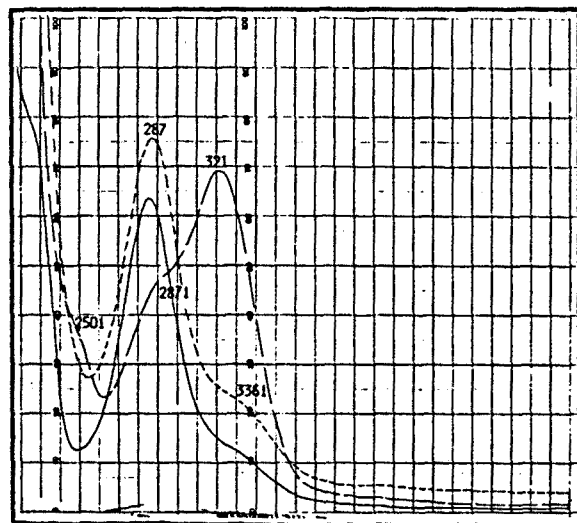
FIGURA IV-51: Espectros UV-visible de la sustancia Ñ.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
- · - · AlCl₃ + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
- · - · NaOAc + H₃BO₃,

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	227i	286	330i
NaOMe:	241i	320	
AlCl ₃ :	308	371	
AlCl ₃ + HCl:	306	368	
NaOAc:	250i	289i	321
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	287	336i	

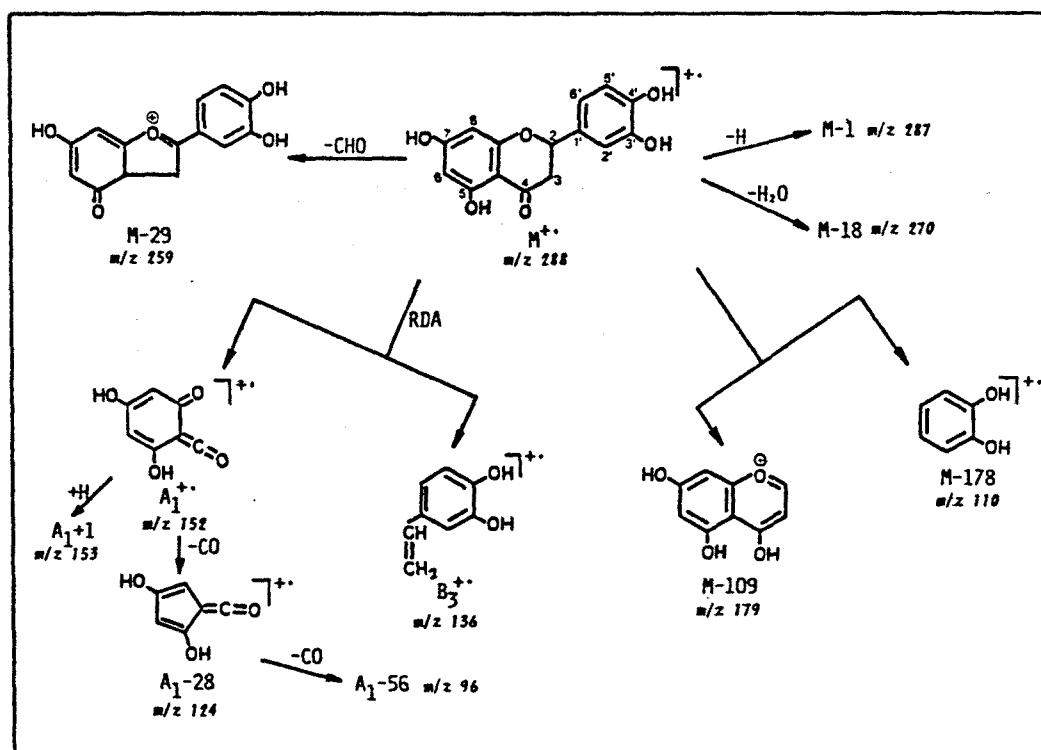
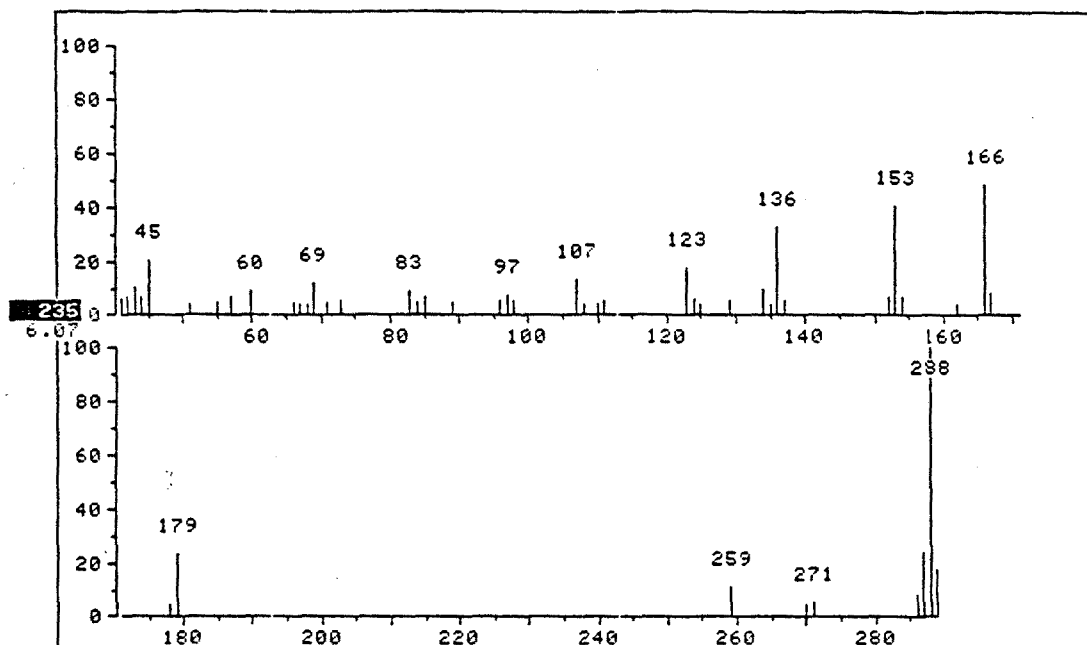


FIGURA IV-52: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia Ñ.

0) Estructura de la sustancia 0.

La sustancia 0 ha sido aislada del extracto etéreo en cantidad inferior al milígramo y no ha sido posible registrar su espectro de $^1\text{H-NMR}$.

Datos analíticos:

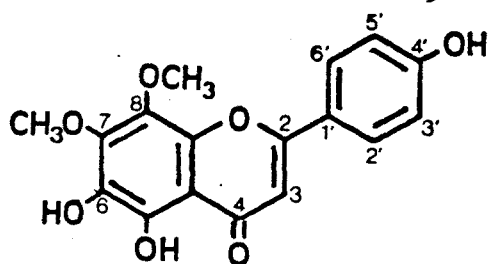
- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-53.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-54.

El comportamiento cromatográfico de la sustancia 0 indica que se trata de una flavona relativamente apolar, sustituida en 6 y/u 8 ya que no se revela.

El espectro UV-visible muestra una estructura de 5-OH-flavona que posee el anillo B momosustituido (banda II no desdoblada en el espectro metanólico) por un hidroxilo libre en 4' ($\Delta\lambda\text{I}$ en NaOMe respecto al MeOH de 40 nm) y el anillo A sustituido en 7 por un metoxilo ($\Delta\lambda\text{I}$ en NaOAc respecto al MeOH de 40 nm) y en 6 y 8 por un hidroxilo y metoxilo, respectivamente (λII en MeOH \geq 292).

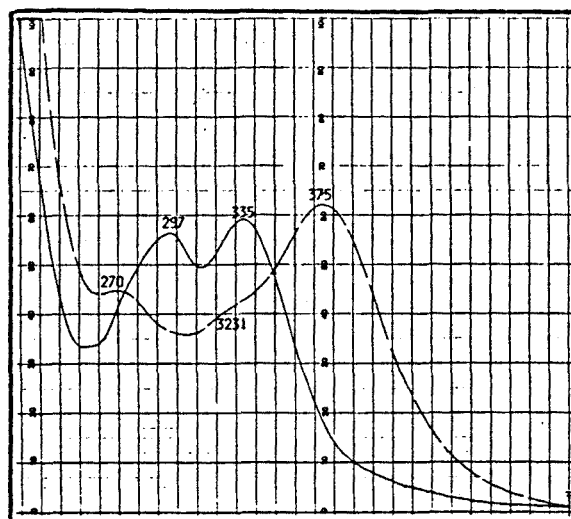
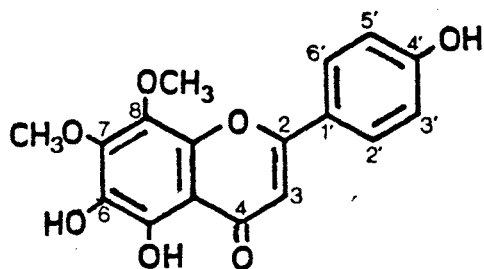
El EI-MS presenta un M^+ a m/z 330 ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$), que confirma que se trata de una trihidroxidimetoxiflavona. Los fragmentos B_1^+ , $(\text{B}_1+\text{H})^+$, B_2^+ y $(\text{B}_2-28)^+$ a m/z 118, 119, 121 y 93, respectivamente, apuntan hacia un anillo B monohidroxilado. El anillo A contiene dos hidroxilos y dos metoxilos, como lo demuestran los fragmentos A_1-15 (m/z 197) y A_1-43 (m/z 169). La elevada intensidad del fragmento a $\text{M}-15$ (m/z 315), superior a la del ión molecular, es característica de la existencia de un metoxilo en la posición 8.

Por lo tanto, la estructura de la sustancia 0 queda establecida como la de la 5,6,4'-(OH) $_3$ -7,8-(OMe) $_2$ -flavona o timusina.

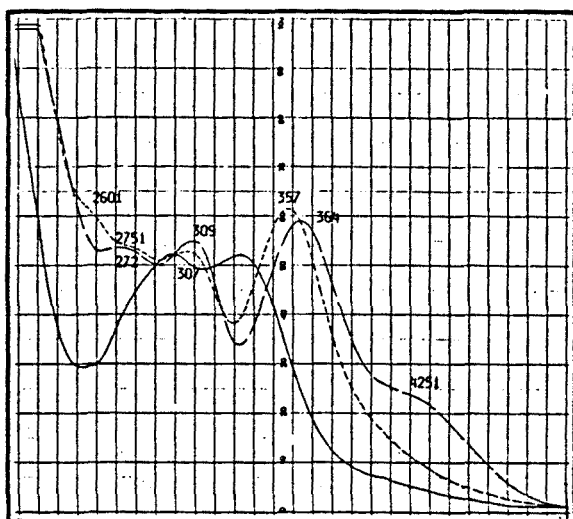


Sustancia 0: 5,6,4'-(OH) $_3$ -7,8-(OMe) $_2$ -flavona (timusina).

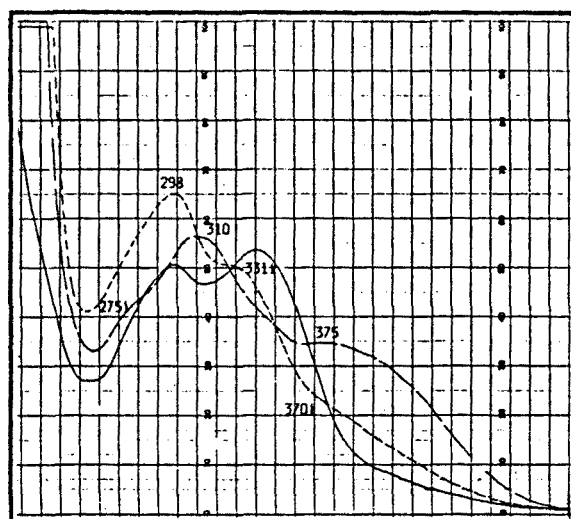
FIGURA IV-53: Espectros UV-visible de la sustancia 0.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - . . . AlCl₃ + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
 - . . . NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	297	335		
NaOMe:	270	323i	375	
AlCl ₃ :	272	309	364	425i
AlCl ₃ + HCl:	250i	278i	307	357
NaOAc:	275i	310	375	
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	298	331i	360i	

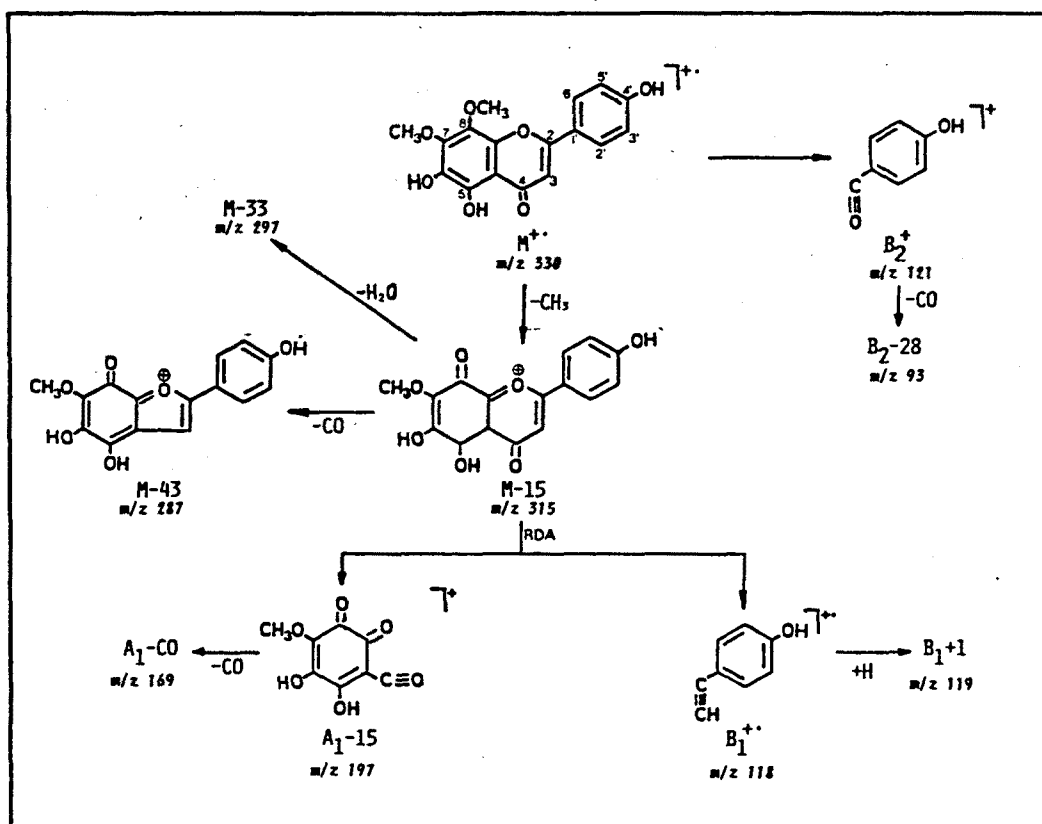
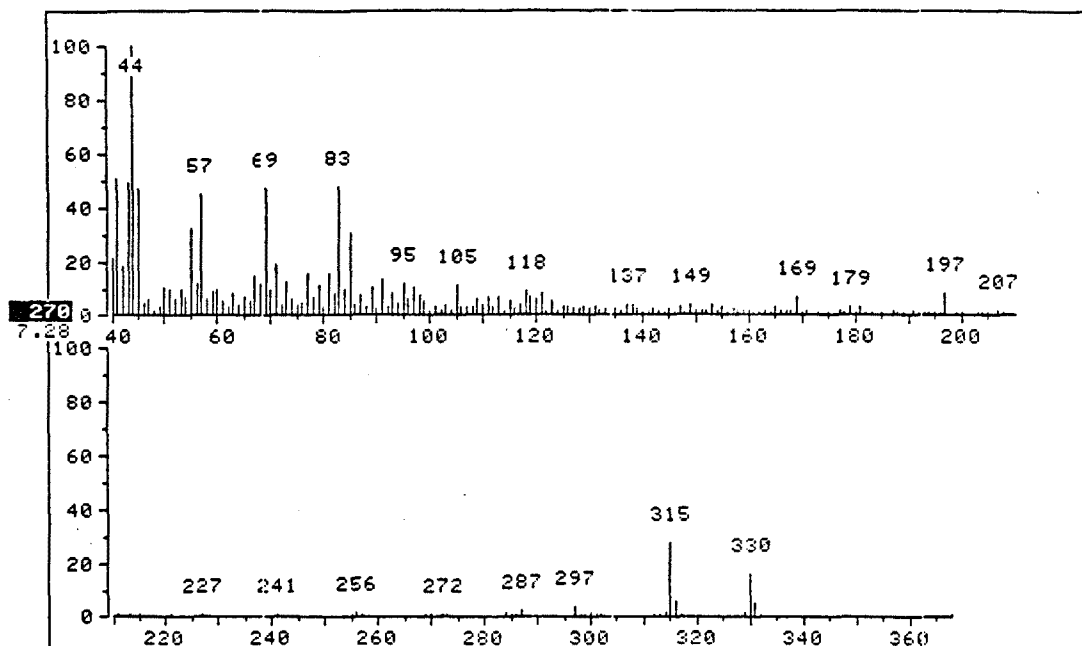


FIGURA IV-54: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia 0.

P) Estructura de la sustancia P.

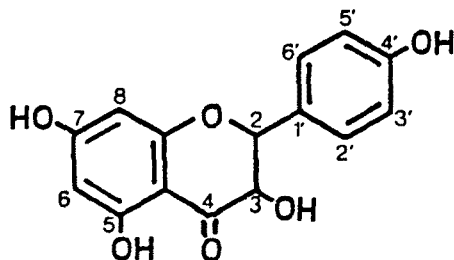
La sustancia P ha sido aislada, también, del extracto etéreo.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-55.
- Espectrometría de masas (EI-MS) :figura IV-56.
- Espectroscopía $^1\text{H-NMR}$: figura IV-58.
- Espectroscopía $^{13}\text{C-NMR}$: figura IV-57 (espectro normal y experimento SEFT).

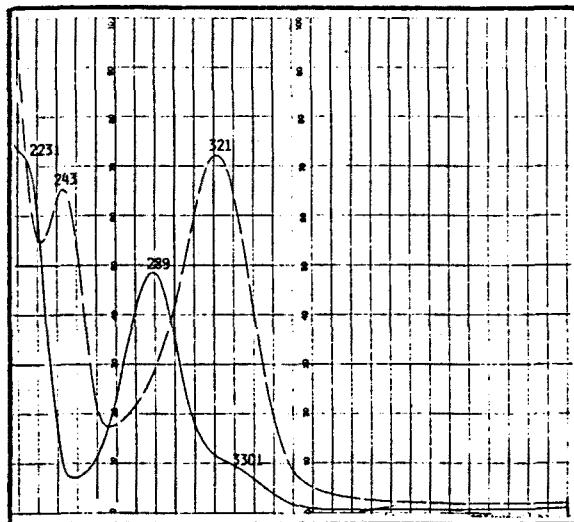
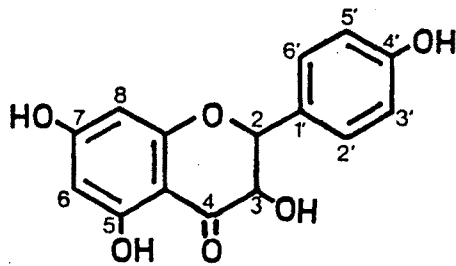
Tanto el comportamiento cromatográfico de la sustancia P como los espectros UV-visible EI-MS y de $^1\text{H-NMR}$, indican que se trata de la 3,5,7,4'-(OH)₄-flavanona. No obstante, el espectro de $^1\text{H-NMR}$ presenta un grupo de señales, que integran tres protones, entre 4,3 y 5,8 ppm, y que aparentemente no coinciden con las de los protones H-2 y H-3 de dihidroflavonoles, los cuales suelen aparecer como dobletes (J = 11 Hz, aprox.) en la zona comprendida entre 4,5 y 5,3 ppm. Esto nos llevó a registrar los espectros de $^{13}\text{C-NMR}$ normal y SEFT, que corroboraron la estructura inicialmente propuesta.

La irregularidad observada en la zona mencionada del espectro $^1\text{H-NMR}$ se debe a la señal del protón del 3-OH y al acoplamiento de éste con el H-3.

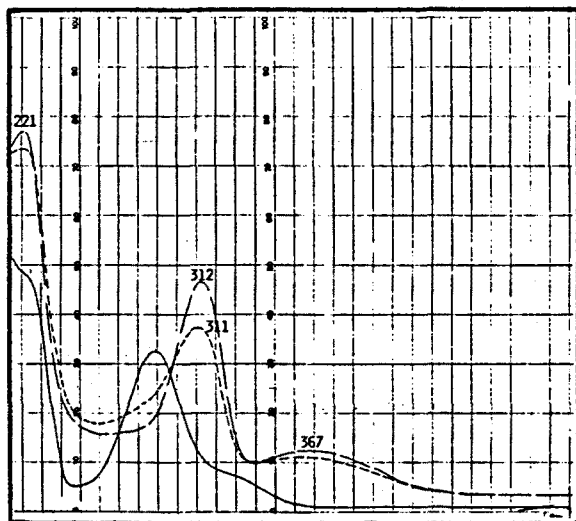


Substancia P: 3,5,7,4'-(OH)₄-flavanona
(dihidro Kempferol).

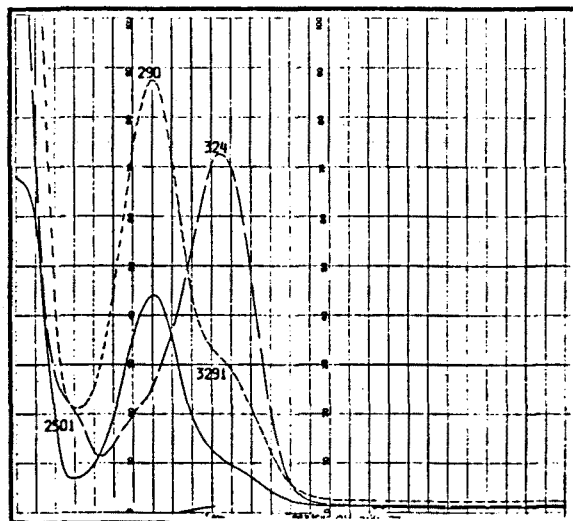
FIGURA IV-55: Espectros UV-visible de la sustancia P.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - - - - AlCl₃ + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
 - - - - NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	212i	223i	289	330i
NaOMe:	243	321		
AlCl ₃ :	221	312	367	
AlCl ₃ + HCl:	221	311	367	
NaOAc:	251i	282i	324	
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	290	329		

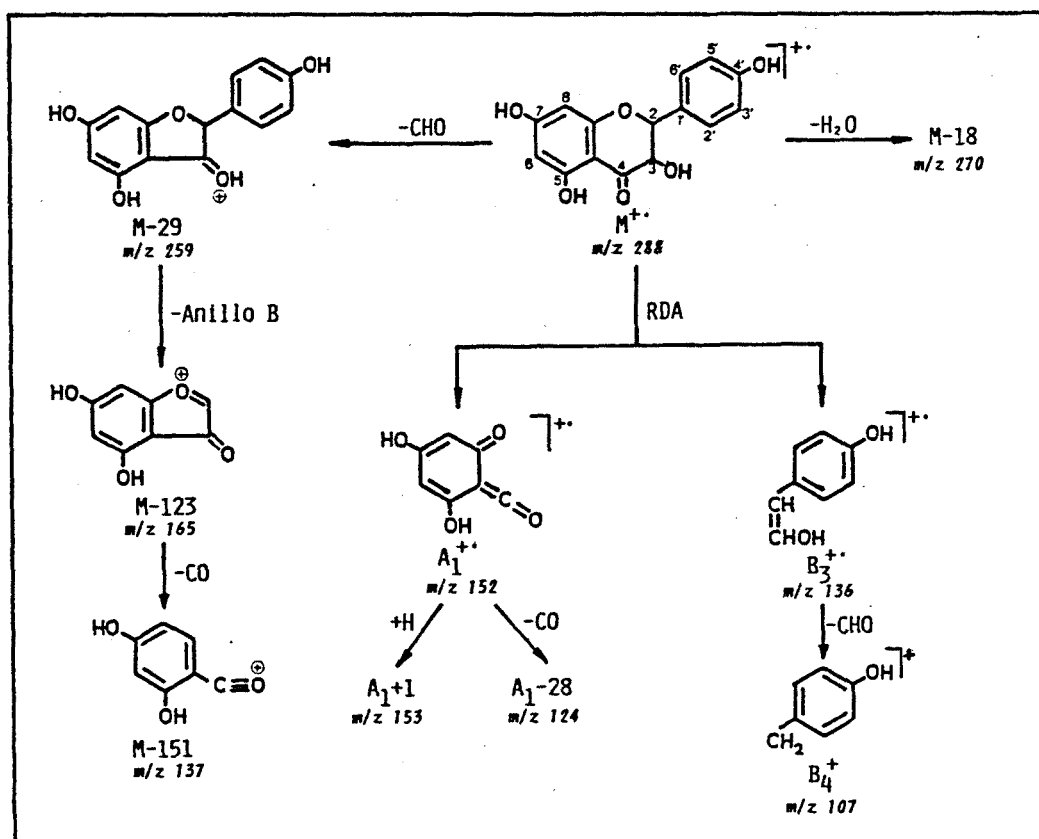
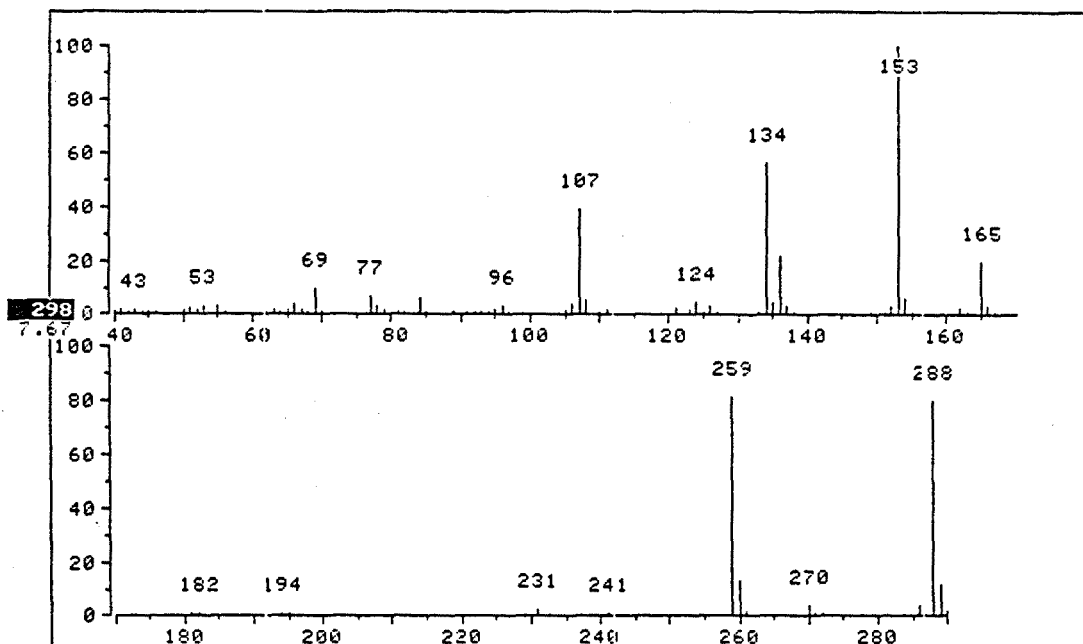


FIGURA IV-56: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia P.

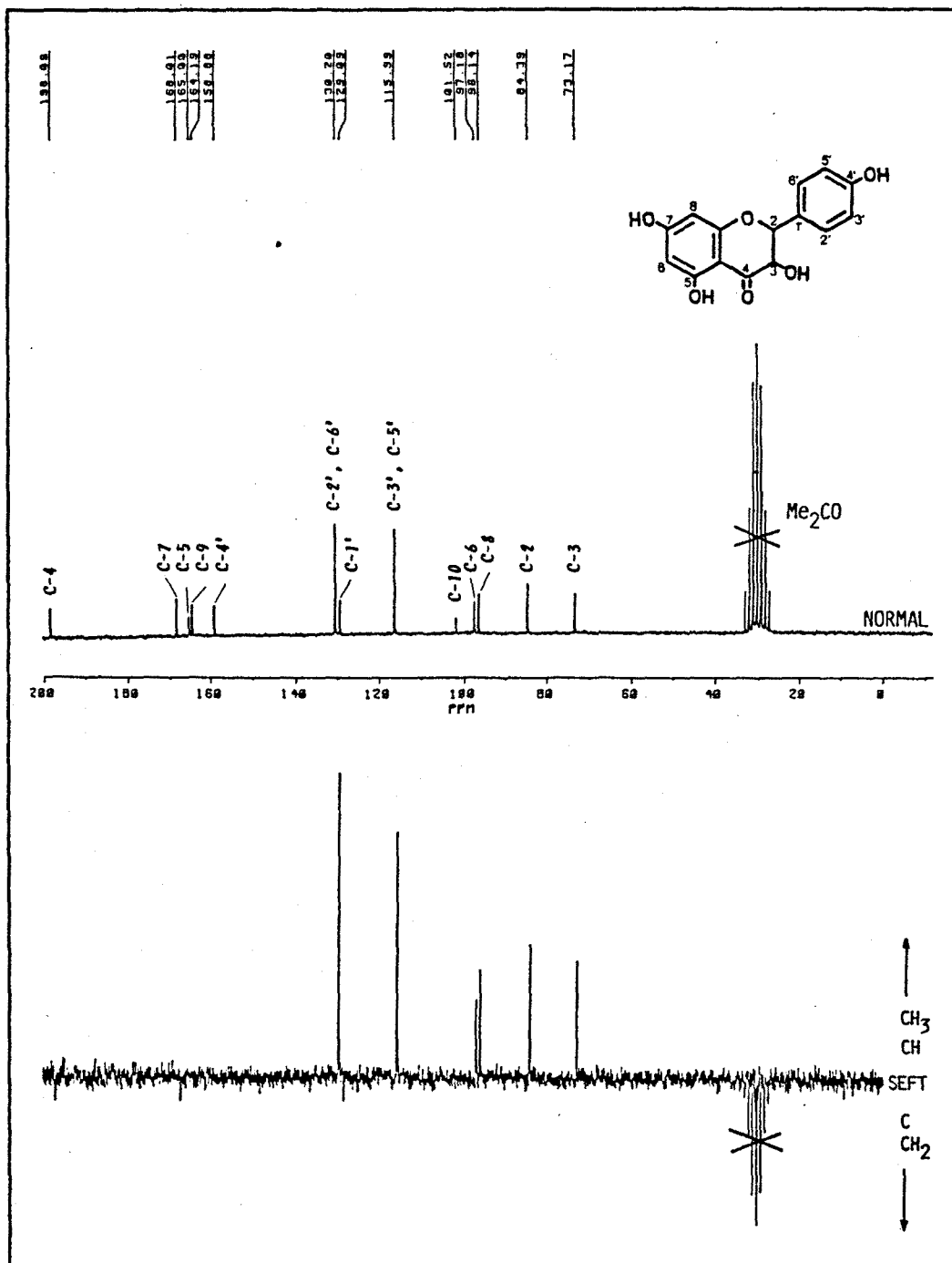


FIGURA IV-57: Espectro ^{13}C -NMR y experimento SEFT (20,14 MHz, $\text{d-Me}_2\text{CO}$) de la sustancia P.

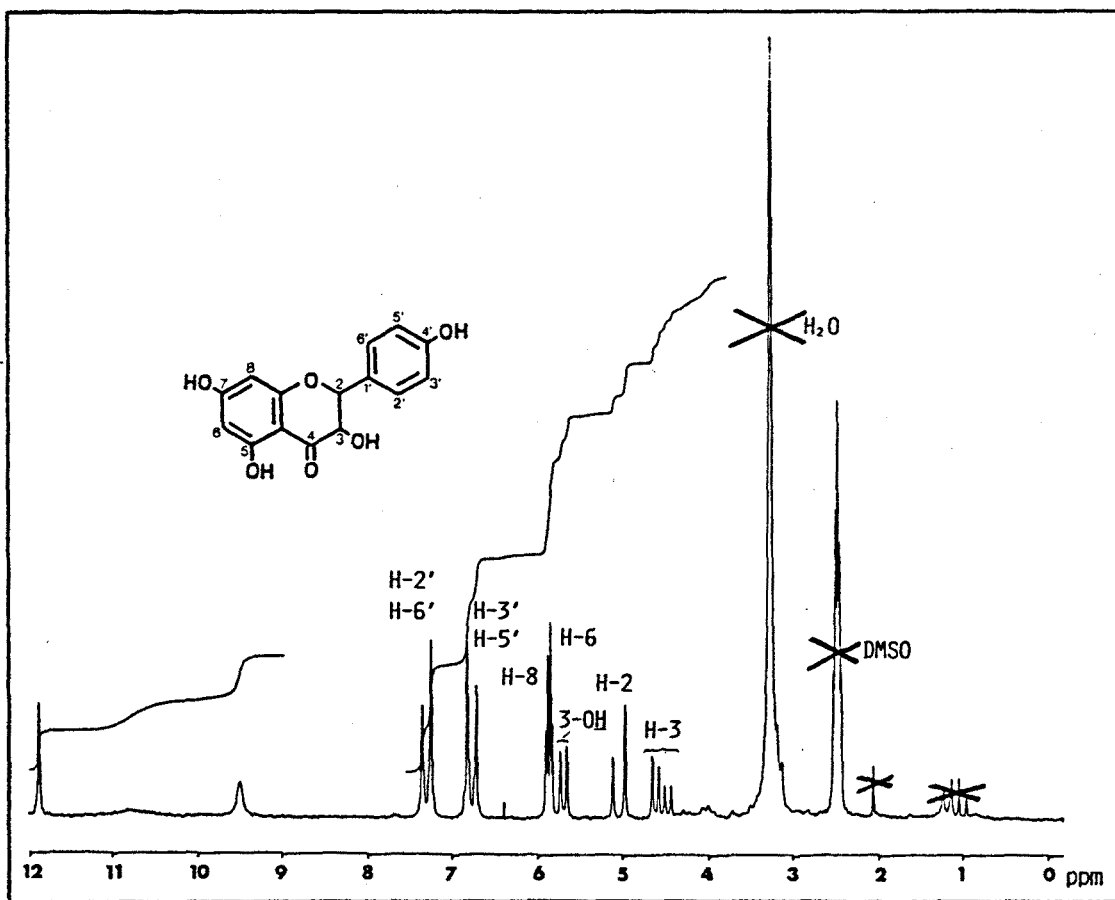
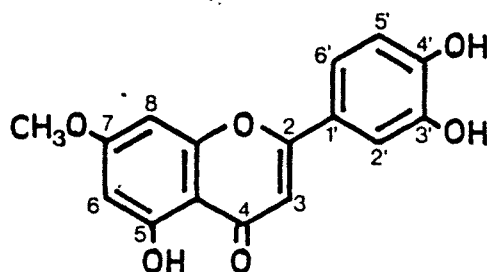


FIGURA IV-58: Espectro $^1\text{H-NMR}$ (80 MHz, $d\text{-DMSO}$) de la substancia P.

Q) Estructura de la sustancia Q.

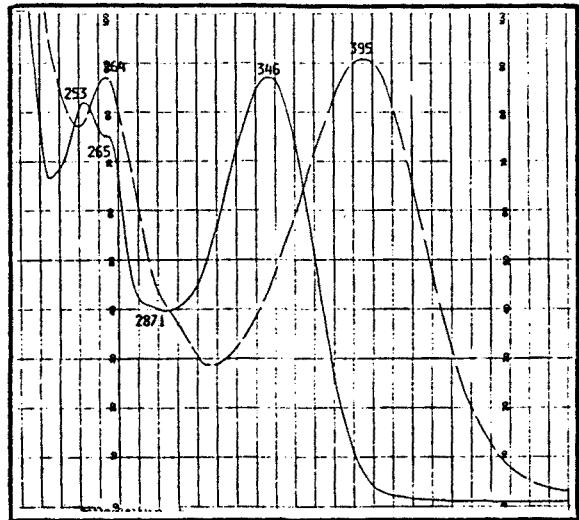
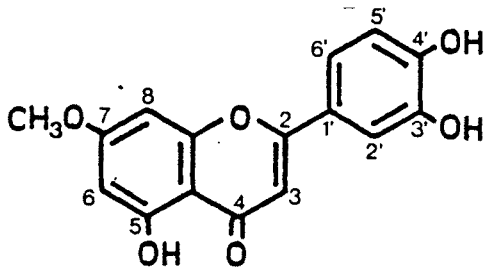
La sustancia Q ha sido aislada del extracto etéreo e identificada como la 5,3',4'-(OH)₃-7-OMe-flavona o 7-O-Me-luteolina, a partir de los siguientes datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-59
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-60

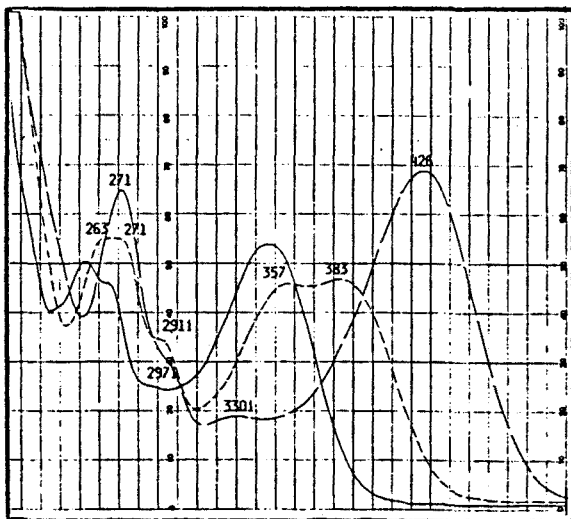


Substancia Q: 5,3',4'-(OH)₃-7-OMe-flavona
(7-O-Me-luteolina)

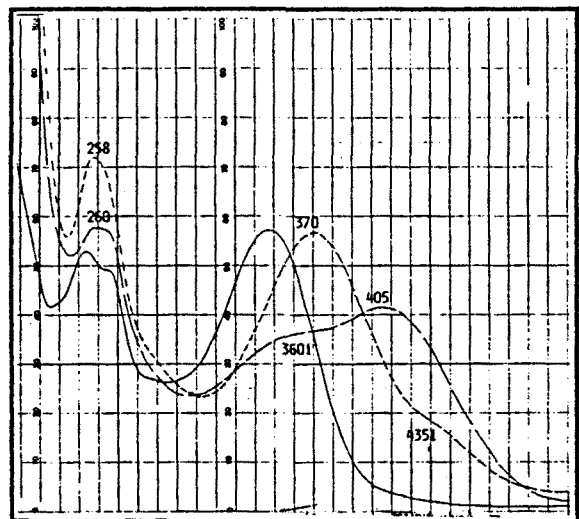
FIGURA IV- 59: Espectros UV-visible de la sustancia Q.



————— MeOH - - - - - NaOMe



————— MeOH - - - - - AlCl₃,
 - - - - - AlCl₃, + HCl



————— MeOH - - - - - NaOAc
 - - - - - NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	265	287i	346
NaOMe:	264	300i	395	
AlCl ₃ :	271	297i	330i	426
AlCl ₃ , + HCl:	263	271	291i	357. 383
NaOAc:	260	360i	405	
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	258	370	435i	

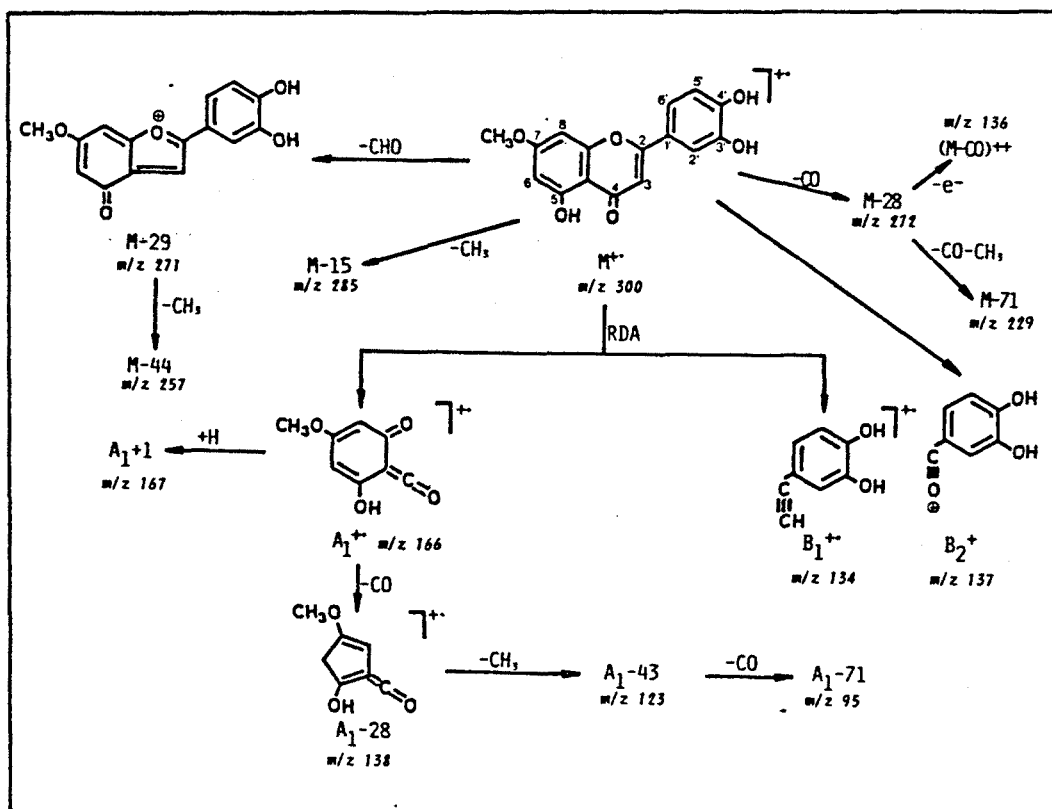
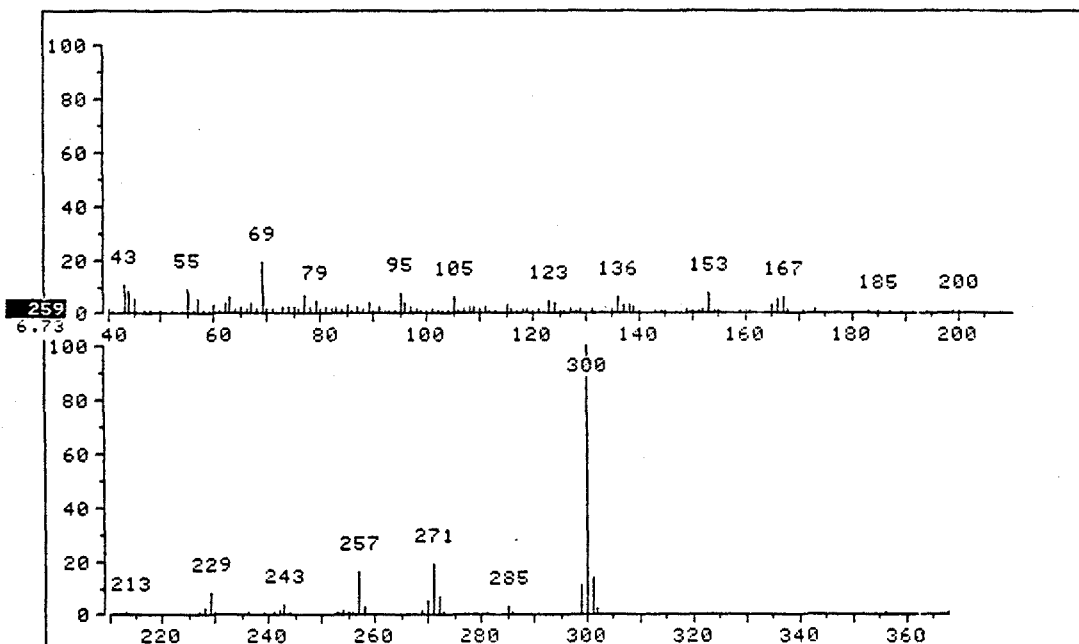
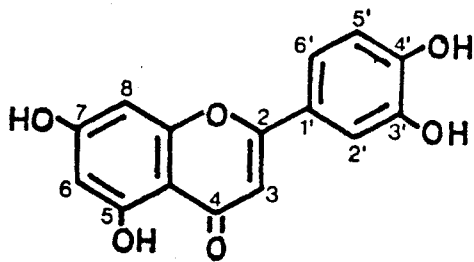


FIGURA IV-60: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia Q.

R) Estructura de la sustancia R.

El compuesto R ha sido aislado, también, del extracto etéreo. En base a sus datos analíticos se ha identificado como la 5,7,3',4'-(OH)₄-flavona o luteolina:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-62.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-63.
- Espectroscopía ¹H-NMR: figura IV-61.



Substancia R: 5,7,3',4'-(OH)₄-flavona (luteolina).

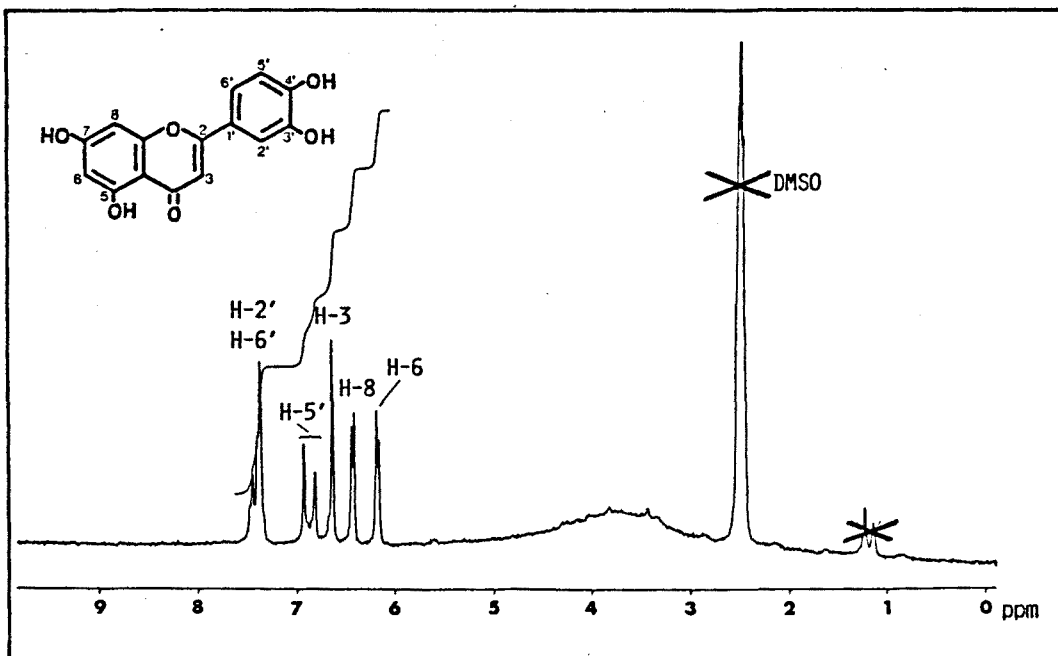
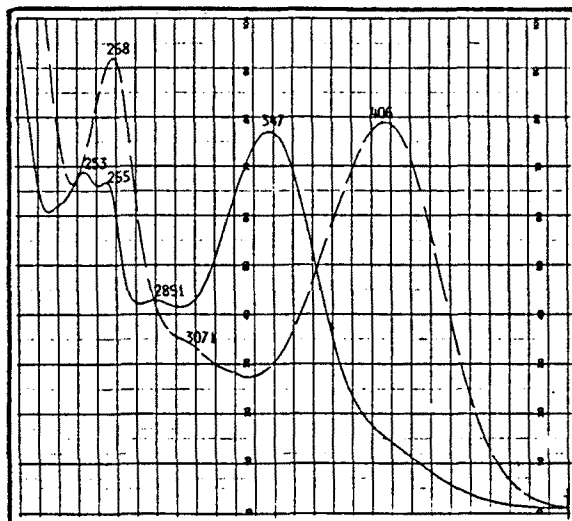
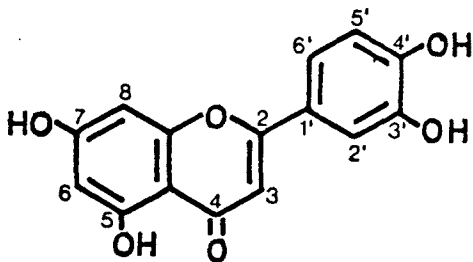
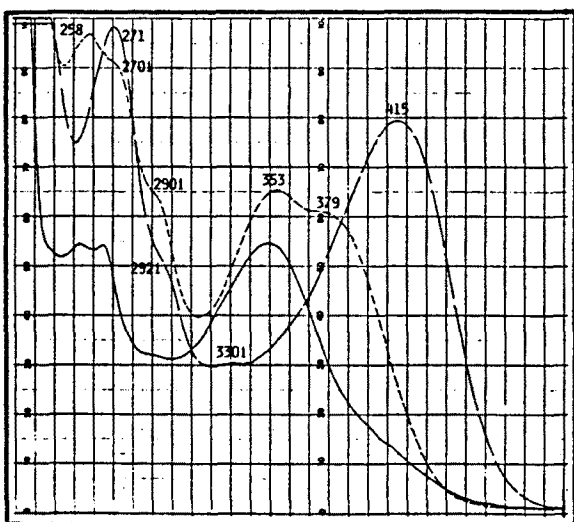


FIGURA IV-61: Espectro ¹H-NMR (80 MHz, d-DMSO) de la sustancia R.

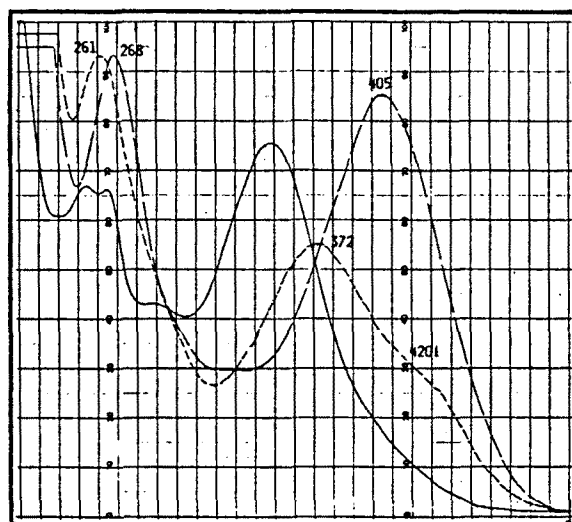
FIGURA IV-62: Espectros UV-visible de la sustancia R.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - . . . AlCl₃ + HCl



———— MeOH - . . . NaOAc
 - . . . NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	265	289i	347
NaOMe:	268	307i	406	
AlCl ₃ :	271	292i	330i	415
AlCl ₃ + HCl:	258	270i	290i	353 379
NaOAc:	268	405		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	261	372	420i	

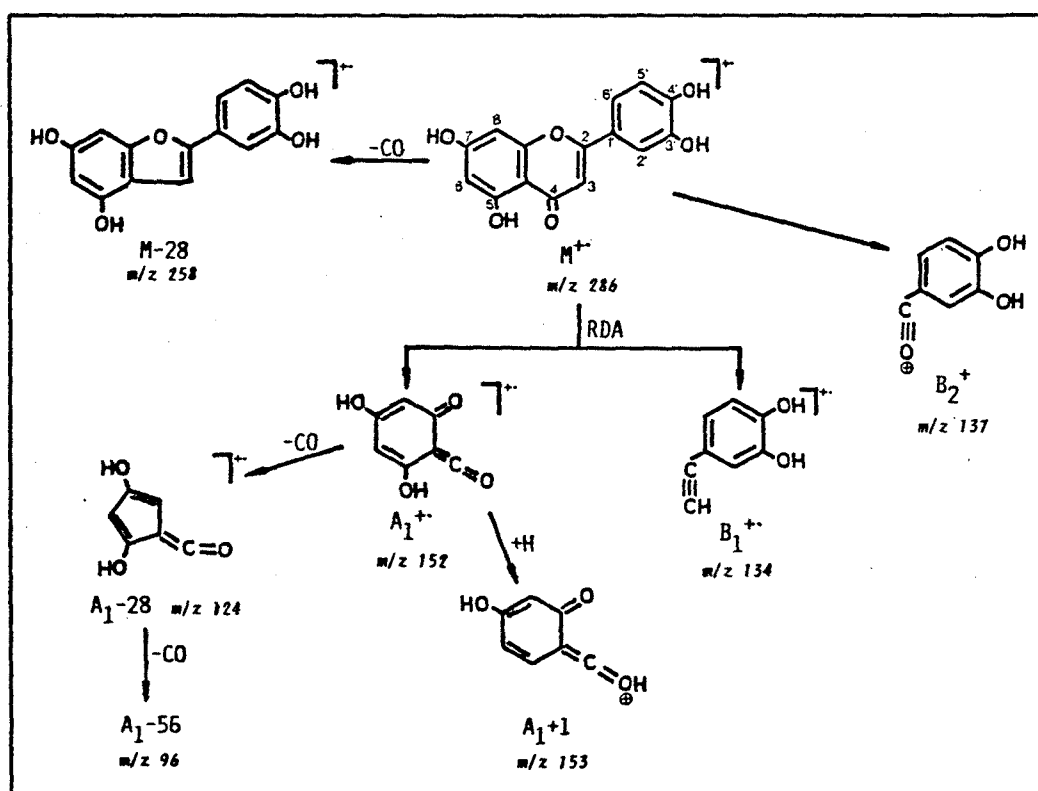
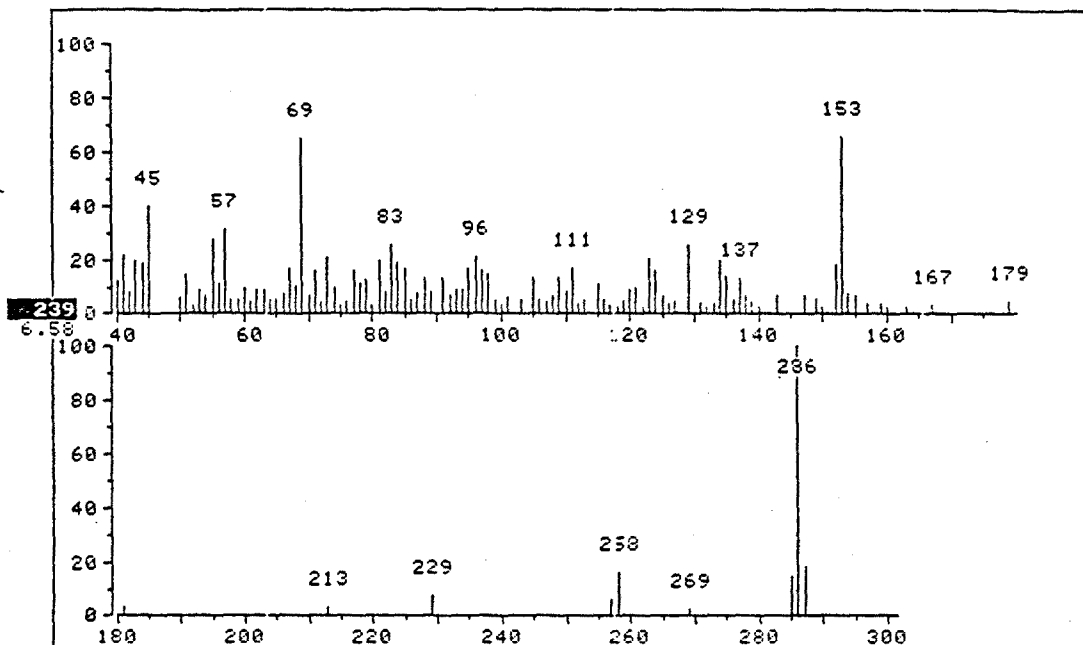
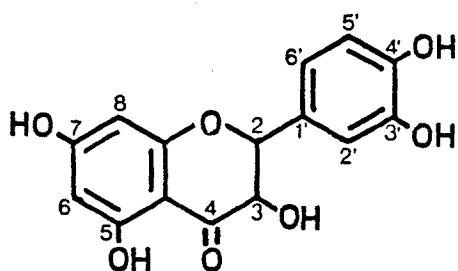


FIGURA IV-63: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia R.

S) Estructura de la sustancia S.

La sustancia S ha sido aislada del extracto etéreo e identificada como la 3,5,7,3',4'-(OH)₅-flavanona o taxifolina a partir de los siguientes datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-65.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-66.
- Espectroscopía ¹H-NMR: figura IV-64.



Sustancia S: 3,5,7,3',4'-(OH)₅-flavanona (taxifolina).

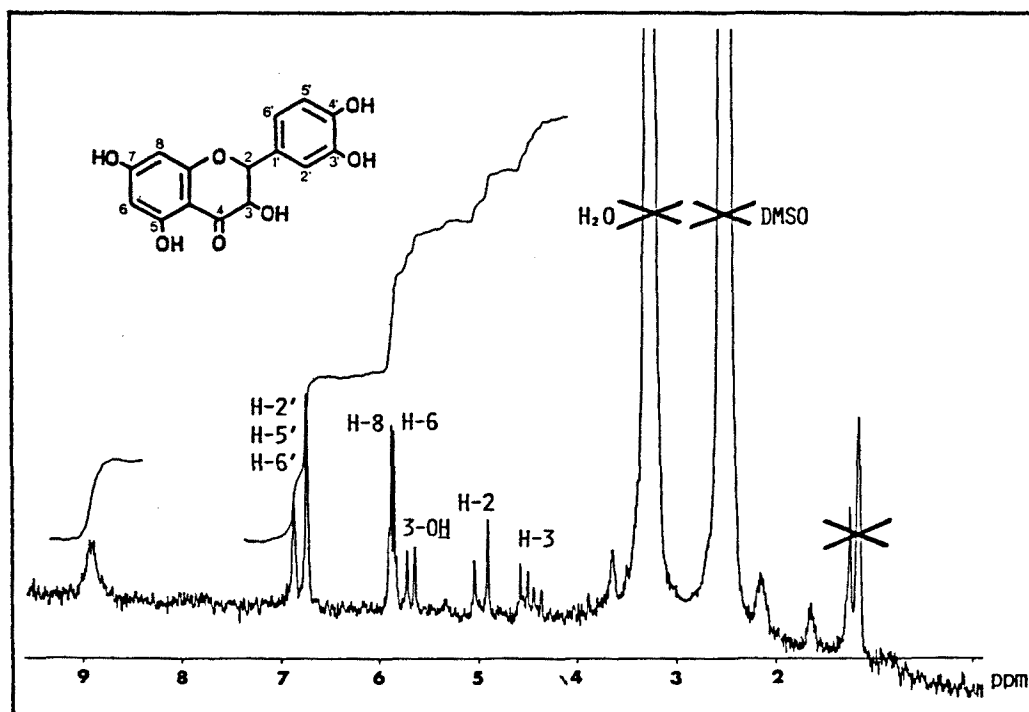
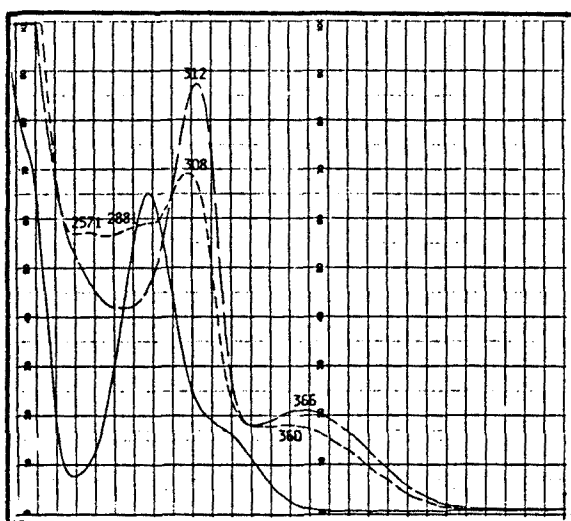
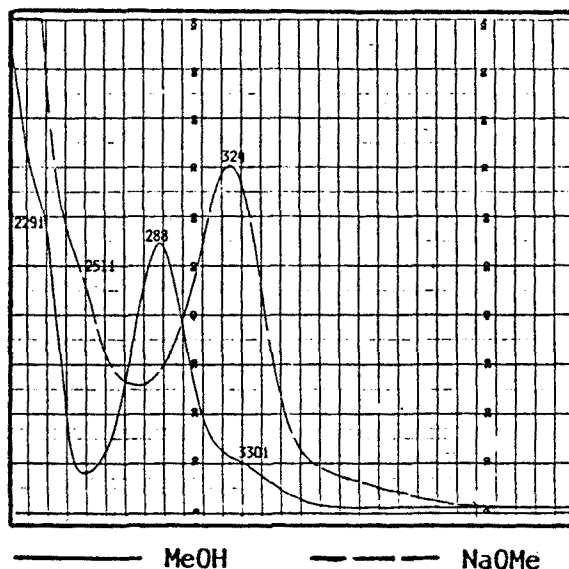
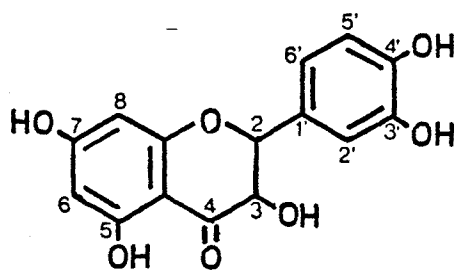
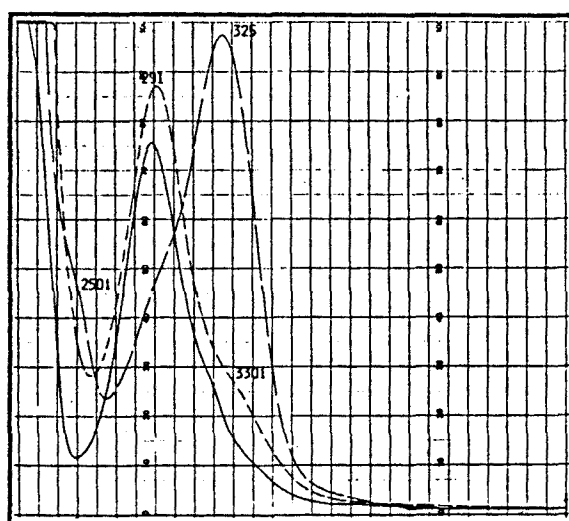


FIGURA IV-64: Espectro ¹H-NMR (80 MHz, d-DMSO) de la sustancia S.

FIGURA IV-65: Espectros UV-visible de la sustancia S.



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - - - - AlCl₃ + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
 - - - - NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	229i	288	330i
NaOMe:	251i	324	
AlCl ₃ :	312	366	
AlCl ₃ + HCl:	257i	288i	308 360
NaOAc:	250i	325	
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	291	330	

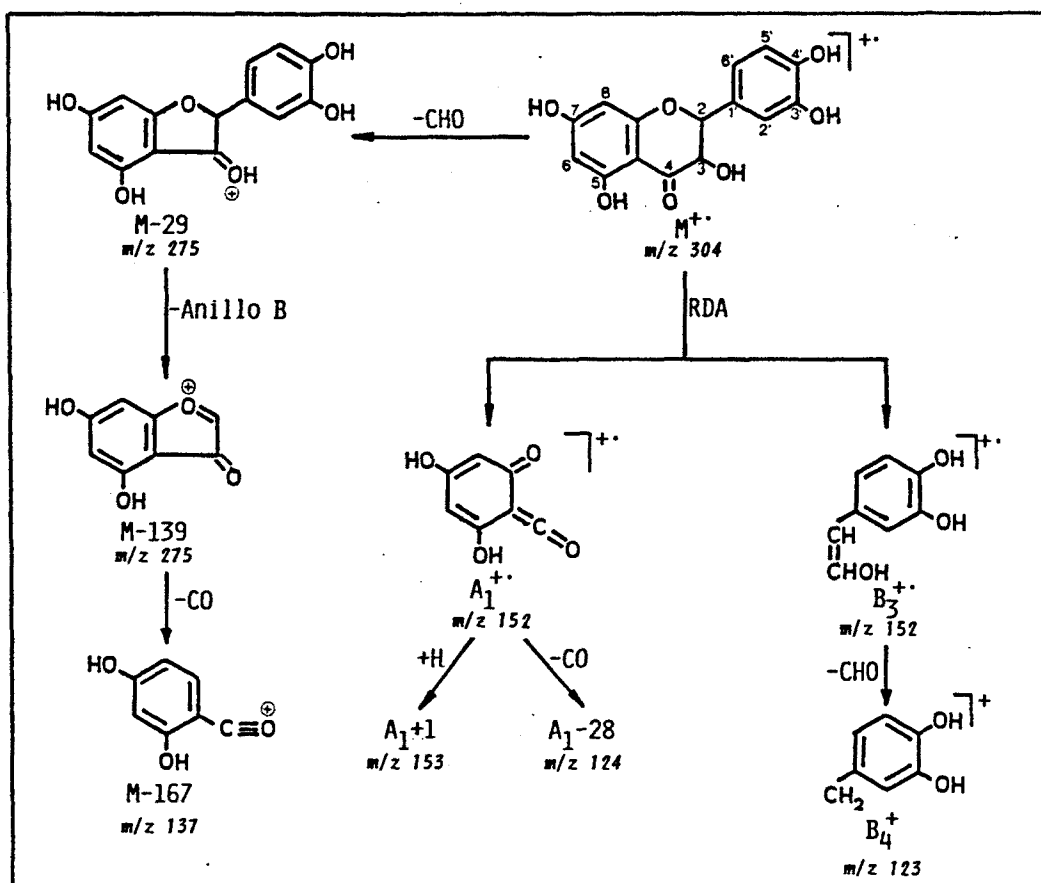
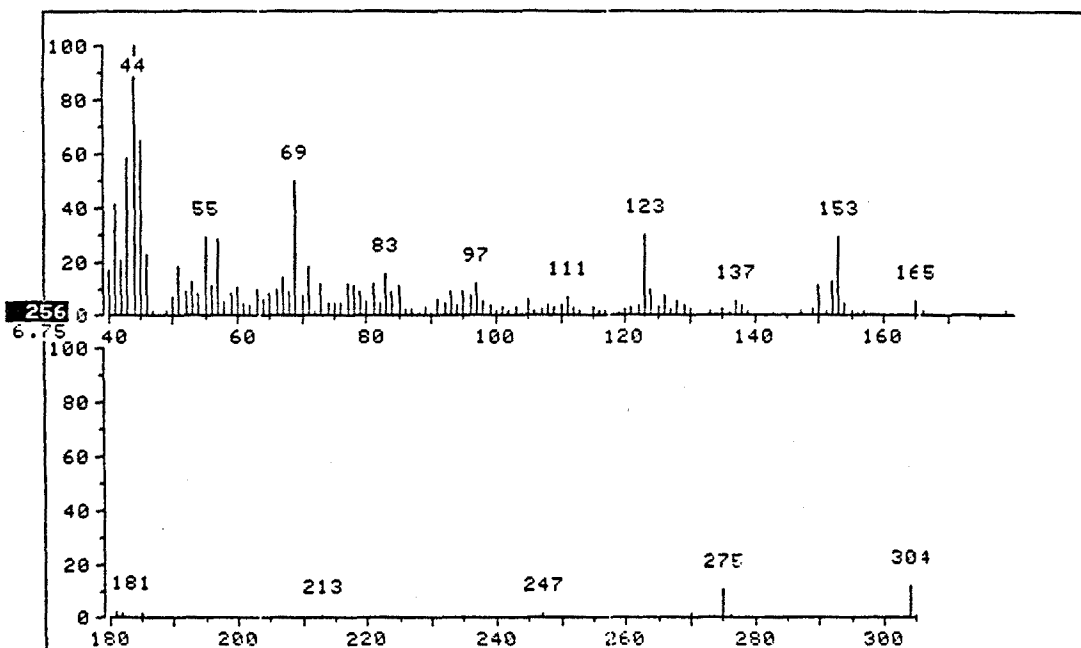
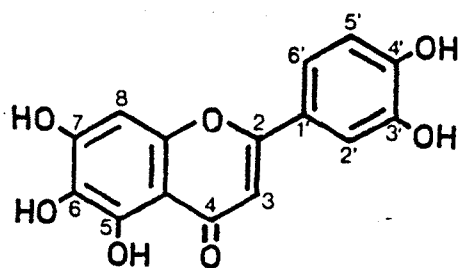


FIGURA IV-66: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia S.

T) Estructura de la substancia T.

La substancia T ha sido aislada, también, del extracto etéreo e identificada en base a sus datos analíticos como la 5,6,7,3',4'-(OH)₅-flavona o 6-OH-luteolina:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-68.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-69.
- Espectroscopía ¹H-NMR: figura IV-67.



Substancia T: 5,6,7,3',4'-(OH)₅-flavona (6-OH-luteolina).

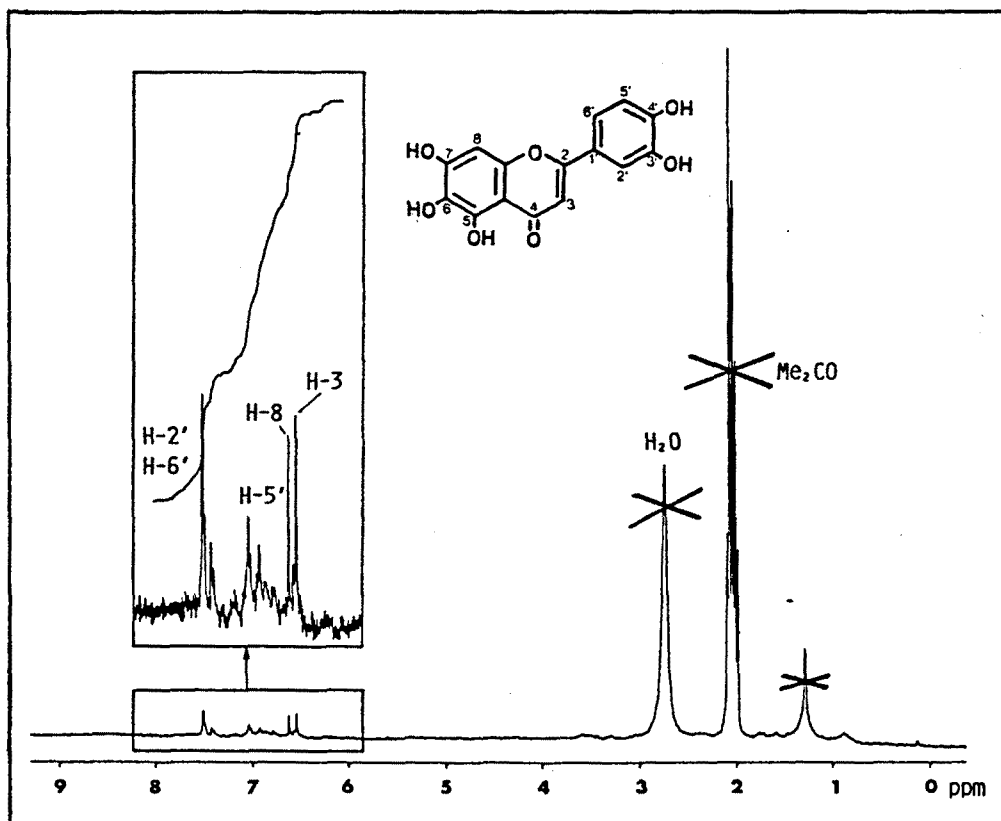
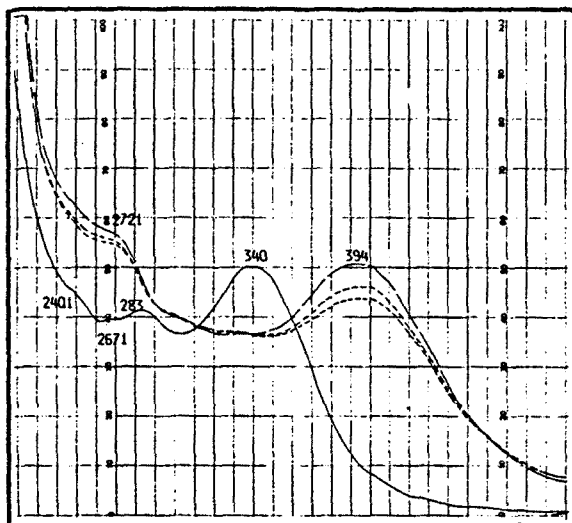
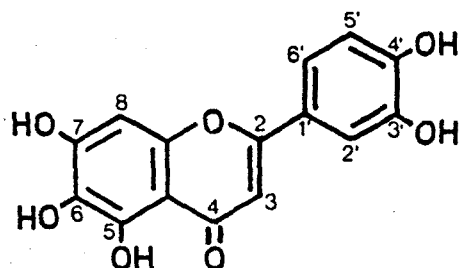
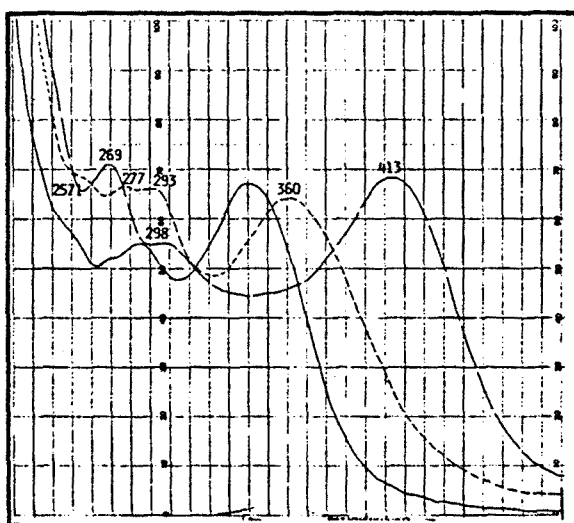


FIGURA IV-67: Espectro ¹H-NMR (80 MHz, d-Me₂CO) de la substancia T.

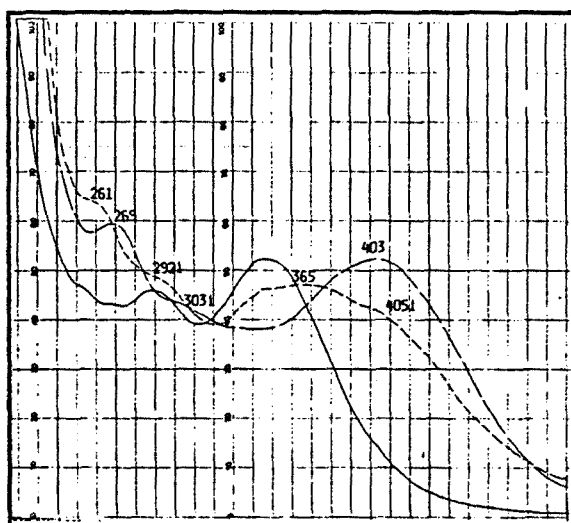
FIGURA IV-68: Espectros UV-visible de la sustancia T.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - - - - AlCl₃ + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
 - - - - NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	240i	267i	283	340
NaOMe:	272i	394	(descomposición)	
AlCl ₃ :	269	298	413	
AlCl ₃ + HCl:	257i	277	293	360
NaOAc:	269	303i	403	
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	261	292i	365	405i

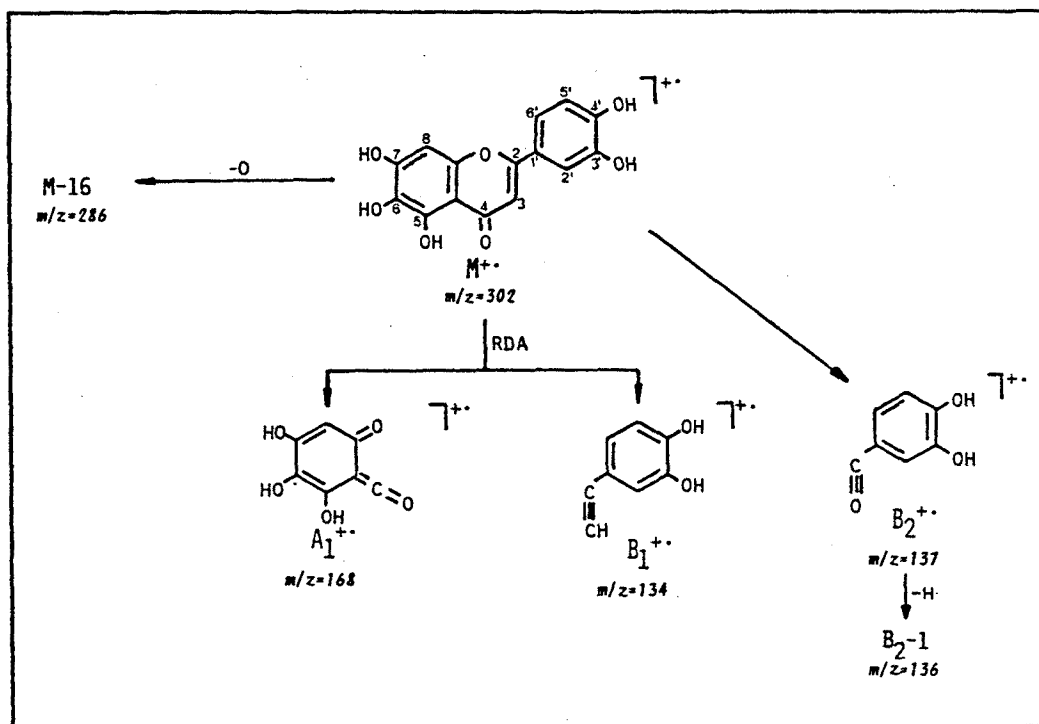
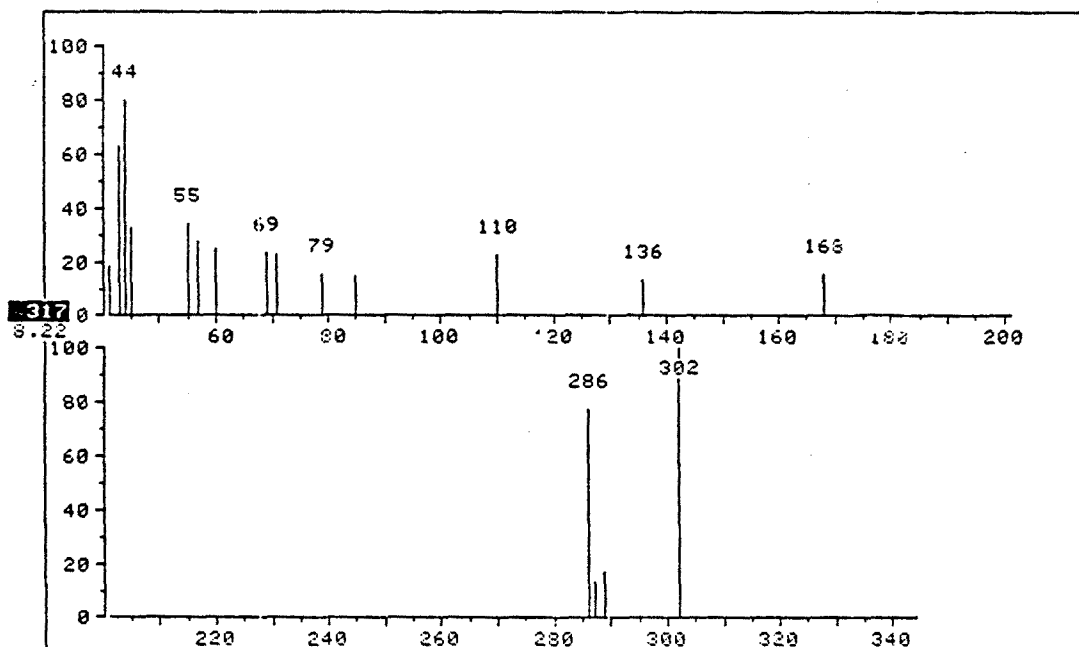


FIGURA IV-69: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia T.

U) Estructura de la sustancia U.

La sustancia U ha sido aislada a partir del extracto "acetato de etilo + butanol".

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico; tabla IV-8.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-72.
- Espectrometría FAB-MS: figura IV-73.
- Espectroscopía $^1\text{H-NMR}$: figura IV-70.
- Espectroscopía $^{13}\text{C-NMR}$: figura IV-71.

El comportamiento cromatográfico de la sustancia U, corresponde al de un heterósido polar.

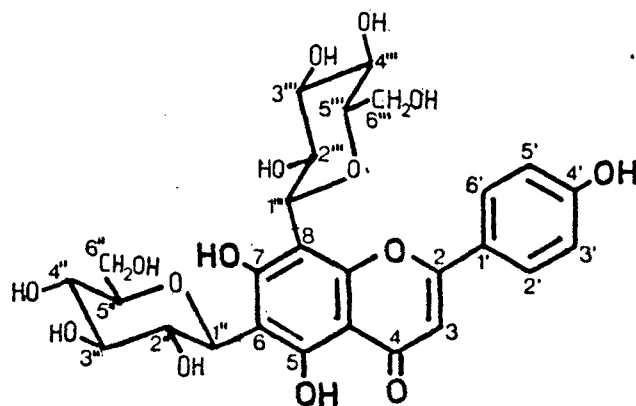
El estudio de U por espectroscopía UV-visible indica que se trata de un 5,7-(OH)₂-flavonoide ($\Delta\lambda\text{I}$ en AlCl_3+HCl respecto al MeOH de 52 nm y $\Delta\lambda\text{II}$ en NaOAc respecto al MeOH de 9 nm) mono-substituido en el anillo B (banda II en MeOH no desdoblada) por un hidroxilo libre en 4' ($\Delta\lambda\text{I}$ en NaOMe respecto a MeOH de 67 nm). Ello sugiere una estructura tipo C-heterósido, confirmada por la no liberación de aglicón tras hidrólisis de U.

El peso molecular de 594 ($(\text{M-H})^-$ a m/z 593) observado en el FAB-MS apunta hacia una apigenina di-C-glicosilada, en la que los dos azúcares son dos hexosas.

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ corrobora la ausencia de protones en 6 y 8. En él se aprecia el protón H-3 (6,7 ppm), un anillo B *p*-di-substituido, y doce protones osídicos (entre 3,5 y 5 ppm, aproximadamente).

La identificación de los azúcares en los C-heterósidos se realiza a partir del espectro $^{13}\text{C-NMR}$. En efecto, en el caso de U, éste muestra las señales correspondientes a dos moléculas de glucosa unidas directamente a los carbonos 6 y 8 del flavonoide, los cuales aparecen desplazados a 108 y 105,2 ppm, respectivamente.

Todo ello confirma que la substancia U es la 6,8-di-C-glucosil-apigenina o vicenina-2.



Substancia U: 6,8-di-C-glucosil-apigenina (vicenina-2).

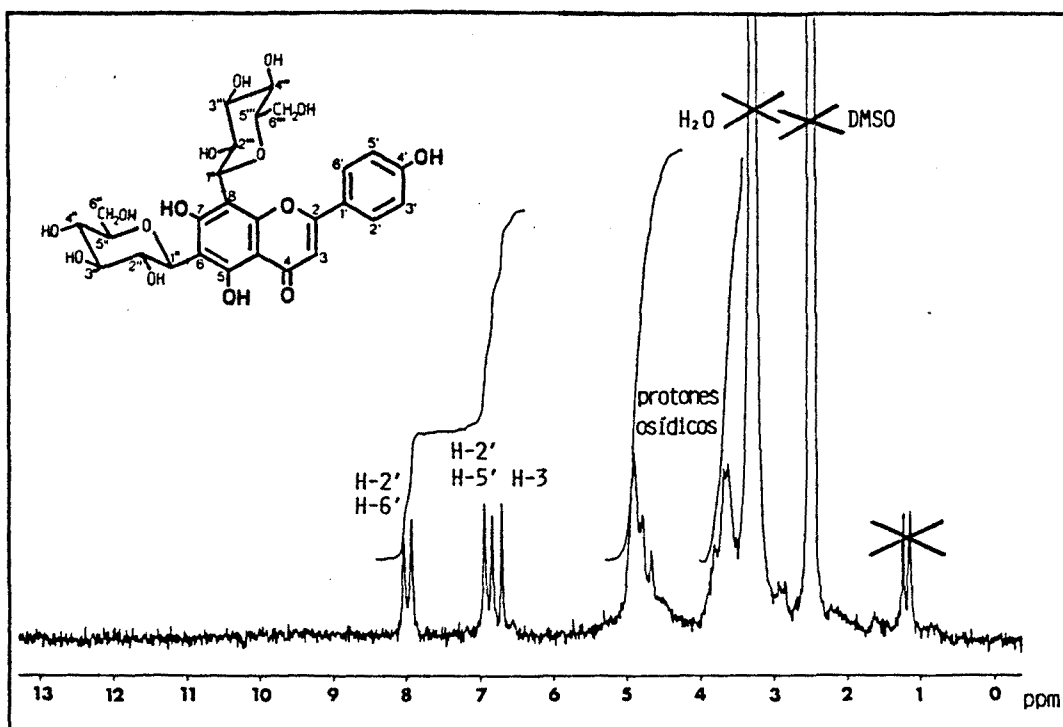


FIGURA IV-70: Espectro $^1\text{H-NMR}$ (80 MHz, d-DMSO) de la substancia U.

FIGURA IV-71: Espectro ^{13}C -NMR (50,29 MHz, d-DMSO) de la substancia U.

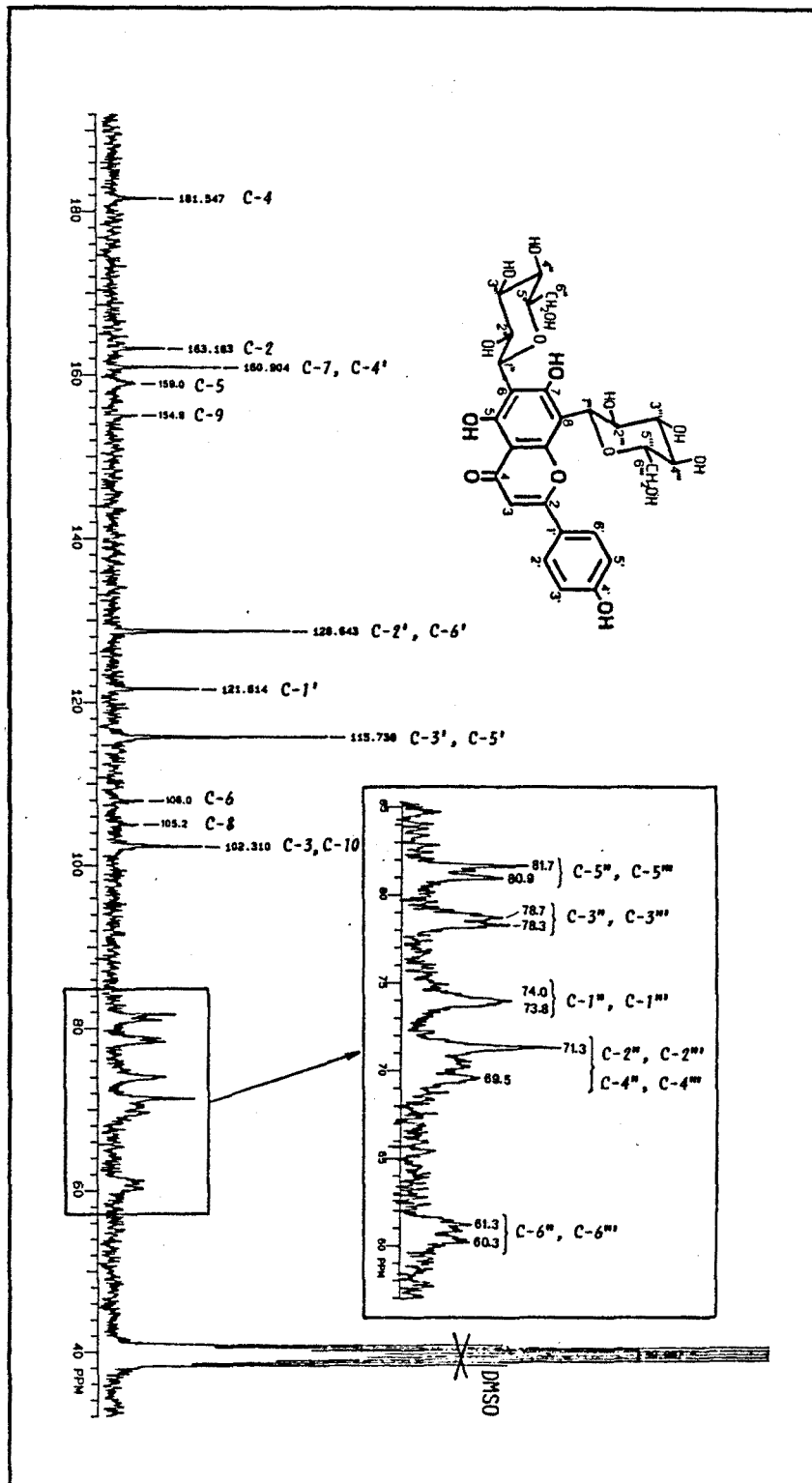
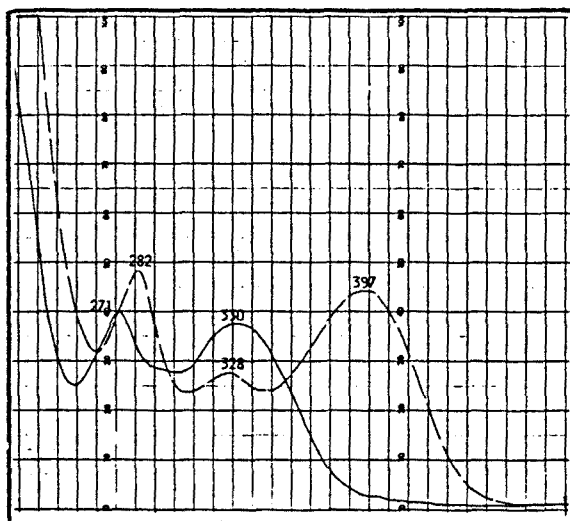
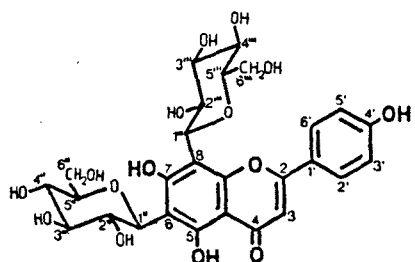
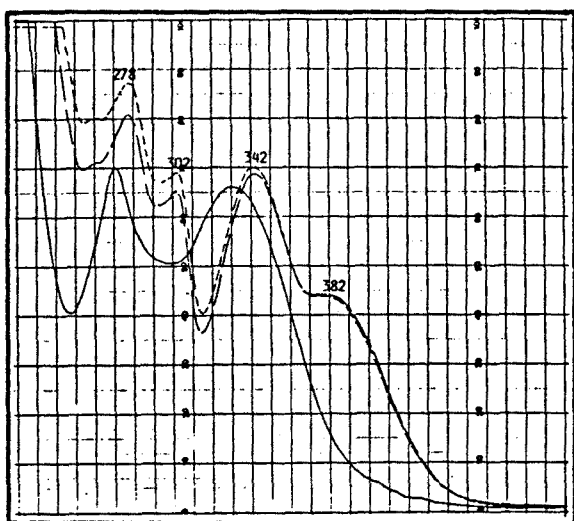


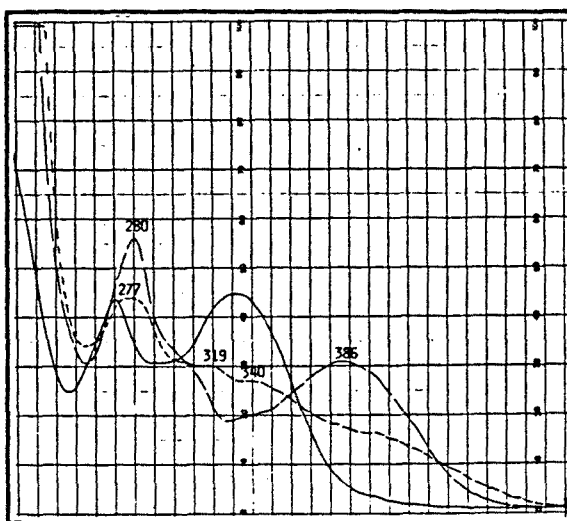
FIGURA IV-72: Espectros UV-visible de la sustancia U.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
- · - · AlCl₃, + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
- · - · NaOAc + H₃BO₃,

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	271	330		
NaOMe:	282	328	397	
AlCl ₃ ,:	278	302	342	382
AlCl ₃ , + HCl:	278	302	342	382
NaOAc:	280	386		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	277	319	340	

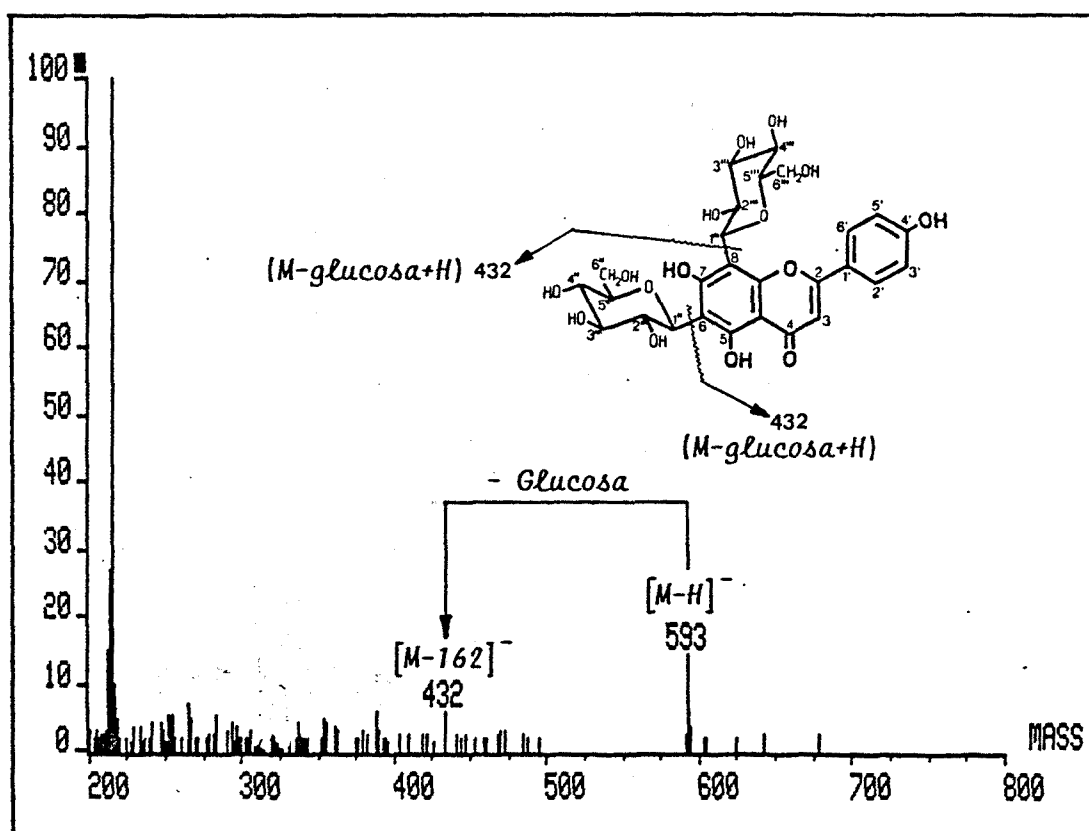


FIGURA IV-73: FAB-MS de iones negativos de la substancia U.

V) Estructura de la sustancia V.

La sustancia V ha sido aislada del extracto "acetato de etilo + butanol".

Datos analíticos:

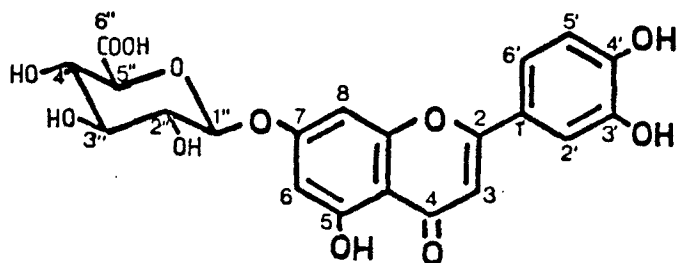
- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-8 (heterósido) y tabla IV-9 (aglicón).
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-78 (heterósido) y figura IV-79 (aglicón).
- Espectroscopía $^1\text{H-NMR}$: figura IV-74
- Espectroscopía $^{13}\text{C-NMR}$: figura IV-75
- Espectrometría FAB-MS: figura IV-77
- Thermospray: figura IV-76

El aglicón liberado por la hidrólisis de la sustancia V es la luteolina, lo que se deduce tanto de sus características cromatográficas como espectroscópicas UV-visible.

El estudio por espectroscopía UV-visible de V revela la existencia de una cadena osídica unida al hidroxilo de la posición 7. Sin embargo, después de hidrólisis de V durante 2 h con HCl 2N aq., no se detecta ningún azúcar por cromatografía en capa fina. Teniendo en cuenta, también, el elevado Rf de este heterósido en capa fina de celulosa eluida con H₂O, posiblemente se trate de un glucurónido.

Efectivamente, tras hidrólisis con HCl 2N aq. durante 1 h, el análisis del hidrolizado señala la existencia de ácido glucurónico.

Los espectros de $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FAB-MS y Thermospray confirman que la sustancia V es la 7-O-glucuronil-luteolina.



Substancia V: 7-O-glucuronil-luteolina.

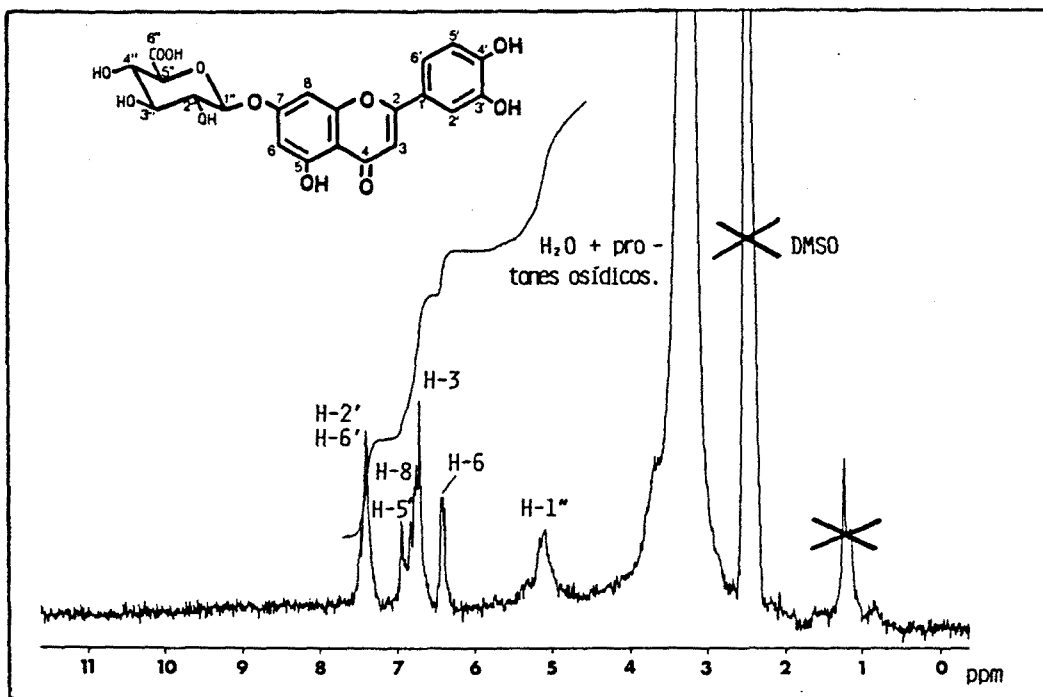


FIGURA IV-74: Espectro $^1\text{H-NMR}$ (80 MHz, d-DMSO) de la substancia V.

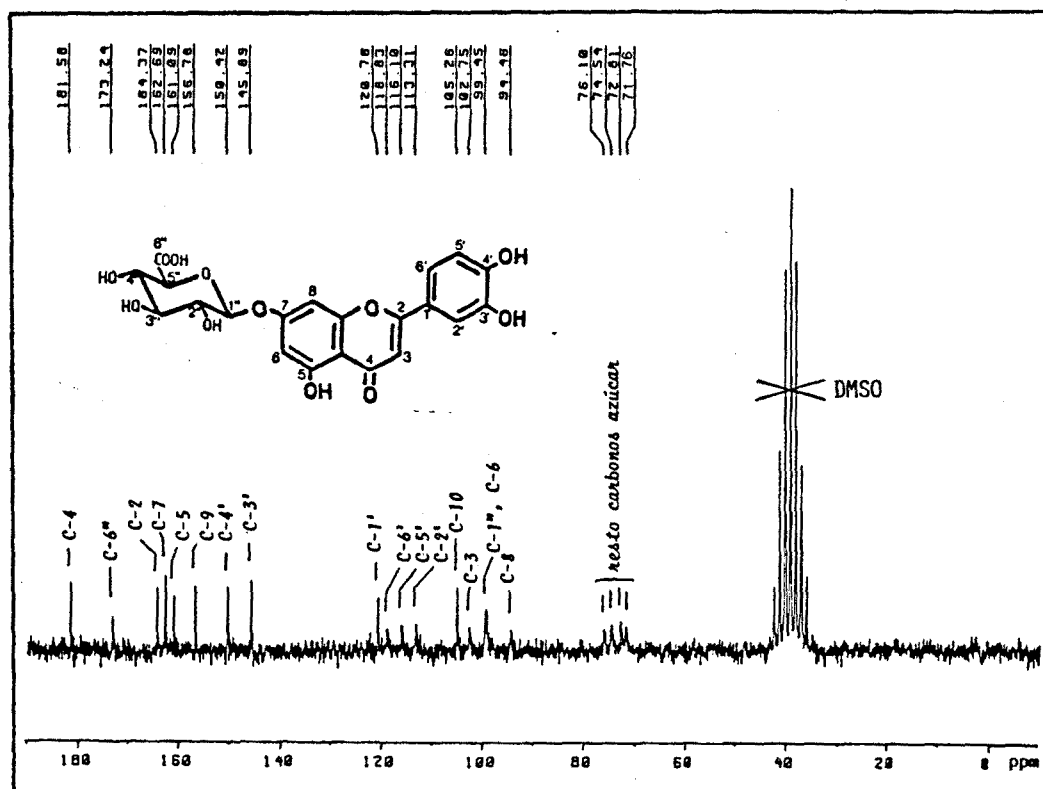


FIGURA IV-75: Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ (20,14 MHz, d-DMSO) de la substancia V.

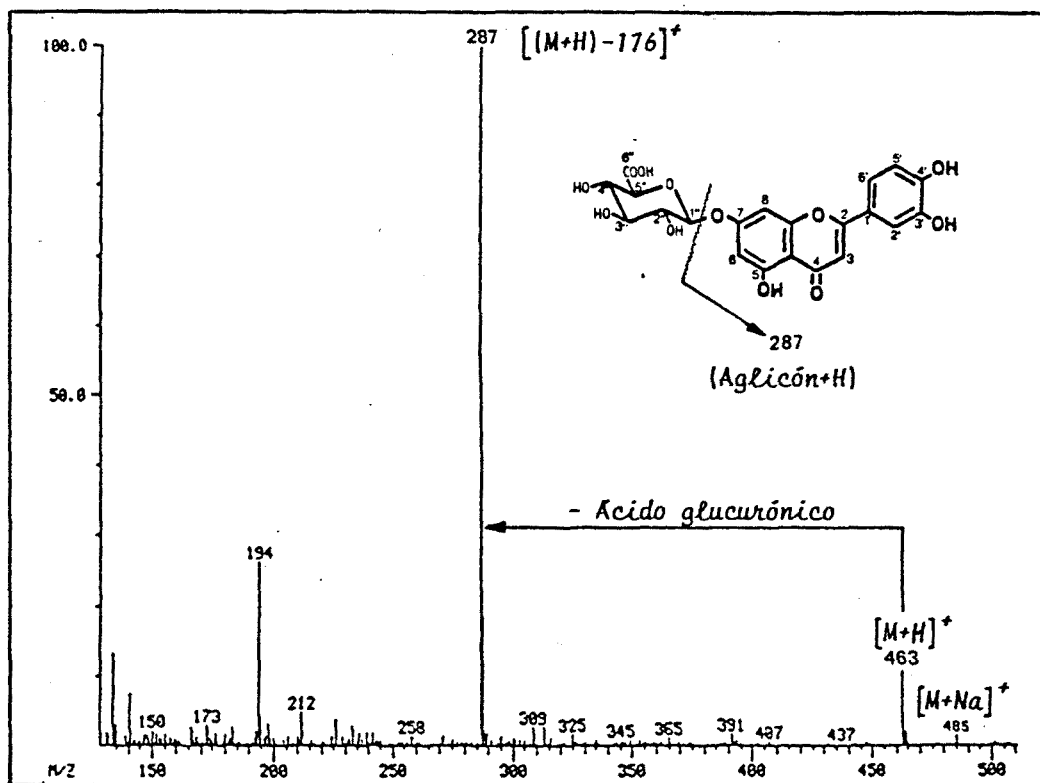


FIGURA IV-76: Thermospray-MS de iones positivos de la substancia V.

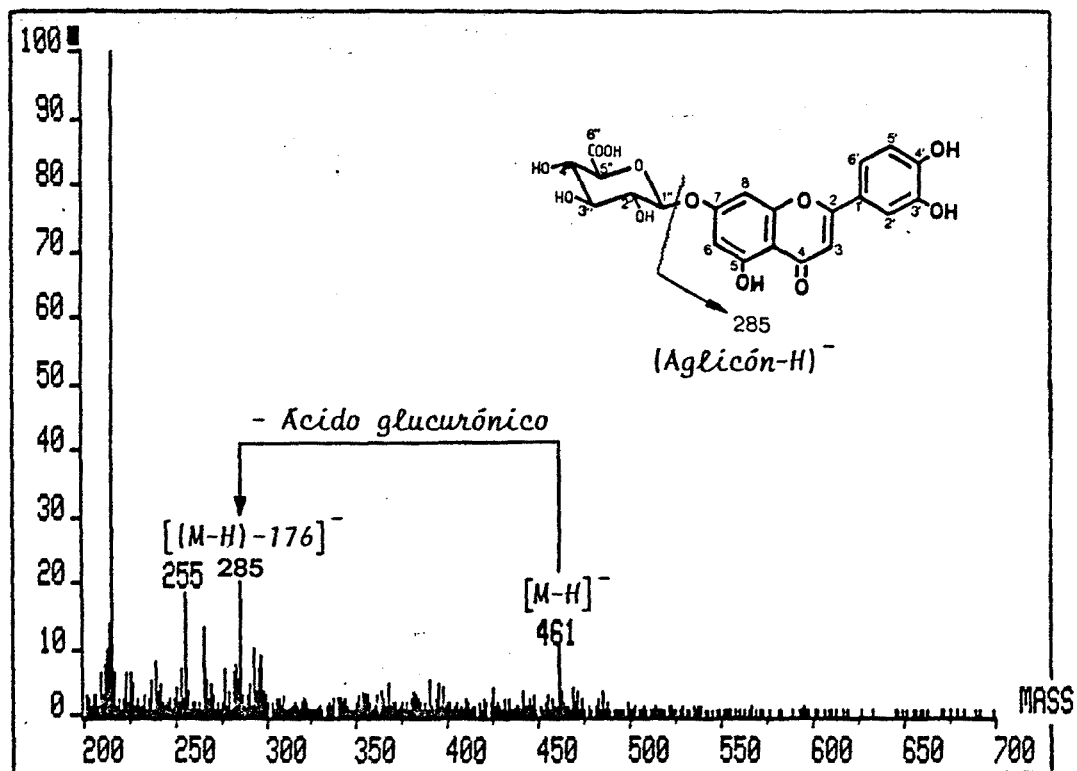
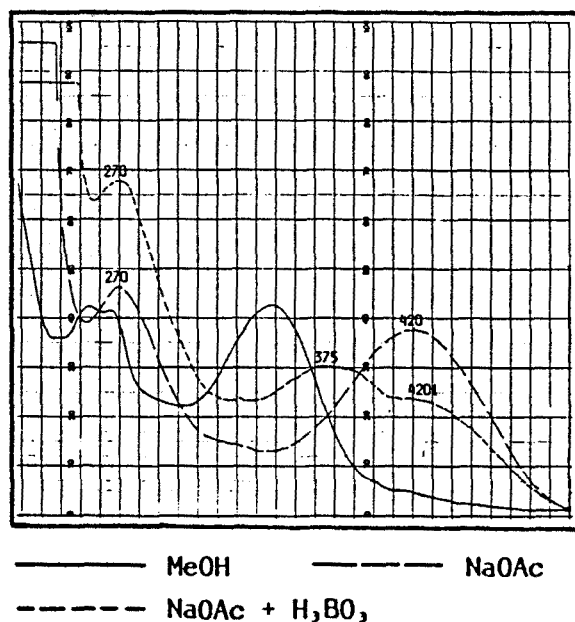
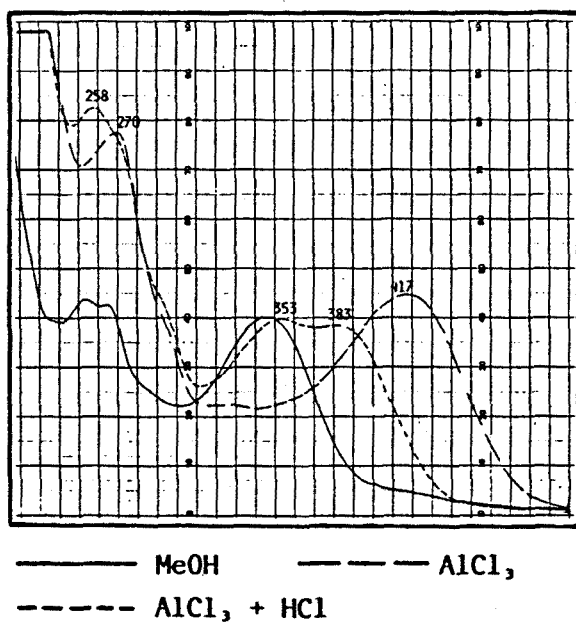
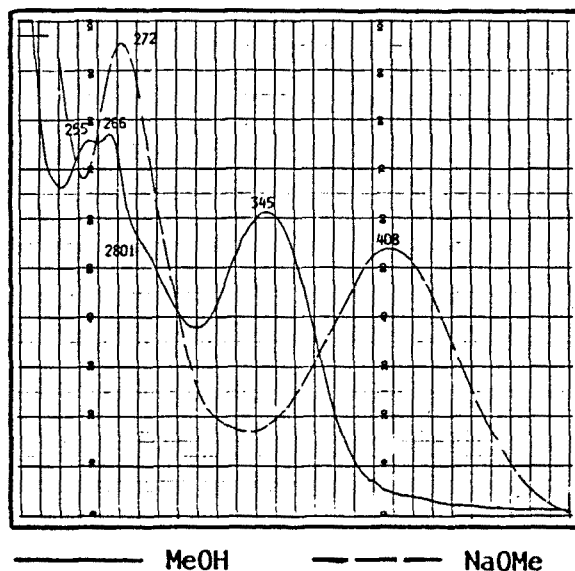
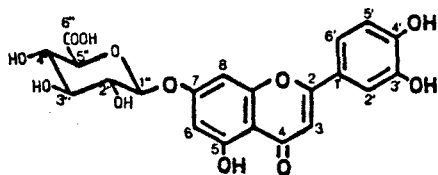


FIGURA IV-77: FAB-MS de iones negativos de la substancia V.

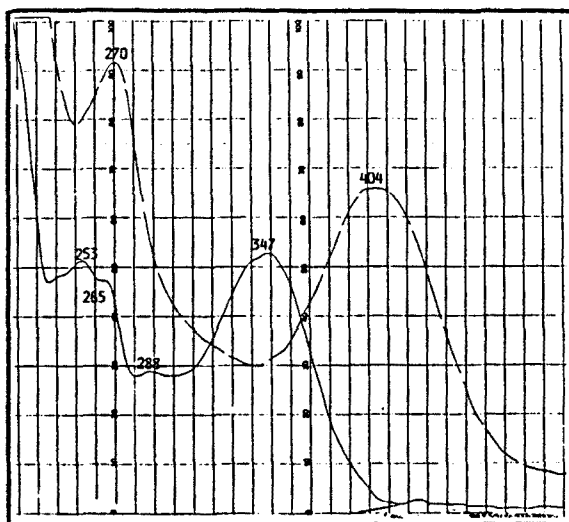
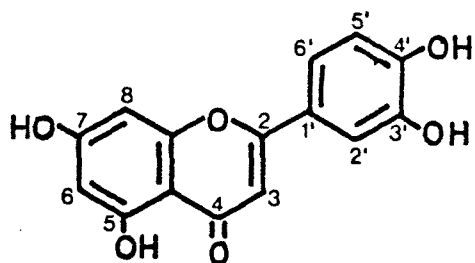
FIGURA IV-78: Espectros UV-visible de la sustancia V.



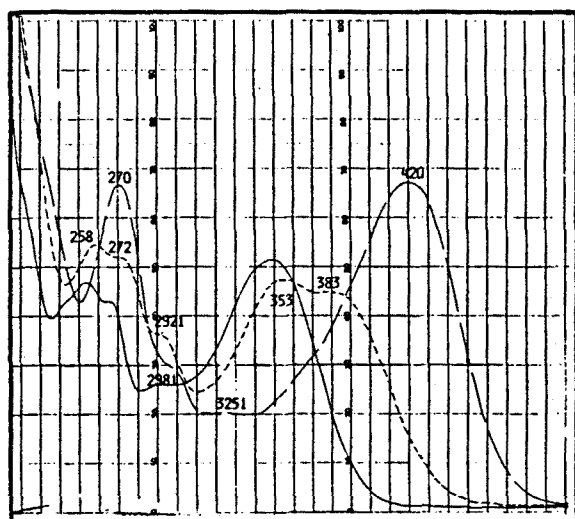
Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	255	266	280i	345
NaOMe:	272	408		
AlCl ₃ :	270	417		
AlCl ₃ + HCl:	258	353	383	
NaOAc:	270	420		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	270	375	420i	

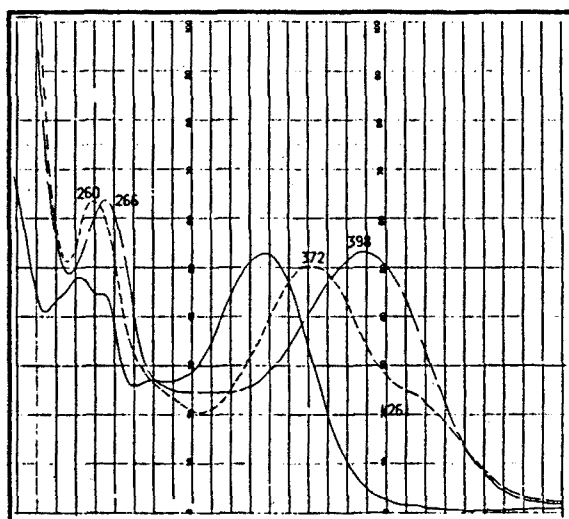
FIGURA IV-79: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia V.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - - - - AlCl₃, + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
 - - - - NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	265	288	347	
NaOMe:	270	404			
AlCl ₃ :	270	298i	325i	420	
AlCl ₃ , + HCl:	258	272	292i	353	383
NaOAc:	266	398			
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	260	372	426i		

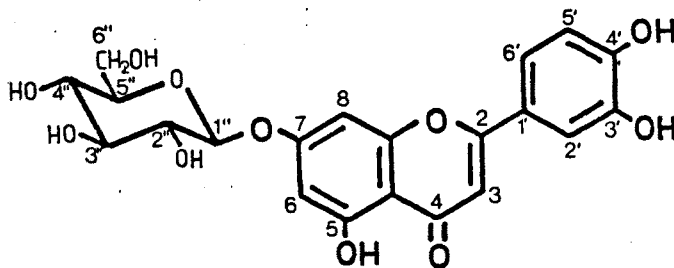
W) Estructura de la sustancia W.

El compuesto W se ha aislado, también, del extracto "acetato de etilo + butanol".

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-8 (heterósido) y tabla IV-9 (aglicón).
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-83 (heterósido) y figura IV-84 (aglicón).
- Espectroscopía $^1\text{H-NMR}$: figura IV-80.
- Espectroscopía $^{13}\text{C-NMR}$: figura IV-81.
- Espectrometría FAB-MS: figura IV-82.

El análisis cromatográfico y espectroscópico de W y sus productos de hidrólisis permite concluir que su estructura es la de la 7-O-glucosil-luteolina.



Substancia W: 7-O-glucosil-luteolina.

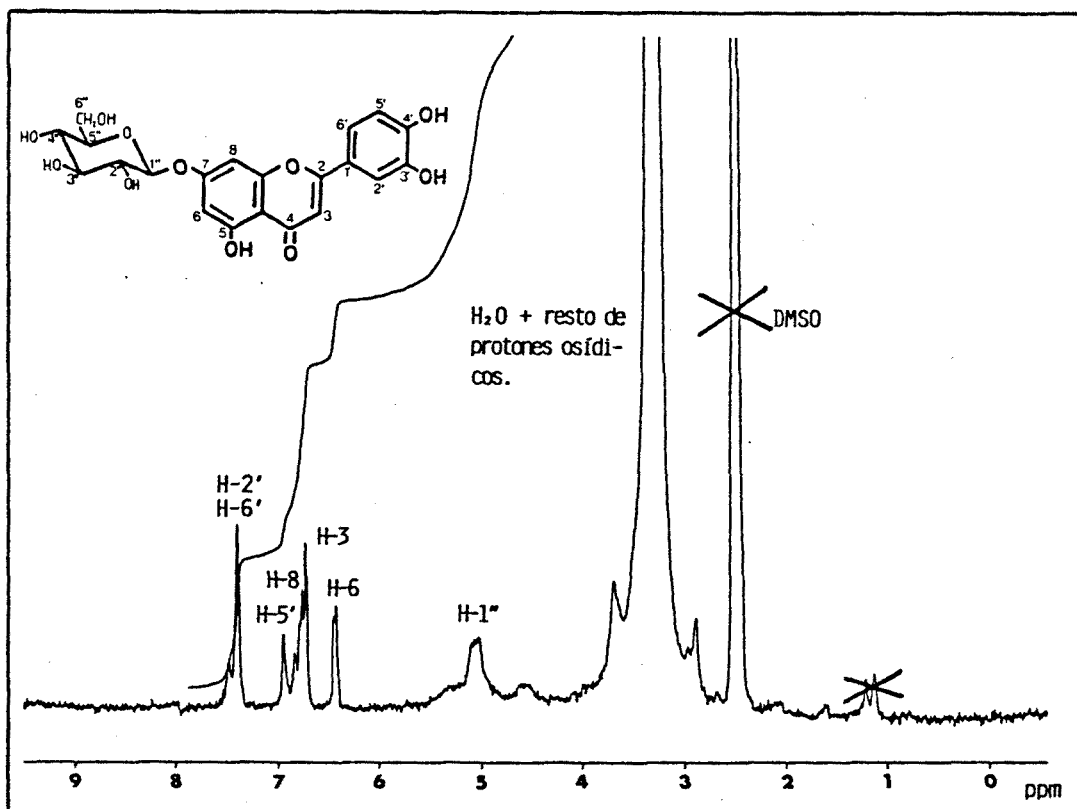


FIGURA IV-80: Espectro $^1\text{H-NMR}$ (80 MHz, d-DMSO) de la substancia W.

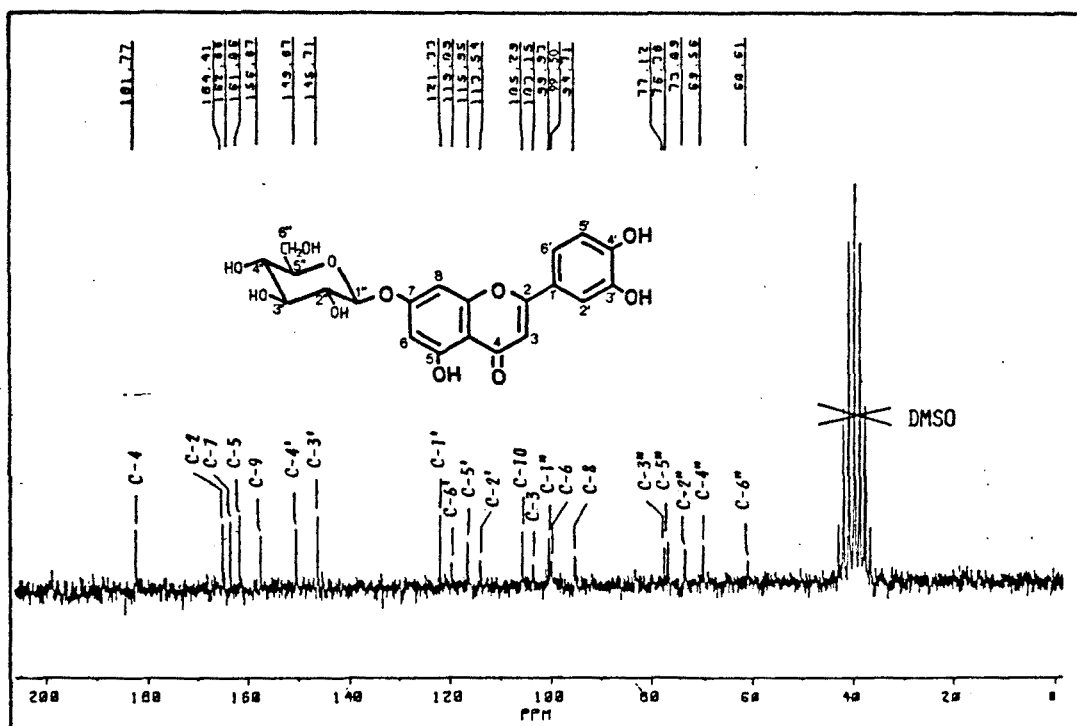


FIGURA IV-81: Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ (20,14 MHz, d-DMSO) de la substancia W.

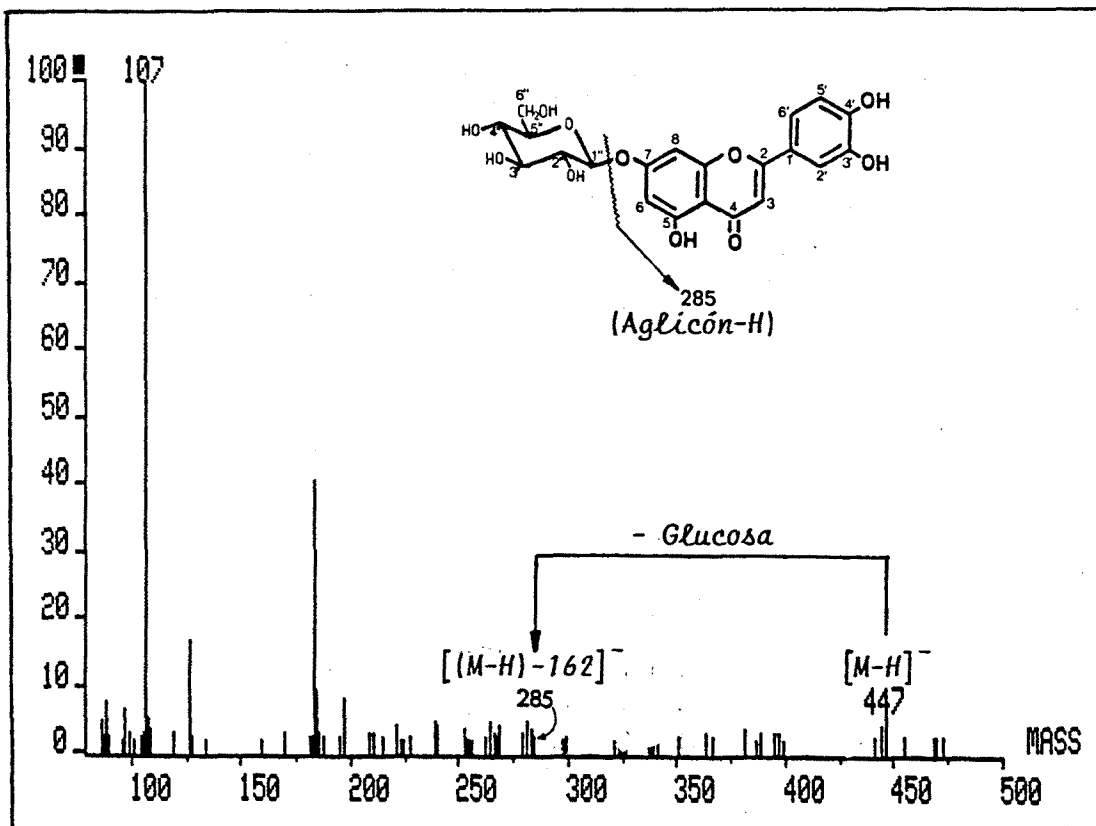
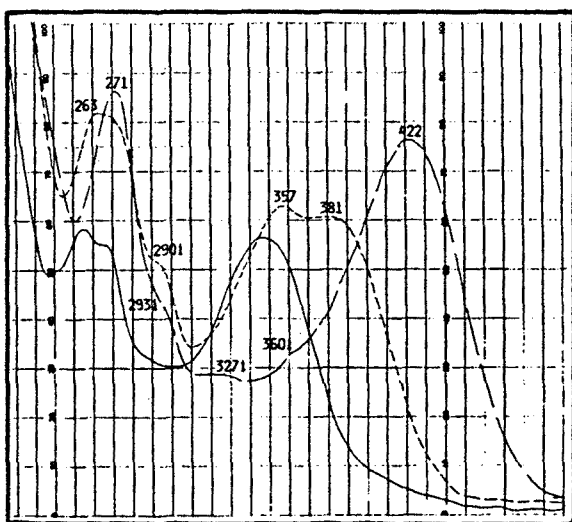
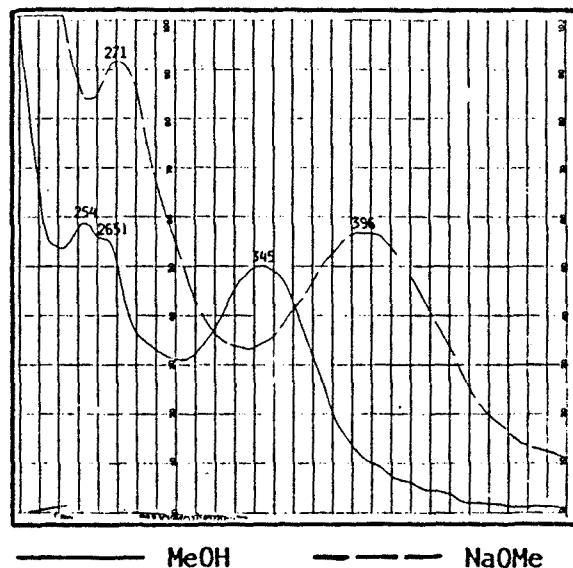
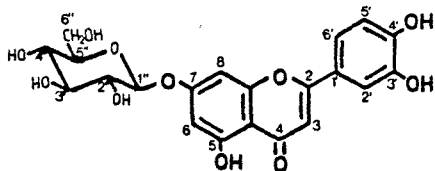
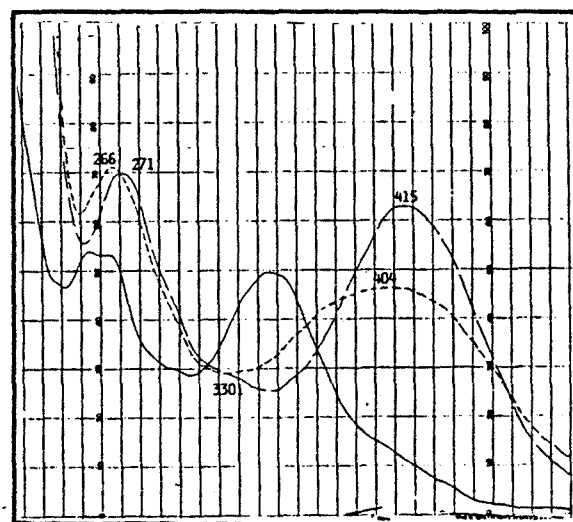


FIGURA IV-82: FAB-MS de iones negativos de la substancia W.

FIGURA IV-83: Espectros UV-visible de la sustancia W.



— MeOH - - - AlCl₃,
 - - - AlCl₃, + HCl

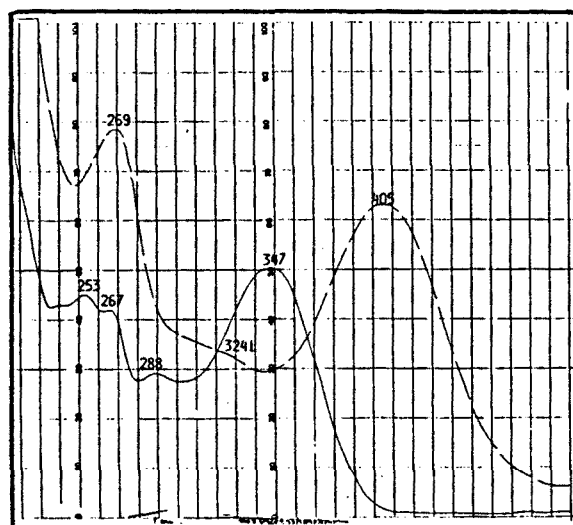
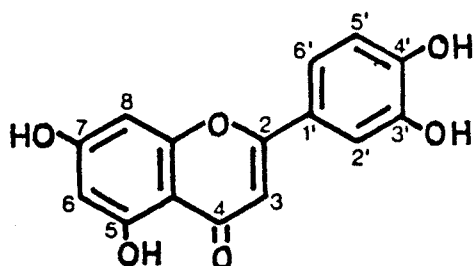


— MeOH - - - NaOAc
 - - - NaOAc + H₃BO₃

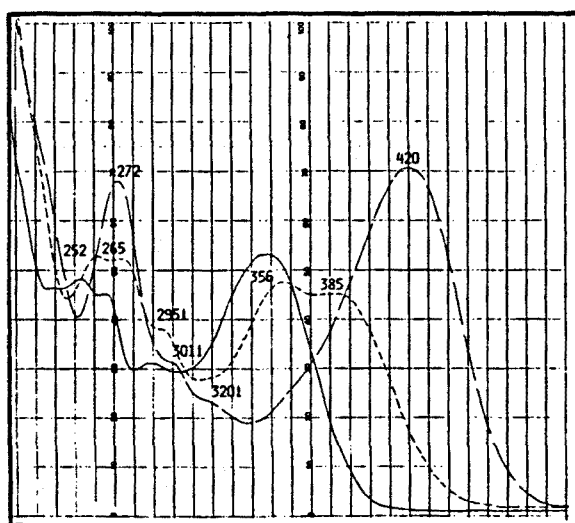
Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	254	265i	345		
NaOMe:	271	396			
AlCl ₃ :	271	293i	327i	360i	422
AlCl ₃ , + HCl:	263	290i	357	381	
NaOAc:	271	330i	415		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	266	404			

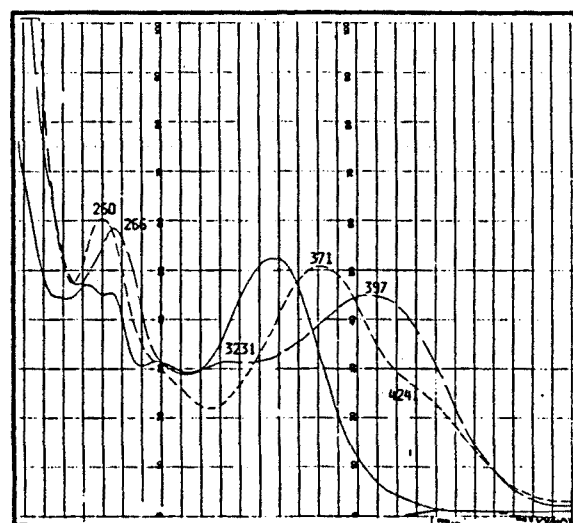
FIGURA IV-84: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia W.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - - - - AlCl₃ + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
 - - - - NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	267	288	347
NaOMe:	269	324i	405	
AlCl ₃ :	272	301i	320i	420
AlCl ₃ + HCl:	252	265	295i	356 385
NaOAc:	266	323i	397	
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	260	371	424i	

X) Estructura de la sustancia X.

La sustancia X ha sido aislada del extracto "acetato de etilo + butanol".

Datos analíticos:

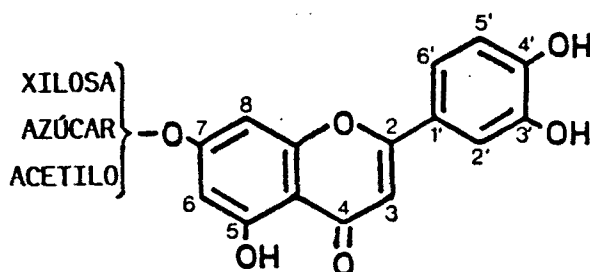
- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-8 (heterósido) y tabla IV-9 (aglicón).
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-87 (heterósido) y figura IV-88 (aglicón).
- Espectroscopía $^1\text{H-NMR}$: figura IV-85.
- Espectroscopía $^{13}\text{C-NMR}$: figura IV-86.

El aglicón liberado por hidrólisis de X es la luteolina, identificada por sus características cromatográficas y espectroscópicas UV-visible.

El estudio de X por espectroscopía UV-visible indica la presencia de una cadena osídica unida al hidroxilo de la posición 7.

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ revela la existencia de dos azúcares (H-1" y H-1"' a 5,1 y 5,3 ppm) y un grupo acetilo ($\text{CH}_3\text{CO-}$ a 1,8 ppm) en la molécula del heterósido.

Este hecho queda confirmado por el espectro $^{13}\text{C-NMR}$ en el que se observan, por un lado, las señales debidas a los dos C del grupo acetilo (169,90 y 20,24 ppm) y, por otro, las correspondientes a los azúcares, de los cuales sólo ha podido ser identificado uno, como xilosa.



Substancia X: Diglicósido acetilado de luteolina.

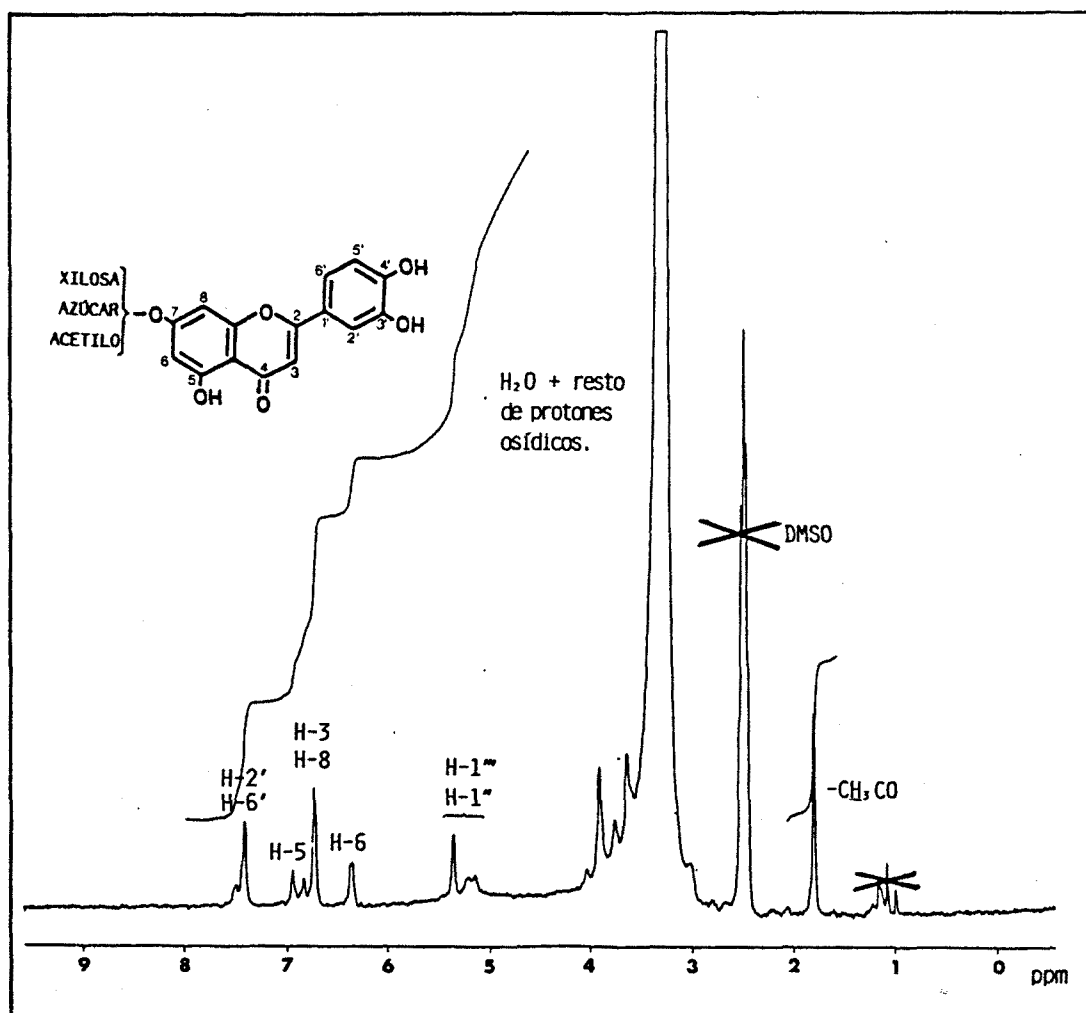


FIGURA IV-85: Espectro ¹H-NMR (80 MHz, d-DMSO) de la sustancia X.

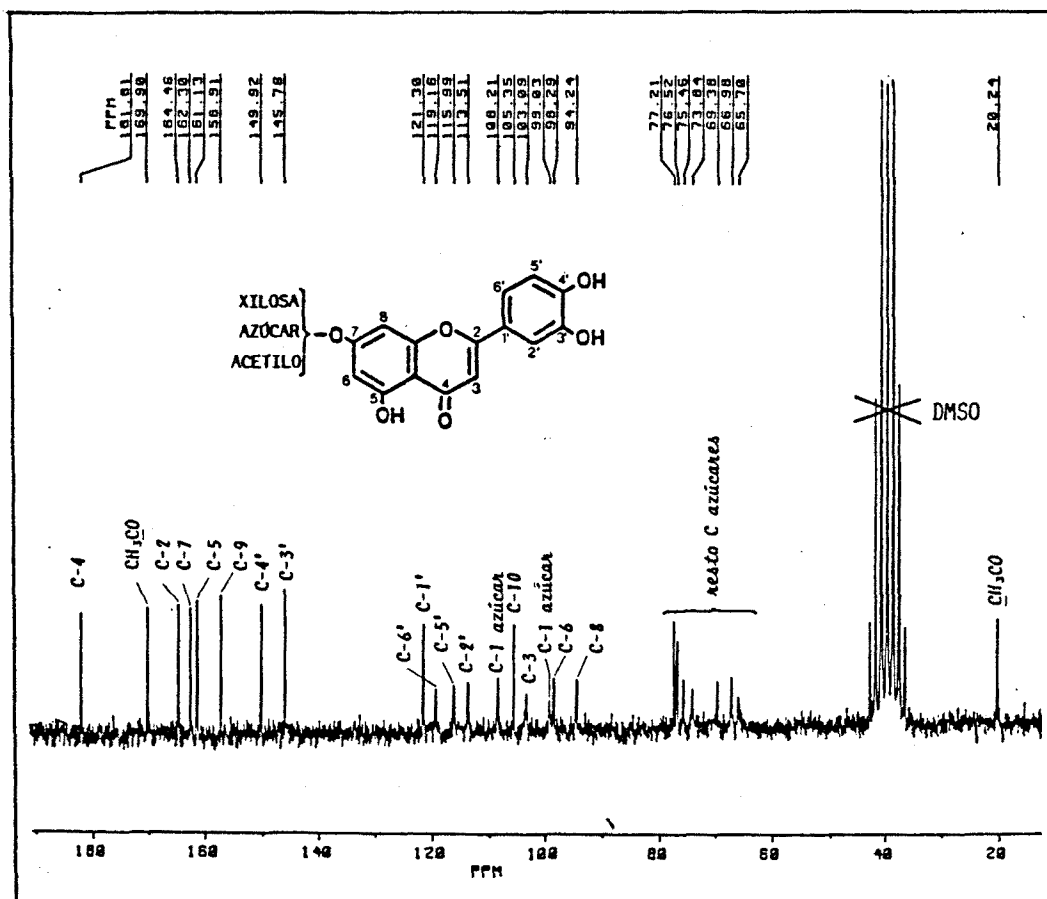
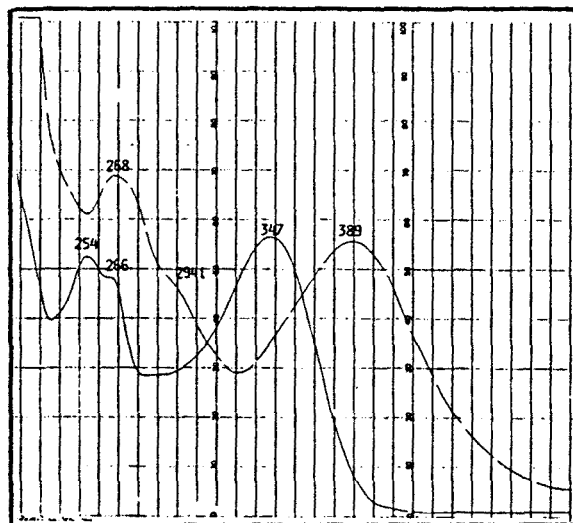
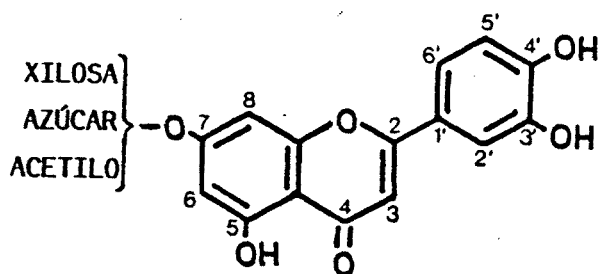
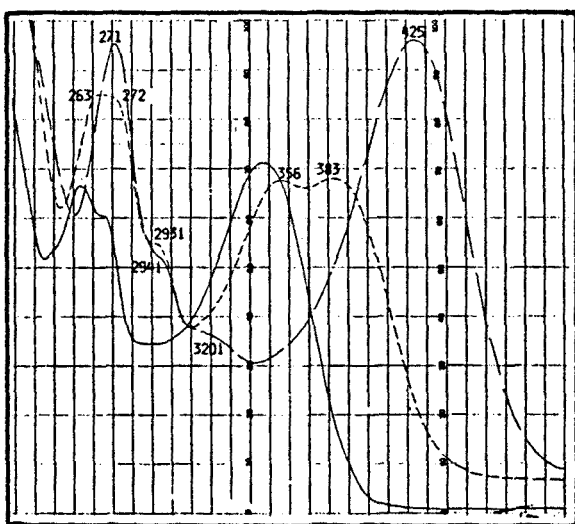


FIGURA IV-86: Espectro ^{13}C -NMR (20,14 MHz, d-DMSO) de la sustancia X.

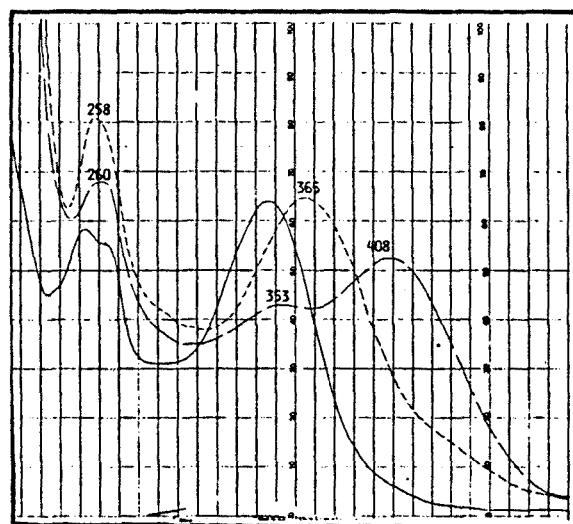
FIGURA IV-87: Espectros UV-visible de la sustancia X.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
- . . . AlCl₃, + HCl

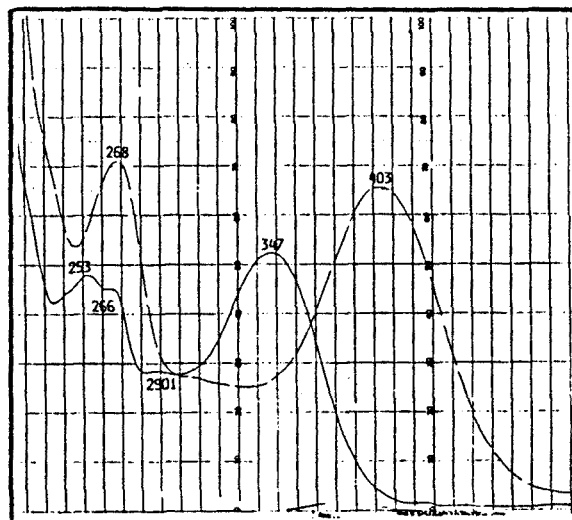
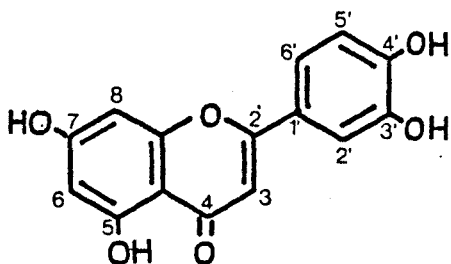


———— MeOH - - - - NaOAc
- - - - NaOAc + H₃BO₃

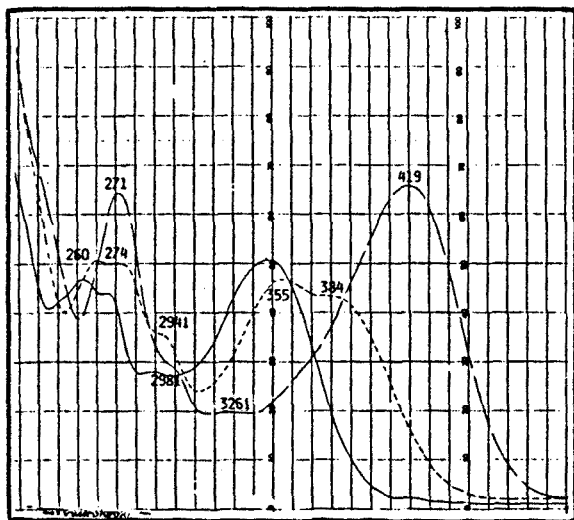
Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	254	266	347		
NaOMe:	268	294i	389		
AlCl ₃ ,:	271	294i	320i	425	
AlCl ₃ , + HCl:	263	272	293i	356	383
NaOAc:	260	353	408		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	258	365			

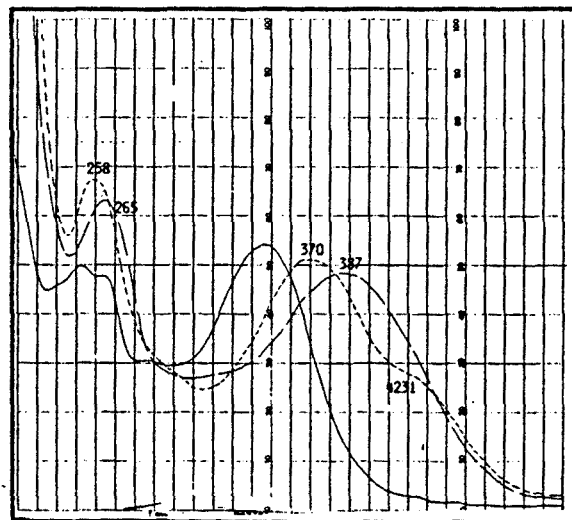
FIGURA IV-88: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia X.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 ····· AlCl₃, + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
 - - - - NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	266	290i	347
NaOMe:	268	403		
AlCl ₃ :	271	298i	326i	419
AlCl ₃ , + HCl:	260	274	294i	355 384
NaOAc:	265	387		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	258	370	423i	

Y) Estructura de la sustancia Y.

La sustancia Y ha sido aislada del extracto "acetato de etilo + butanol".

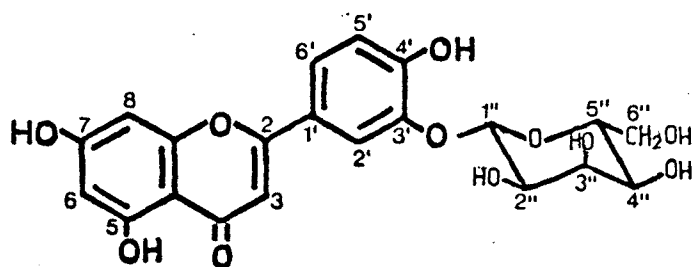
Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-8 (heterósido) y tabla IV-9 (aglicón).
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-89 (heterósido) y figura IV-90 (aglicón).

La hidrólisis de Y proporciona luteolina, identificada por sus características cromatográficas y por espectroscopía UV-visible, y un azúcar cuyo análisis por cromatografía en capa fina permite afirmar que se trata de la allosa.

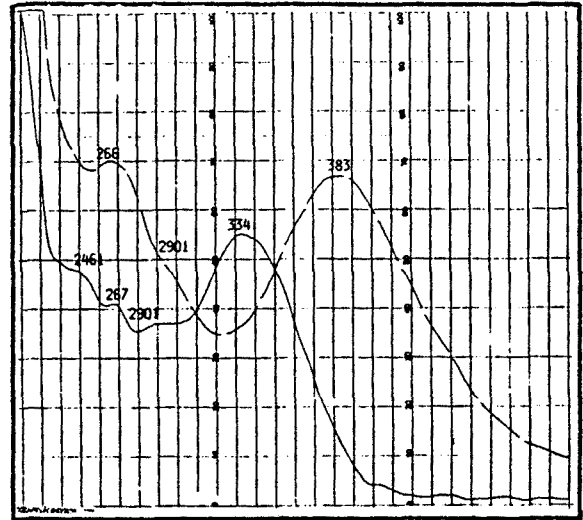
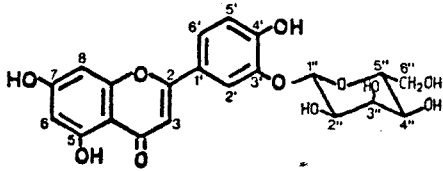
El estudio de Y por espectroscopía UV-visible indica que corresponde a una estructura tipo luteolina substituida en la posición 3' ($\Delta\lambda I$ en NaOMe respecto a MeOH de 49 nm, y ausencia de $\Delta\lambda I$ en NaOAc+H₂BO₃ respecto a MeOH).

La sustancia Y es, por tanto, la 3'-O-allosil-luteolina.

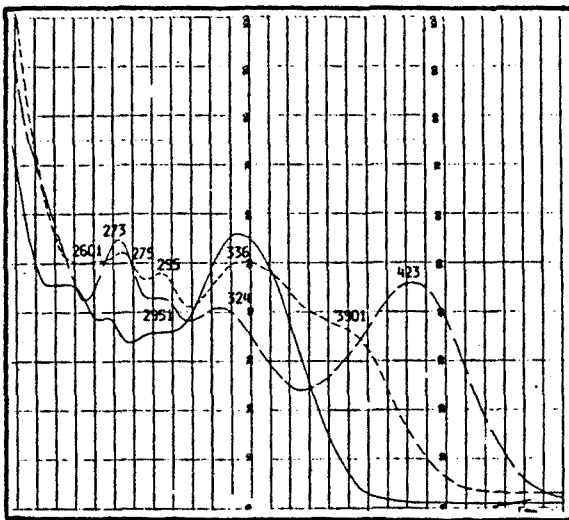


Substancia Y: 3'-O-allosil-luteolina.

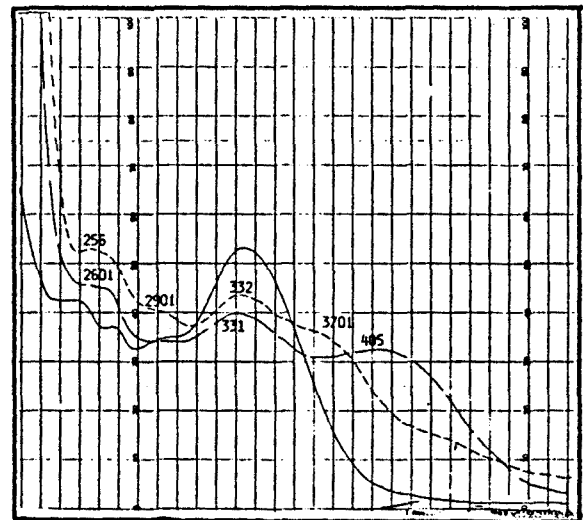
FIGURA IV-89: Espectros UV-visible de la sustancia Y.



———— MeOH - - - - NaOMe



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - . . . AlCl₃ + HCl

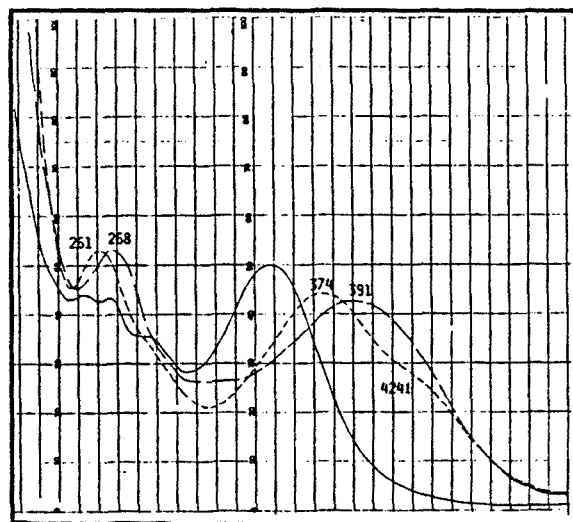
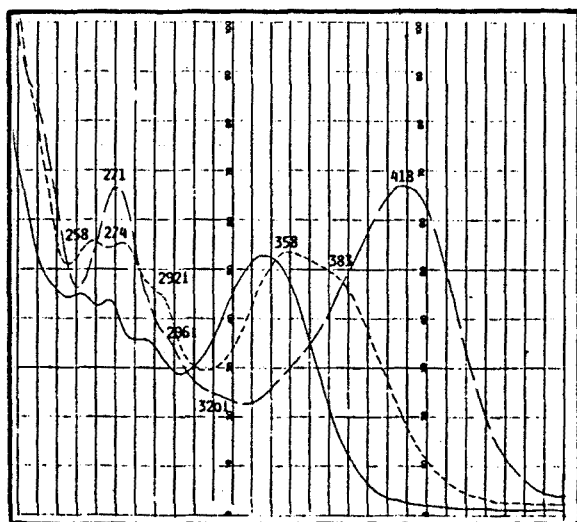
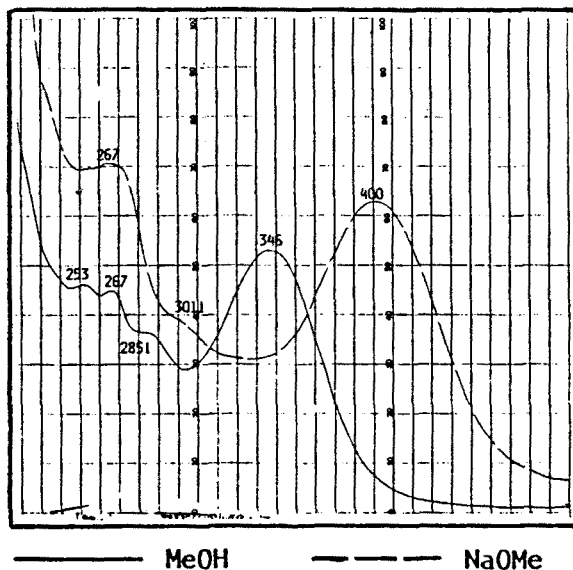
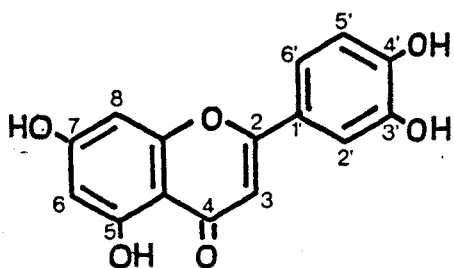


———— MeOH - - - - NaOAc
 - . . . NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	246i	267	290i	334
NaOMe:	266	290i	383	
AlCl ₃ :	273	295i	324	423
AlCl ₃ + HCl:	260i	275	295	336 390i
NaOAc:	260i	331	405	
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	256	290i	332	370i

FIGURA IV-90: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia Y.



—— MeOH - - - AlCl₃
 - · - · AlCl₃ + HCl

—— MeOH - - - NaOAc
 - · - · NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	267	285i	346
NaOMe:	267	301i	400	
AlCl ₃ :	271	296i	320i	418
AlCl ₃ + HCl:	258	274	292i	358 383
NaOAc:	268	391		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	261	374	424i	

Z) Estructura de la sustancia Z.

La sustancia Z ha sido aislada del extracto "acetato de etilo + butanol".

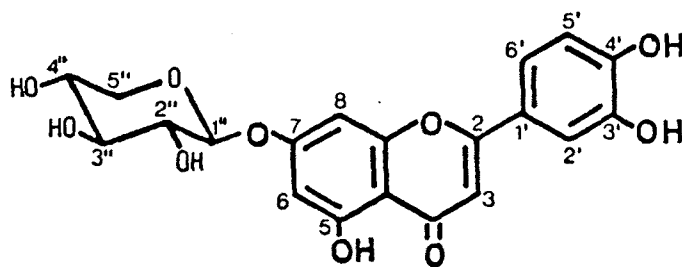
Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-8 (heterósido) y tabla IV-9 (aglicón).
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-92 (heterósido) y figura IV-93 (aglicón).
- Espectroscopía $^1\text{H-NMR}$: figura IV-91.

El análisis cromatográfico y espectroscópico de los productos de hidrólisis de Z indica que se trata de una xilosil-luteolina.

El espectro UV-visible de Z muestra una estructura tipo luteolina substituida en la posición 7 (ausencia de $\Delta\lambda_{II}$ en NaOAc respecto a MeOH), hecho que corrobora el espectro $^1\text{H-NMR}$.

La sustancia Z resulta ser, por tanto, la 7-O-xilosil-luteolina.



Substancia Z: 7-O-xilosil-luteolina.

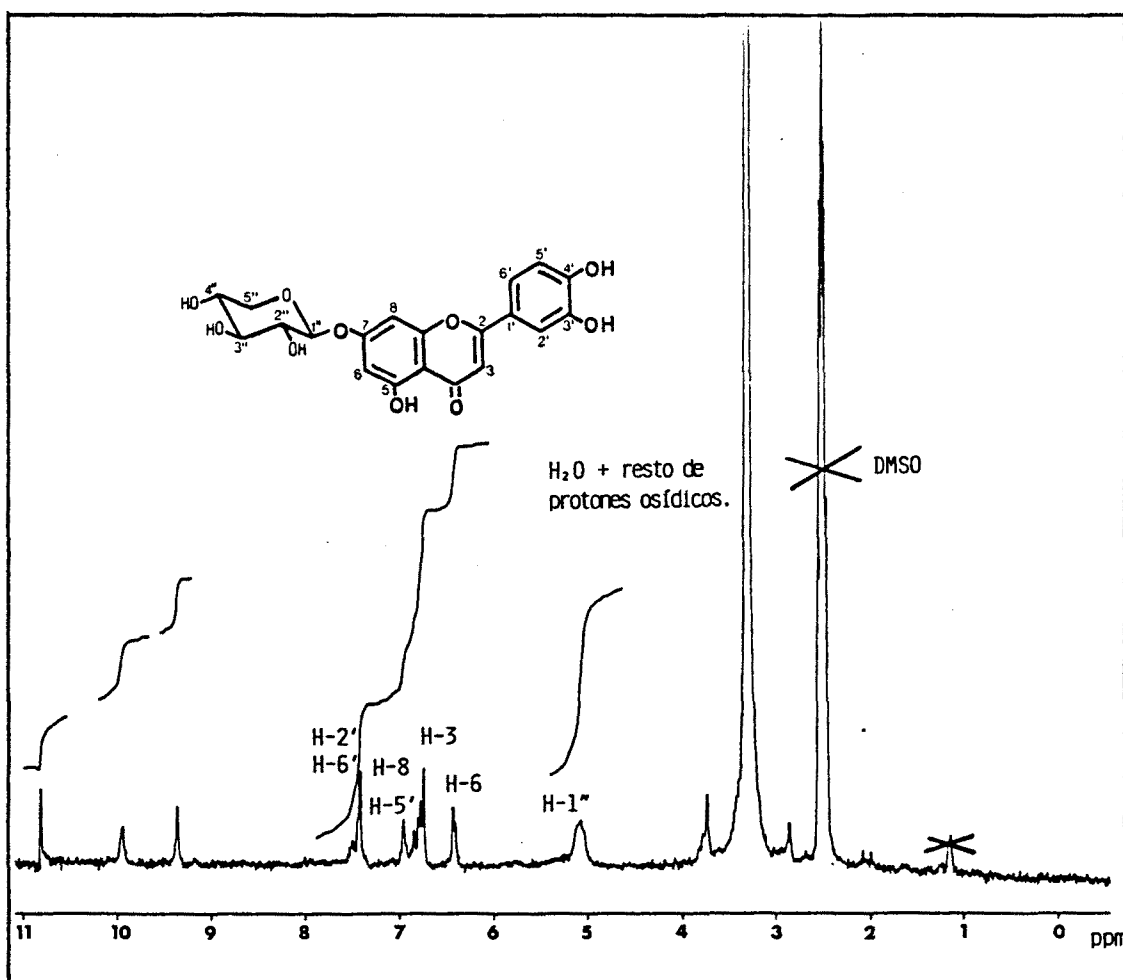
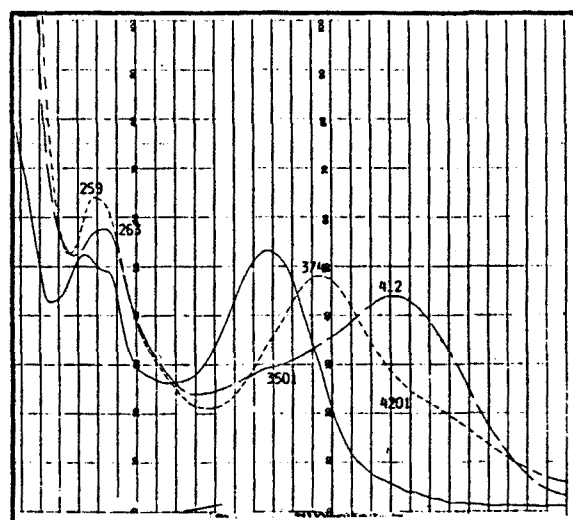
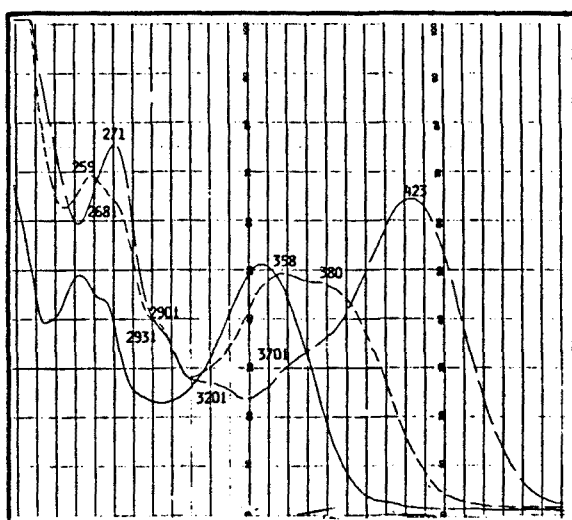
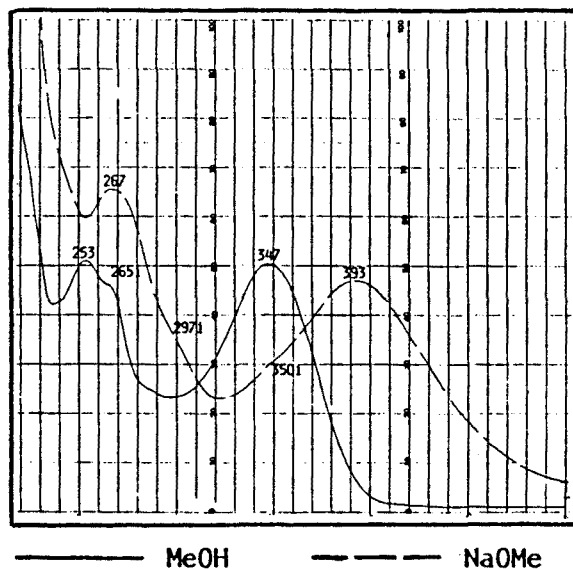
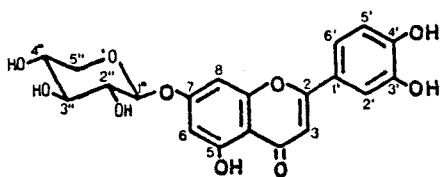


FIGURA IV-91: Espectro $^1\text{H-NMR}$ (80 MHz, $d\text{-DMSO}$) de la sustancia Z.

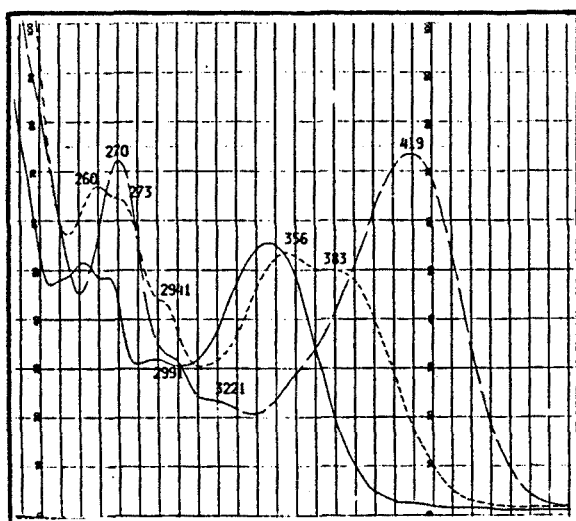
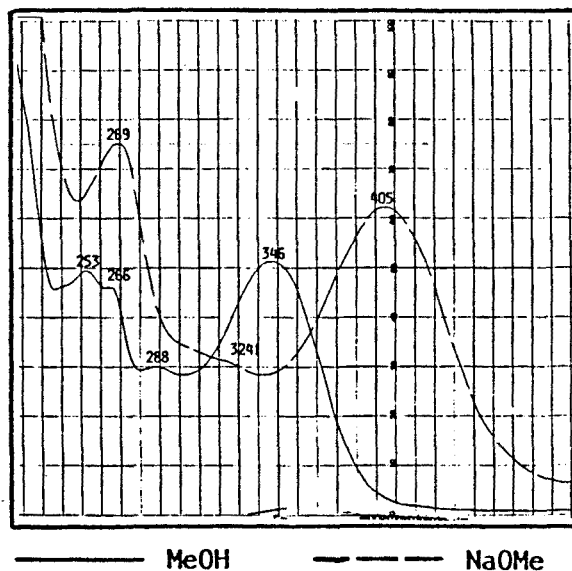
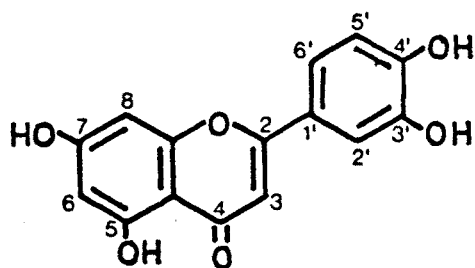
FIGURA IV-92: Espectros UV-visible de la sustancia Z.



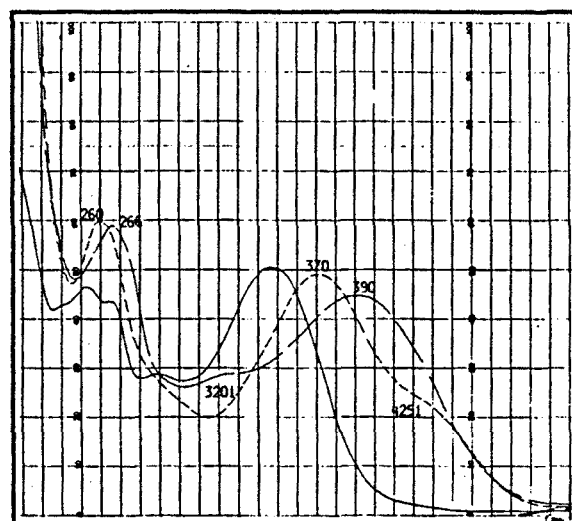
Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	265i	347		
NaOMe:	267	297i	350i	393	
AlCl ₃ :	271	293i	320i	370i	423
AlCl ₃ + HCl:	259	268i	290i	358	380
NaOAc:	263	350i	412		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	259	374	420i		

FIGURA IV-93: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia Z.



———— MeOH - - - - AlCl₃,
 - · - · AlCl₃ + HCl



———— MeOH - - - - NaOAc
 - · - · NaOAc + H₃BO₃

Datos espectrales: λ en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	266	288	346	
NaOMe:	269	324i	405		
AlCl ₃ ,:	270	299i	322i	419	
AlCl ₃ + HCl:	260	273	294i	356	383
NaOAc:	266	320i	390		
NaOAc + H ₃ BO ₃ :	260	370	425i		

IV.3.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE ESPECIES DE THYMUS L.

IV.3.1.- INTRODUCCIÓN.

En el presente capítulo se realiza un análisis comparativo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y diversos sistemas de cromatografía en capa fina (TLC) de la composición de aglicones flavónicos de diversos táxones del género *Thymus*.

Los extractos de las hojas, una vez purificados, se analizan cromatográficamente frente a sustancias patrón cuya estructura y procedencia se resumen en la tabla IV-10. No se han podido incluir entre ellas la pilloína, sorbifolina, 7-O-Me-luteolina, 6-OH-luteolina y timusina (sustancias aisladas de *Thymus moroderi*) debido, ya sea a la pequeña cantidad en que han sido aisladas, ya a la degradación sufrida durante el proceso de determinación de su estructura.

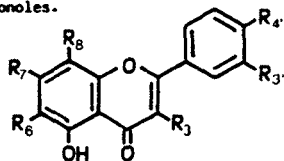
Se ha podido disponer, en cambio, de ácido rosmarínico y ácido caféico patrones que, por encontrarse ampliamente repartidos entre la familia Labiatae, se han incluido también en el estudio comparativo.

IV.3.2.- OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Los extractos han sido obtenidos a partir de 10 g de hojas desecadas, según la pauta de la figura IV-94 [CAÑIGUERAL, 1986]. Fundamentalmente, consiste en efectuar una extracción hidrometanólica, eliminar el MeOH y fraccionar la solución acuosa restante con éter de petróleo y éter etílico.

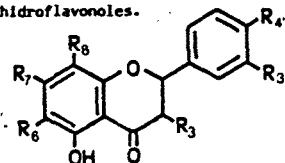
El éter de petróleo extrae los aglicones flavónicos más apolares, sobre todo 8-OMe-cirsilineol, 5-desmetilnobiletina, salvigenina y 5-(OH)-7,4'-(OMe)₂-flavona.

A) Flavonas y flavonoles.



	R ₃	R ₆	R ₇	R ₈	R _{3'}	R _{4'}	Nombre trivial	Procedencia
1	-H	-H	-OH	-H	-OH	-OH	luteolina	1
2	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	kempferol	1
3	-H	-H	-OH	-H	-H	-OH	apigenina	1
4	-H	-H	-OH	-H	-OCH ₃	-OH	crisoeriol	2
5	-H	-H	-OH	-H	-H	-OCH ₃	diosmetina	3
6	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-OH	sideritoflavona	1
7	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OH	cirsimaritina	4
8	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OH	5,4'-(OH) ₂ -7,8-(OMe) ₂ -flavona	1
9	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OH	cirsilineol	1
10	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OH	xantomicrol	1
11	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	8-Ome-cirsilineol	1
12	-H	-H	-OH	-H	-H	-OCH ₃	acacetina	3
13	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH	genkwanina	1
14	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	5-desmetilnobiletina	1
15	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	salvigenina	4
16	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	4'-O-metilgenkwanina	5

B) Flavanonas y dihidroflavonoles.



17	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-OH	taxifolina	1
18	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	dihidro-kempferol	1
19	-H	-H	-OH	-H	-OH	-OH	eriodictiol	1
20	-H	-H	-OH	-H	-H	-OH	naringenina	1
21	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OH	5,4'-(OH) ₂ -6,7,8-(OMe) ₃ -flavanona	1
22	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH	sakuranetina	1

C) Ácidos fenólicos.

23		ác. caféico	6
24		ác. rosmarínico	4

TABLA IV-10: Estructura y procedencia de las sustancias utilizadas en el estudio comparativo de especies de *Thymus*. 1: Aislado de la muestra R⁹³ (*Thymus moroderi*). 2: Dr. Wagner (Munich). 3: Sarsyntex. 4: Aislado de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* [CAÑIGUERAL, 1986]. 5: Aislado de *Salvia verbenaca* [CAÑIGUERAL, 1982]. 6: Fluka.

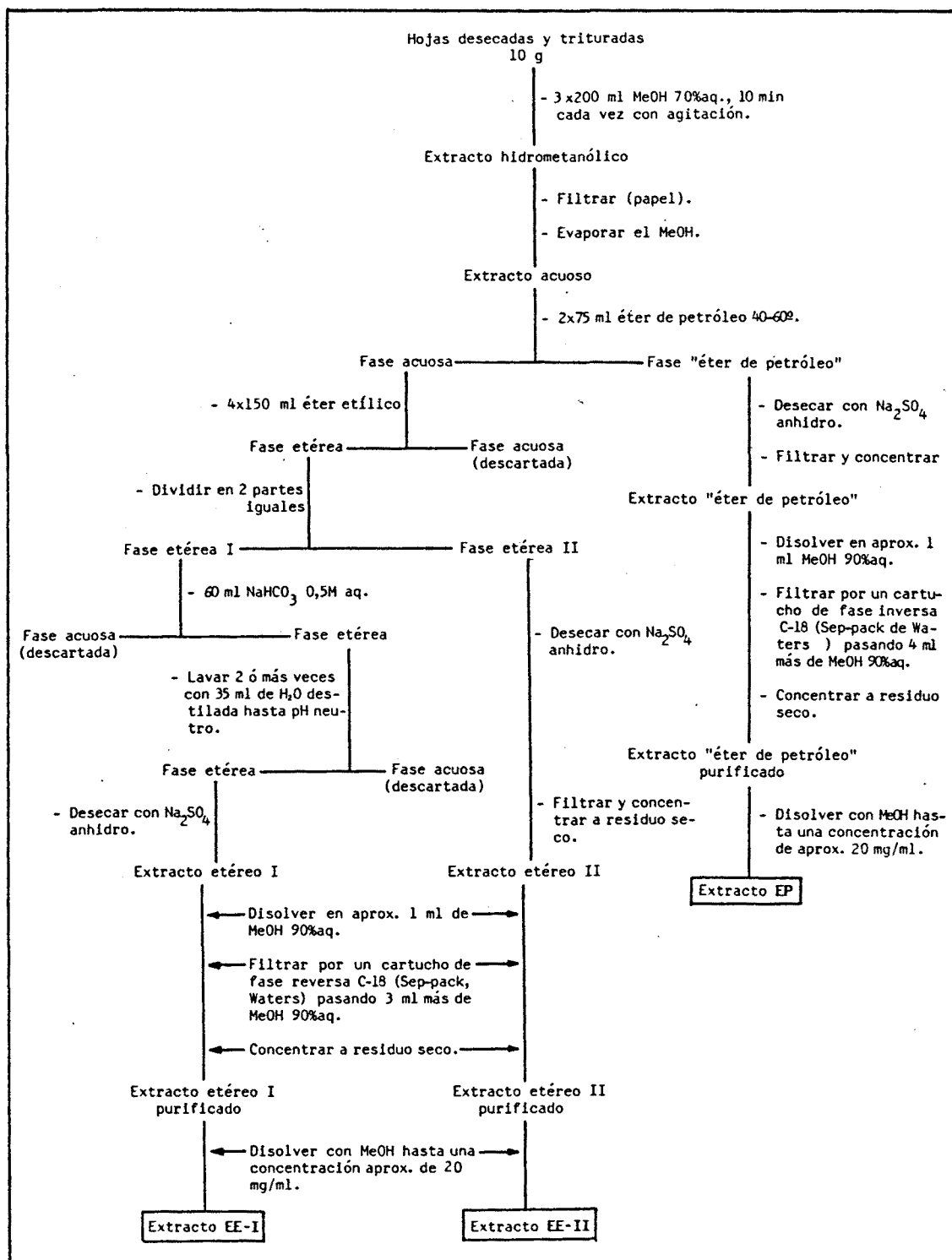


FIGURA IV-94: Obtención y purificación de extractos para el análisis comparativo de tomillos.

El extracto etéreo, a su vez, se divide en dos partes alícuotas, una de las cuales se trata con bicarbonato sódico que ioniza las sustancias ácidas (por ejemplo, ácidos fenoles) que podrían interferir en los análisis por TLC y permite eliminarlas de la fase etérea. Además, en los análisis por HPLC, la disminución de intensidad o eliminación de un pico en el cromatograma del extracto tratado con NaHCO_3 , respecto al del no tratado, revela el carácter ácido del mismo, siendo de gran utilidad para la interpretación de los análisis.

Tanto el extracto "éter de petróleo" (extracto EP) como los extractos etéreos (extracto EE-I y EE-II), se purifican por filtración a través de un cartucho de fase inversa C-18, que retiene gran parte de clorofilas y sustancias apolares que dificultarían el análisis.

IV.3.3.- ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS.

Los extractos se han analizado por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución.

Los sistemas empleados en cromatografía en capa fina han sido los siguientes:

CL-2 = TLC Celulosa/AcOH 30% aq.

CL-3 = TLC Celulosa/AcOH 15% aq.

S-2 = TLC Silicagel/ CH_2Cl_2 :AcOH: H_2O (2:1:1) fase inferior

S-3 = TLC Silicagel/ CHCl_3 :MeOH (93:7)

El sistema CL-3 resulta especialmente útil para la detección de flavanonas y dihidroflavonoles, ya que en este sistema las flavononas y flavonoles apenas se desplazan (R_f s aproximadamente iguales a cero).

De cada extracto (EP, EE-I y EE-II) se han realizado tres siembras contiguas con distintos volúmenes (10 a 100 μl , aproximadamente). Paralelamente a los extractos, se han sembrado en cada

placa las sustancias patrón. Una vez eluidas, las placas se han observado a la luz UV de 366 nm, antes y después de revelar con NH₃ y AlCl₃ 6 H₂O al 6% en MeOH. En la tabla IV-11 se muestran las características cromatográficas (Rfs y revelado) de los compuestos utilizados.

	REVELADO			Rf x 100 TLC				HPLC
	UV366nm	NH ₃ , UV 366nm	AlCl ₃ , UV 366nm	CL-2	CL-3	S-2	S-3	tr(min)
1 luteolina	VO	A	A	18	-	11	12	15,84
2 kempferol	A	A	AB	20	-	28	22	19,30
3 apigenina	VO	AO	A	28	-	24	26	20,41
4 crisoeriol	VO	AO	A	22	-	47	32	20,80
5 diosmetina	VO	VO	A	24	-	46	37	21,30
6 sideritoflavona	VO	VO	VO	37	-	38	24	22,10
7 cirsimaritina	VO	VO	VO	47	-	63	42	22,87
8 5,4'-(OH) ₂ -7,8-(OMe) ₂ - flavona	VO	VO	NG	46	-	63	42	22,87
9 cirsilineol	VO	MO	NG	42	-	89	56	23,78
10 xantomicrol	VO	VO	NG	49	-	67	47	24,17
11 8-MeO-cirsilineol	VO	MO	NG	44	-	92	57	24,60
12 acacetina	VO	VO	A	29	-	70	50	25,21
13 genkwanina	VO	A	A	29	-	70	46	25,28
14 5-desmetilnobiletina	VO	VO	VO	49	-	90	74	26,57
15 salvigenina	VO	VO	VO	44	-	91	71	26,85
16 4'-O-metilgenkwanina	VO	VO	A	23	-	96	72	28,73
17 taxifolina	PO	AO	A	71	50	5	7	3,15
18 dihidrokempferol	PO	AO	A	74	52	19	18	5,00
19 eriodictiol	PO	VO	ACF	61	28	14	10	7,86
20 naringenina	PO	VO	ACF	66	30	36	30	12,66
21 5,4'-(OH) ₂ -6,7,8-(OMe) ₃ - flavanona	PO	PO	VO	85	53	80	51	19,14
22 sakuranetina	PO	ACF	ACF	60	21	84	51	21,96
23 ácido caféico	AF	ACF	AF	66	42	34	5	2,30
24 ácido rosmarínico	AF	ACF	ALF	76	46	0	0	6,27

TABLA IV-11: Características cromatográficas de las sustancias patrón. A: Amarillo. AB: Amarillo brillante. ACF: Amarillo claro fluorescente. ALF: Azul-lila fluorescente. AO: Amarillo oscuro. MO: Marrón oscuro. NG: Negro. PO: Pardo oscuro. VO: violáceo oscuro. Para los sistemas de TLC y condiciones de HPLC, ver texto.

Las condiciones de lso análisis realizados por HPLC han sido las siguientes:

- Columna: 250 x 4,6 mm, rellena de Spherisorb ODS-2 (fase inversa tipo C-18) de 5 μ m.

- Eluyente: Bomba A: MeOH
Bomba B: AcOH 5% en H₂O

- Elución: Temperatura: 40°C.

Flujo: 2,4 ml/min.

Presión de trabajo: entre 3.700 psi (inicial) y 1.700 psi (final).

t = 0-8 min 30%A, isocrática.

t = 8-9 min, gradiente de 9%A/min.

t = 9-15 min, isocrática (39%A).

t = 15-16 min, gradiente de 9%A/min.

t = 16-17 min, isocrática (48%A).

t = 17-17,5 min, gradiente de 9%A/min.

t = 17,5-19 min, isocrática (52,5%A).

t = 19-19,5 min, gradiente de 9%A/min.

t = 19,5-20,5 min, isocrática (57%A).

t = 20,5-21,5 min, gradiente de 9%A/min.

t = 21,5-23 min, isocrática (66%A).

t = 23-24 min, gradiente de 9%A/min.

t = 24-25 min, isocrática (75%A).

t = 25 min, gradiente de 9%A/min hasta llegar a 99%A (aproximadamente, a los 27,6 min), momento en el que se mantiene la elución isocrática hasta el final del cromatograma.

Duración: 32 min.

- Detección: 286 nm y 340 nm (extracto EE-I) y 340 nm (extractos EE-II y EP).

- Volumen inyectado: 6 μ l (extracto EP) y 3-4 μ l (extractos EE-I y EE-II). Las muestras han sido previamente filtradas a través de filtros Millipore de 0,45 μ m de diámetro de poro.

Los tiempos de retención (tr) de las sustancias patrón en las condiciones analíticas descritas se indican en la tabla IV-11. En la figura IV-95 se muestran los cromatogramas de las sustancias patrón a 340 y 286 nm y la composición del eluyente durante el análisis.

Las flavanonas y dihidroflavonoles apenas absorben a 340 nm, por lo que su detección a esta longitud de onda resulta difícil. En cambio, presentan una absorción intensa a longitudes de onda comprendidas entre 270 y 295 nm, razón por la cual los extractos EE-I se han analizado dos veces: la primera efectuando la detección a 340 nm y la segunda a 286 nm. De este modo, en los cromatogramas obtenidos a 286 nm los picos correspondientes a flavanonas y dihidroflavonoles aumentan notablemente de intensidad respecto a los realizados a 340 nm, pudiendo distinguirse fácilmente del resto de flavonoides.

En la figura IV-96 se muestran los cromatogramas correspondientes a los tres extractos analizados de *Thymus aestivus* en los que se observa la desaparición casi total de los ácidos caféico y rosmarínico en el extracto EE-I (tratado con NaHCO₃) respecto al extracto EE-II, y el aumento de intensidad de los picos correspondientes a flavanonas y dihidroflavonoles en el cromatograma del extracto EE-I a 286 nm respecto al obtenido a 340 nm.

IV.3.4.- RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en los análisis de los táxones relacionados en la tabla III-1 (ver capítulo III) se resumen en la tabla IV-12.

La abundancia de cada sustancia en los táxones investigados, considerada según el área del pico correspondiente en el análisis por HPLC y según la intensidad de la fluorescencia de la mancha observada por TLC, se indica con un número de cruces comprendido entre 1 y 5.

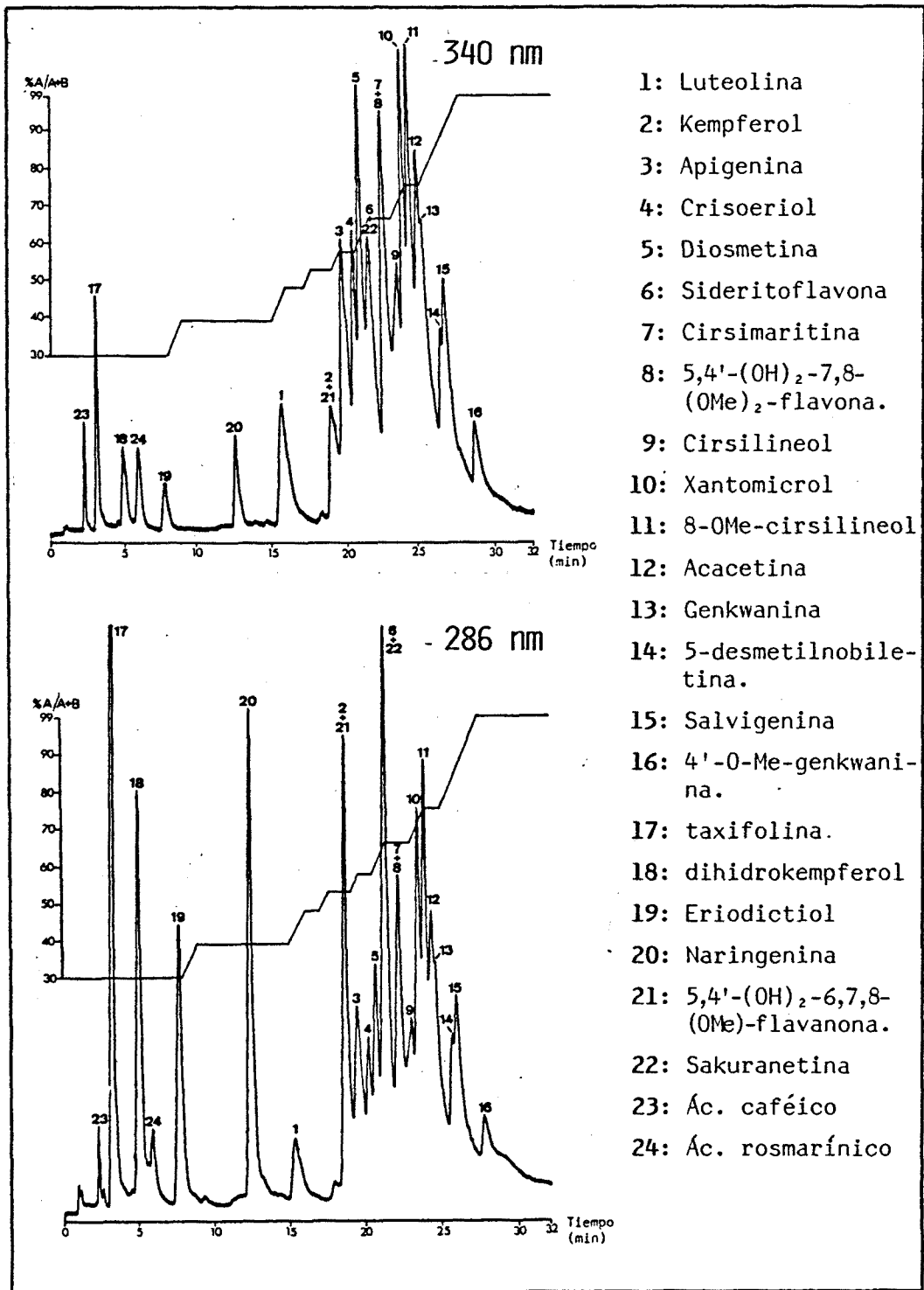


FIGURA IV-95: Cromatograma HPLC de las sustancias patrón y composición del eluyente durante el mismo. A: MeOH; B: AcOH 5% en H₂O.

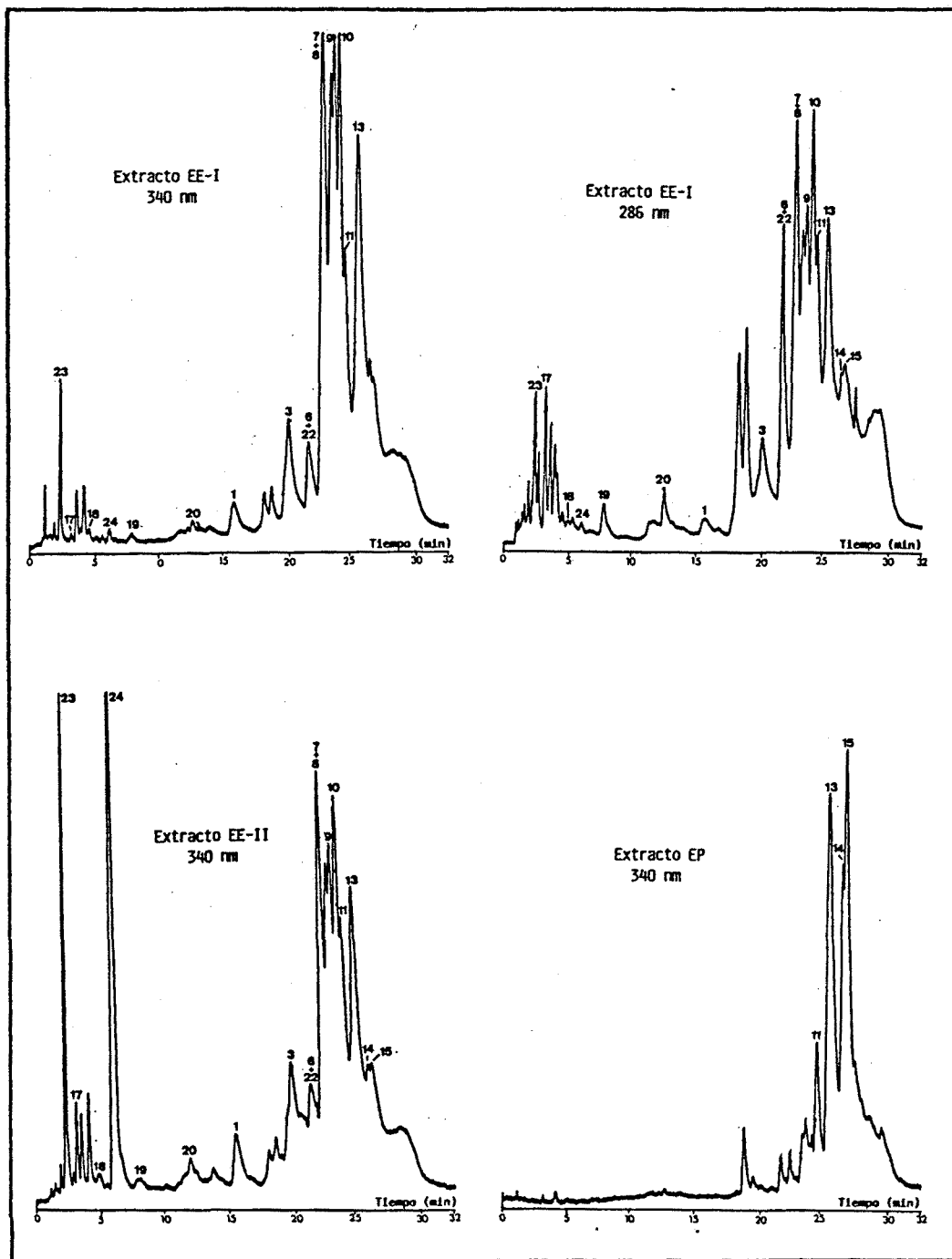


FIGURA IV-96: Cromatogramas HPLC de los extractos EE-I (340 y 286 nm), EE-II (340 nm) y EP (340 nm) de *Thymus aestivus* Reut. ex Willk.

	Lut	Kem	ApI	CriI	Dio	Sid	Csm	8MeOG	CsI	Xan	MCS	Aca	Gen	SON	Sal	MeC	Tax	DIK	Eri	Nar	DIK	Sak	Caf	Ros
Sección <i>Pseudothymus</i> Benthem																								
1	T. longiflorus	Bolss.	+	-	+++	-	-	++	+++	++	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	++	++++	++	+	+++	++++
2	T. noroderi Pau	ex Hartlnez	++	-	+++	-	-	++	+++	++	++++	+++	+++	+	+	+	+	+	++	+++	+	+	++	++
3	T. noroderi Pau	ex Hartlnez	++	-	+++	-	-	++	+++	++	++++	+++	+++	-	+	+	+	+	++	+++	+	+	++	+
4	T. membranaceus	Bolss.	+++	-	++++	-	-	++	+++	++	++++	+++	++++	+	+	+	+	+	++	+++	+	+	++	+++
6	T. funkii Coss.		+	-	+	-	-	+	+++	++	++++	+++	++	+	+	+	+	+	++	+++	+	+	+	-
Sección <i>Thymus</i> (Sect. <i>Vulgare</i> Velen., Sect. <i>Zygis</i> Willk.)																								
7	T. capitellatus	Hoffmanns & Link	++	-	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	+++	-	+++
8	T. camphoratus	Hoffmanns & Link	++	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	++++
9	T. vulgaris L.		+++	-	++	-	-	+	++++	++	++++	++	+++	-	+	+	+	+	++	+++	+	+	++++	+++
10	T. aestivus Reut.	ex Willk.	++	-	++	-	-	+	++++	+++	++	-	++++	+++	+	+	+	+	++	+	+	+	+++	++++
11	T. glandulosus Lag.	ex H. del Villar	++	-	++	-	-	+	++	++	++++	+++	+	-	-	-	-	-	++	+	+	+	+++	+++
12	T. baeticus Bolss.	ex Lacaita	+++	-	+++	-	-	+	+++	++	++++	++	+++	-	+	+	+	+	++	+	+	+	++	+++
13	T. orospedanus	H. del Villar	++	-	++	-	-	+	+++	+	++++	++	+++	-	+	+	+	+	++	+	+	+	+++	+
Sección <i>Serpillum</i> (Miller) Benthem																								
14	T. willkommii	Romliger	++	-	++	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	++	++	++	+++	+++	+++

TABLA IV-12: Resultados del estudio comparativo de la composición polifenólica de táxones del género *Thymus* L. Lut.: Luteolina. Kem.: Kempferol. Api.: Apigenina. Cri: Crisoeriol. Dio: Diosmetina. Sid.: Sideritoflavona. Csm.: Cirsimaritina. 8MeOG: 8-Ome-genkwanina. CsI.: Cirsilineol. Xan.: Xantomicrol. MCS.: 8-Ome-cirsilineol. Aca: Acacetina. Gen.: Genkwanina. 5DN: 5-desmetilnobilletina. Sal.: Salvingina. MeG: 4'-Ome-genkwanina. Tax.: Taxifolina. DIK.: Dihidro Kempferol. Eri.: eriodictiol. Nar.: Naringenina. DIK: Dihidroxantomicrol. Sak.: Sakuranetina. Caf.: Ac. caféico. Ros.: Ac. rosmarínico. -: no detectado; + a++++: detectado en cantidades de menor a mayor. (*): Ver texto.

El kempferol, aislado de las hojas de *Thymus moroderi* e incluido en el análisis comparativo, no ha podido ser detectado ni por TLC ni por HPLC (eluye al mismo tiempo que la 5,4'-(OH)₂-6,7,8-(OMe)₃ flavanona) en ninguno de los táxones estudiados, incluyendo *Thymus moroderi*.

La cirsimaritina y la 5,4'-(OH)₂-7,8-(OMe)₂-flavona (o 8-OMe-genkwanina) tienen los mismos R_f y t_r, por lo que en el screening cromatográfico no se han podido diferenciar.

Capítulo V

INVESTIGACION DE LOS ACEITES ESENCIALES

1. *Metodología experimental.*
2. *Estudio cualitativo y cuantitativo de los aceites esenciales de diversas especies de *Thymus* L.*

V.1.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

V.1.1.- INTRODUCCIÓN.

Los aceites esenciales, o esencias, son productos aromáticos volátiles que se encuentran en los vegetales. Están constituidos por mezclas de compuestos, más o menos numerosos, generalmente líquidos.

Se encuentran repartidos por todo el reino vegetal, tanto en plantas inferiores (algas rojas y marrones, algunos hongos y helechos, y hepáticas) como en plantas superiores (coníferas y angiospermas), siendo particularmente abundantes en determinadas familias como: **Rutaceae, Labiatae, Umbelliferae, Lauraceae, Myrtaceae, Compositae**, entre otras.

Todos los órganos del vegetal pueden contener aceites esenciales, pero se localizan sobre todo en las sumidades floridas. En una misma especie, la composición cualitativa y cuantitativa de la esencia puede variar según el órgano considerado, las condiciones ambientales en que se haya desarrollado y su dotación genética particular responsable de la existencia de razas químicas o quimiotipos.

Los aceites esenciales se encuentran, en general, en órganos secretores, ya sean pelos, glándulas secretoras de origen esquizógeno o esquizolisígeno, o bien canales secretores, que en la mayoría de los casos son también los principales puntos de biosíntesis [CROTEAU, 1986].

Los principales componentes de los aceites esenciales son de origen terpénico, y tienen importancia tanto en perfumería como en industria farmacéutica y alimentaria. Otros constituyentes minoritarios incluyen compuestos alifáticos y aromáticos, nitrogenados y azufrados (isotiocianatos y sulfuros) [HARBORNE & TURNER, 1984].

En la tabla V-1 se muestran los tipos de compuestos más importantes de los aceites esenciales indicando, también, el tipo de aroma que les confieren, los principales órganos del vegetal donde se localizan y su distribución entre las plantas superiores.

<u>TIPO DE COMPUESTO</u>	<u>OLOR</u>	<u>LOCALIZACIÓN EN EL VEGETAL</u>	<u>DISTRIBUCIÓN</u>
Monoterpenos y sesquiterpenos	En general, fragante; puede ser picante.	Especialmente hojas, también frutos, flores y raíces.	La mayoría de gimnospermas; muchas familias de angiospermas.
Alifáticos	Dulce y afrutado; puede ser desagradable.	Flores y frutos.	Extendidos, sobre todo en <i>Orchidaceae</i> y <i>Magnoliaceae</i> .
Arómaticos	Generalmente, agradable.	Flores y frutos; también hojas.	Extendidos, en particular en <i>Orchidaceae</i> y <i>Umbelliferae</i> .
Nitrogenados	Fétido, a pescado, fecal.	Flores; también hojas.	Restringidos; sobre todo en <i>Araceae</i> .
Isotiocianatos	Acre.	Todos los órganos.	Restringidos; especialmente en <i>Cruciferae</i> .
Sulfuros	Desagradable.	Bulbos, hojas.	Restringidos; particularmente, en <i>Alliaceae</i> .

TABLA V-1: Principales tipos de compuestos de los aceites esenciales en las plantas superiores [HARBORNE & TURNER, 1984].

Los compuestos terpénicos presentes en los aceites esenciales suelen ser monoterpenos y sesquiterpenos, de 10 y 15 átomos de carbono respectivamente, los cuales difieren en la volatilidad y puntos de ebullición. Los monoterpenos suelen tener puntos de ebullición entre los 140 y 180°C, mientras que en el caso de los sesquiterpenos es de 200°C o superior.

Los monoterpenos pueden dividirse en tres grupos, según sean acíclicos, monocíclicos o bicíclicos. Cada uno de ellos incluye tanto hidrocarburos insaturados como compuestos con grupos funcionales, especialmente alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas y ésteres.

Los sesquiterpenos, por su parte, pueden ser acíclicos, mono-

cíclicos, bicíclicos o tricíclicos, ya sean hidrocarburos o sus derivados oxigenados, sobre todo alcoholes y epóxidos.

Biosintéticamente, los monoterpenos derivan de la condensación de dos unidades de 5 átomos de carbono, procedentes del ácido mevalónico, que da lugar al pirofosfato de geranilo, punto de partida para la formación de la mayoría de terpenos del vegetal. La adición de una tercera unidad de 5 átomos de carbono da lugar al pirofosfato de farnesilo, que conduce a los sesquiterpenos [WEISSMANN, 1966]. En la figura V-1 se ilustra la formación de los precursores acíclicos de monoterpenos y sesquiterpenos a partir del ácido mevalónico.

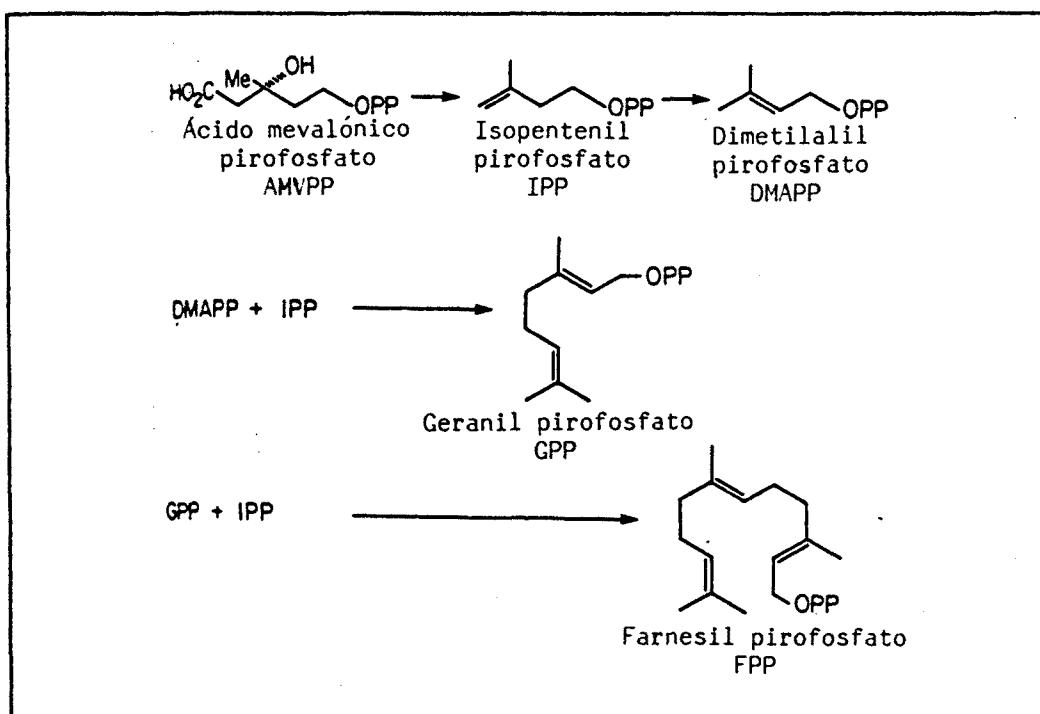


FIGURA V-1: Formación del pirofosfato de geranilo y pirofosfato de farnesilo a partir del ácido mevalónico [CROTEAU, 1986].

En diversas ocasiones se han utilizado precursores marcados con ^{14}C ($^{14}\text{CO}_2$, $[1-^{14}\text{C}]$ acetato y $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonato) [BANTHORPE et al., 1975; GLEIZES et al., 1984] para estudiar su papel en la biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos. De este modo, en *Mentha piperita* [BATTAILLE & LOOMIS, 1961], se demostró que la

síntesis de monoterpenos tiene lugar en tejidos jóvenes, y que las transformaciones que posteriormente experimentan (oxidaciones, ...) se producen en los tejidos más viejos, lo cual hace pensar que a medida que las hojas envejecen, los terpenos sufren diversas modificaciones en su estructura.

Tanto el pirofosfato de geranilo como el pirofosfato de farne-silo experimentan reacciones de ciclación, reordenación intramole-cular y oxidación, catalizadas por diversos enzimas (ciclasas, oxi-dasas, acetilCoA transferasas, ...) que en algunos casos han podido ser aislados e identificados [CANE et al., 1982; CROTEAU & KARP, 1977].

Los monoterpenos aromáticos p-cimeno y timol, derivan del γ -terpineno por aromatización del mismo [POULOSE & CROTEAU, 1978; GRANGER et al., 1964 y 1965a] (figura V-2). Otros monoterpenos aromáticos (carvacrol, p-cimen-8-ol, alcohol cumínico) podrían derivar también del γ -terpineno y p-cimeno. Asimismo, los sesqui-terpenos aromáticos, como el α - o β -curcumeno o el cupareno, parece que derivan de los correspondientes dienos por desaturación, hecho todavía no demostrado [CROTEAU, 1986].

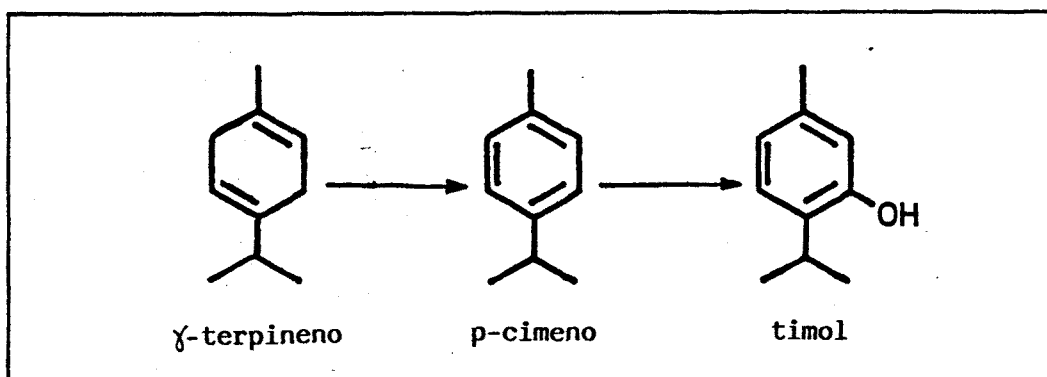


FIGURA V-2: Biosíntesis del timol a partir del γ -terpineno

Los cultivos de tejidos y células vegetales, de gran valor en el estudio de los procesos celulares en las plantas, no han sido de

gran utilidad para el estudio de la biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos, principalmente debido a que los terpenos producidos raramente se asemejan, ya sea cualitativa o cuantitativamente, a los que se acumulan en el vegetal [BERLIN et al., 1984; NABETA et al., 1983; WEBB et al., 1984]. Algunos autores apuntan hacia la intervención de procesos catabólicos que participarían en la regulación de los terpenos [CROTEAU, 1986].

La biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos ha sido objeto de diversas revisiones, entre las cuales destacan las realizadas por CORDELL (1976), CROTEAU (1980 y 1986), HANSON (1977 y 1984), RUCKER (1973) y SCHREIER (1984).

Por lo que se refiere al papel de los aceites esenciales en los vegetales, parece ser que, en la mayoría de casos, es de tipo ecológico. Intervienen en interacciones planta-animal, ya sea atrayendo a zoopolinizadores y zoodispersores, o bien actuando como mecanismos de defensa frente a animales fitófagos. Participan, también, en fenómenos de alelopatía inhibiendo la germinación y crecimiento de especies competidoras. En ocasiones, pueden tener una función en la propia planta, por ejemplo reduciendo la transpiración cuando hay un exceso de temperatura [CROTEAU, 1986; HARBORNE & TURNER, 1984].

Son numerosas las drogas que contienen esencias utilizadas en terapéutica, entre las cuales se encuentran drogas con actividad antiséptica, empleadas tanto en enfermedades de vías respiratorias como urinarias, eupéptica y carminativa, estimulante del sistema nervioso central, estomáquica, antiespasmódica, colerética, antiinflamatoria, vermífuga, etc... [SCHILCHER, 1984].

La actividad antimicrobiana es la que, con más frecuencia, se ha atribuido a los aceites esenciales [BLAZQUEZ, 1986; HOVADÍK & CHLÁDEK, 1974; KOWAL & KRUPIŃSKA, 1979; PELLECUER et al., 1980; PIZSOLITTO et al., 1972; ROSS et al., 1980; SIMEON DE BOUCHBERG et al., 1976], razón por la cual se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre el mecanismo de acción [KNOBLOCH et

al., 1986a, 1986b y 1986c] y se han desarrollado técnicas de screening de la actividad antimicrobiana de los mismos [JANSEN et al., 1986; PIZSOLITTO et al., 1975]. Parece ser que la actividad depende tanto del carácter lipófilo de los componentes como de los grupos funcionales que interfieren con los enzimas, encontrándose entre los terpenos más activos los fenoles (timol y carvacrol), seguidos de aldehidos y cetonas, alcoholes e hidrocarburos.

Por otra parte, los aceites esenciales tienen importancia como marcadores quimiotaxonómicos [MALINGRÉ, 1981; TÉTENYI, 1986]. En comparación con otros metabolitos secundarios, las esencias presentan mayor variabilidad infraespecífica, como lo demuestra el hecho de haber sido detectados quimiotipos en las especies de casi todos los géneros estudiados en profundidad. Estas diferencias, a menudo, se han relacionado con factores geográficos o ecológicos; sin embargo, se ha demostrado que interviene también un control genético.

Desde un punto de vista taxonómico, el estudio de los aceites esenciales ha contribuido a definir especies, detectar la presencia de razas geográficas y confirmar los límites entre distintos géneros y tribus [HARBORNE & TURNER, 1984; SMITH, 1976].

V.1.2.- EXTRACCIÓN.

En la actualidad existen diversos métodos para extraer los aceites esenciales [JENNINGS, 1980], algunos de los cuales se indican en la tabla V-2.

El método ideal sería aquél que extrajera totalmente la esencia, de forma cuantitativa, y no produjera variaciones en su composición cualitativa. No obstante, a pesar del progreso técnico experimentado en los últimos años, este objetivo no es fácil de conseguir, dada la diversidad de los componentes que constituyen los aceites esenciales y el hecho de que se encuentren en el vege-

tal en cantidades muy pequeñas.

<u>DESTILACIÓN</u>	<u>EXTRACCIÓN</u>	<u>OTROS</u>
<u>Destilación flash</u>	<u>Extracción por solventes</u>	<u>Arrastre por gas</u>
- Presión atmosférica	- Destilación-extracción simultáneas	- Sistema abierto
- Presión reducida		- Sistema cerrado
- Combinación		
<u>Destilación en corriente de vapor</u>	<u>Extracción con CO₂</u>	<u>Adsorción</u>
- Presión atmosférica	- Extracción con CO ₂ en condiciones supercríticas.	- Carbón
- Presión reducida		- Polímero poroso
		- Silicagel y otros
<u>Destilación al vacío</u>		<u>Concentración por congelación</u>
- Degasificación al vacío		<u>Liofilización</u>
- Destilación fraccionada		<u>Fusión por zonas</u>
- Sublimación a alto vacío		
- Destilación molecular		
<u>Destilación con CO₂</u>		

TABLA V-2: Métodos para el aislamiento y concentración de aceites esenciales [SCHREIER, 1984].

Los criterios a tener en cuenta para la selección de un método de extracción son, principalmente, volatilidad y punto de ebullición de los componentes, polaridad, estabilidad a temperaturas elevadas, influencia del oxígeno, concentración en que se encuentran, objetivo del análisis (ya sea cualitativo o cuantitativo), distribución del aceite esencial en el producto a extraer, estado físico del mismo (sólido, líquido acuoso, grasa o aceite) y composición total del producto [BEMELMANS, 1981].

La destilación es el método más ampliamente utilizado para la obtención de los aceites esenciales. Presenta la ventaja sobre otras técnicas, como por ejemplo la extracción con solventes, de no arrastrar sustancias no volátiles; sin embargo, suelen obtenerse soluciones acuosas diluidas de las que deben separarse los aceites esenciales. Es por esta razón que, a menudo, la destilación se combina con otras técnicas como extracción, adsorción o congelación. Por otra parte, las condiciones en que se efectúa (pH del

medio, temperatura y duración de la misma) influyen notablemente en la composición final de la esencia [KOEDAM & LOOMAN, 1980; KOEDAM et al., 1980c]. En diversas ocasiones se ha comparado el rendimiento obtenido por destilación y por extracción con solventes orgánicos [KOEDAM, 1981; KOEDAM et al., 1979a, 1979b, 1980a, 1980b y 1980c; TASKINEN, 1974] llegando a la conclusión de que esta última es más efectiva; no obstante, debe vigilarse el empleo de solventes alcohólicos que pueden alterar algunos de los componentes de la esencia [TASKINEN, 1976].

Se utiliza, también, la extracción con dióxido de carbono, tanto líquido como en condiciones supercríticas [CARAGAY, 1981; MOYLER, 1984; STAHL & GERARD, 1983]. Este disolvente presenta diversas ventajas entre las que destacan su bajo coste e inocuidad, posibilidad de trabajar en frío evitando la formación de artefactos, y su baja tensión superficial, baja viscosidad y alta capacidad de difusión permitiendo una rápida transferencia de masa. Es especialmente interesante la posibilidad de acoplar directamente este método de extracción con técnicas analíticas, sobre todo la cromatografía de gases [WRIGHT et al., 1987].

Otro método de preparación de la muestra es el denominado "headspace" (espacio de cabeza) [CALMET, 1986; SCHAEFER, 1981a; SCHREIER, 1984; VUORELA et al., 1986], que puede ser:

- estático: en él la muestra se calienta en un recipiente herméticamente cerrado en el que hay un gas (helio, por ejemplo) a baja presión. Pasado un cierto tiempo, los componentes volátiles liberados se introducen directamente en el cromatógrafo de gases.
- dinámico: en el cual los compuestos volátiles liberados son concentrados en una trampa, ya sea por medio de absorbentes líquidos, adsorbentes sólidos o enfriando (métodos criogénicos), previamente a su entrada al cromatógrafo.

En el presente trabajo hemos utilizado como técnica extractiva la hidrodestilación, previo ensayo de diferentes métodos de destilación y solventes orgánicos colectores. En ella, el material

vegetal sumergido en agua destilada, se calienta hasta ebullición. Los productos volátiles son arrastrados por el vapor generado hacia un refrigerante donde condensan, y se recogen sobre un disolvente orgánico inmiscible con el agua, que en nuestro caso ha sido el éter de petróleo 40º-60º para análisis. El destilador empleado ha sido el descrito en la Farmacopea Europea (1975), con matraz redondo de 2.000 ml.

IV.1.3.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ESENCIA.

Para determinar el contenido esencia de los táxones estudiados hemos utilizado el destilador citado en la Farmacopea Europea (1975) modificado de tal modo que el tubo graduado donde se mide la cantidad de esencia recogida es de menor diámetro consiguiéndose así una mayor precisión [ADZET, 1981].

El destilador consta de:

- matraz de fondo redondo de 2000 ml de capacidad, de cuello esmerilado.
- aparato de condensación, esmerilado en la parte que encaja con el matraz, en el cual se distinguen (figura V-3):
 - a) tubo vertical (AC) de 210-216 mm de diámetro interior.
 - b) tubo (CDE) de 7-8 mm de diámetro interior.
 - c) refrigerante de bolas (FG) de 145-155 mm de longitud y 8 mm de diámetro en los cuellos intermedios.
 - d) tapón de ventilación (K) perforado y abertura (K) de diámetro interior de 7,4-7,6 mm en la parte más ancha del tubo esmerilado.
 - e) tubo (GH) de 7-8 mm de diámetro interior y 30-40 mm de largo.
 - f) abultamiento (J) en forma de peonza de 5 ml de capacidad.
 - g) tubo graduado (JL) de 110-120 mm de longitud y 1 ml de capacidad.
 - h) abultamiento en forma de bola (L) de 2 ml de capacidad.

- i) llave de tres vías (M).
- j) tubo de comunicación (BM) provisto de un tubo de seguridad. La confluencia (B) está a nivel de 20-25 mm por encima del nivel superior del tubo graduado.

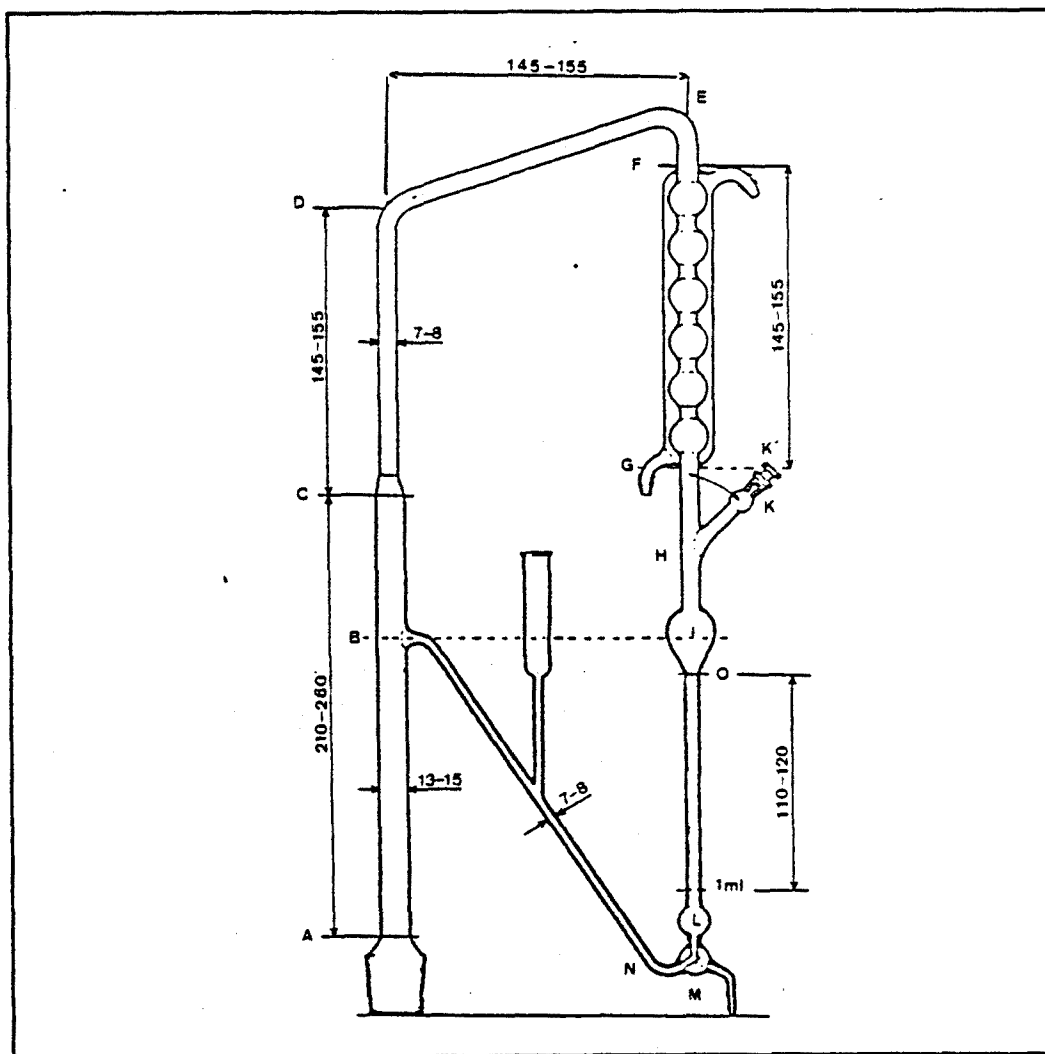


FIGURA V-3: Aparato de condensación del destilador utilizado para la determinación del contenido en esencia.

La metodología seguida ha sido la descrita en la Farmacopea Europea (1975), partiendo de 10 g de parte aérea de material vegetal desecado. La destilación se ha efectuado con 1.000 ml de agua destilada y la esencia se ha recogido sobre 0,4 ml de 1,2,3,4-

tetrametilbenzol (TMB, Ega-Cemie^R). Este disolvente orgánico se caracteriza por su insolubilidad en agua y baja volatilidad. La duración de la destilación ha sido de 1 h 30 min.

V.1.4.- TÉCNICAS ANALÍTICAS.

A) Introducción.

La separación de compuestos volátiles minoritarios se puede conseguir con relativa facilidad mediante cromatografía de gases de alta resolución utilizando columnas capilares. Sin embargo, en el caso de mezclas complejas, como son la mayoría de aceites esenciales de origen vegetal, una sola técnica de separación puede no ser suficiente para proporcionar la máxima información sobre los constituyentes de la muestra.

En la actualidad existen diversos métodos que permiten efectuar un fraccionamiento de las muestras antes de proceder a su análisis [SCHREIER, 1984]:

- Separación en fracciones ácida, básica y neutra, que suele llevarse a cabo por extracción selectiva del destilado y ajuste de pH. Debe tenerse en cuenta la posible formación de artefactos.
- Separación por tamaño molecular, mediante cromatografía de gel filtración utilizando geles de exclusión molecular (Sephadex^R) [BRANDAUER & ZIEGLER, 1982].
- Fraccionamiento en clases químicas por cromatografía líquida en columna. El método más empleado utiliza como fase estacionaria alúmina o silicagel, previamente desactivadas con agua para impedir isomerizaciones de los componentes de la muestra, y como eluyentes hexano o pentano a los que puede añadirse éter etílico, o incluso metanol, en cantidades crecientes [NTEZURUBANZA et al., 1986; SEIFERT et al., 1968; SCHEFFER & BAERHEIM SVENDSEN, 1975; SCHEFFER et al., 1976a, 1976b y 1977].

La cromatografía en columna seca evita, también, la aparición

de artefactos. En ella, los componentes del aceite esencial se separan según su polaridad, empleando silicagel y eluyentes de bajo punto de ebullición (pentano o benceno). Una vez efectuado el fraccionamiento la columna se corta en secciones de las que se extraen los compuestos [KUBECZKA, 1985].

La HPLC se ha utilizado en pocas ocasiones para el fraccionamiento de los aceites esenciales [JONES et al., 1979; SCHWANBECK et al., 1982] a pesar de las ventajas que presenta frente a la cromatografía en capa fina e incluso la cromatografía de gases: los análisis se realizan en menor tiempo, en ausencia de aire y a temperatura ambiente evitando fenómenos de degradación, al mismo tiempo que la muestra se recupera casi cuantitativamente. En las revisiones de KUBECZKA (1985), ROUSSEFF (1985) y SCHAEFER (1981b) se discuten las ventajas e inconvenientes de esta técnica en el campo de los aceites esenciales.

Otros métodos cromatográficos de pre-separación de los aceites esenciales son la cromatografía contra corriente en gotas (DCCC) [BECKER et al., 1981 y 1982] y la cromatografía contra corriente locular en rotación (RLCCC) [HEFENDEHL & KUHNE, 1984]. Esta última, debido a que no precisa formación de gotas, presenta mayor flexibilidad permitiendo elegir cualquier sistema de solventes como fases móvil y estacionaria. [KUBECZKA, 1985].

- Separación por derivatización de grupos funcionales, generalmente metilación o trimetilsililación, para obtener derivados de volatilidad elevada y reducir la adsorción irreversible de compuestos polares a la fase estacionaria [VAN STRATEN, 1981].

El análisis de los componentes de los aceites esenciales se realiza, principalmente, por cromatografía de gases con columnas capilares, ya sea mediante detectores universales, como por ejemplo: detector de ionización de llama (FID), detector de conductividad térmica (TCD) [GUNTHER et al., 1986] y detector de fotoionización, o detectores selectivos. Entre estos últimos se encuentran el detector

fotométrico de llama (FPD), detector de captura de electrones (ECD), detector de conductividad electrolítica (CECD/HECD), detector de radioactividad, etc... [BELZ, 1981; GROENEN, 1981].

La espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) [HERRES et al., 1986; SMITH, 1986] y, especialmente, la espectrometría de masas se utilizan, también, como detectores en cromatografía de gases y, en menor grado en cromatografía líquida de alta resolución [SCHREIER, 1984]. Asimismo, la HPLC puede acoplarse a la cromatografía de gases y a la cromatografía de gases-espectrometría de masas, proporcionando un valioso sistema de separación e identificación, útil en el caso de aceites esenciales muy complejos [GROB et al., 1984; ROUSEFF, 1985].

La cromatografía en capa fina aplicada al análisis de los aceites esenciales ha sido revisada recientemente por DHONT (1981). Aunque puede ser útil para seguir separaciones por cromatografía en columna, el desarrollo de técnicas modernas de cromatografía de gases ha limitado el campo de aplicaciones de la cromatografía en capa fina.

Otras técnicas analíticas más sofisticadas son exclusivamente espectroscópicas e incluyen tanto técnicas de espectrometría de masas (MS) como de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR).

La introducción directa de material vegetal desecado a un espectrómetro de masas permite obtener en poco tiempo y sin riesgo de formación de artefactos, información sobre los principales constituyentes de un aceite esencial [SCHULTZE et al., 1986].

Actualmente, la espectrometría de masas en tándem (MS-MS) está adquiriendo importancia en el análisis de aceites esenciales, ya que permite la separación e identificación de sus componentes [SCHREIER, 1984].

La ^1H -NMR no se utiliza en el campo de los aceites esenciales, principalmente debido a su baja sensibilidad. No obstante, es útil

para verificar la estructura de un compuesto cuando el espectro de masas no es suficiente para identificarlo.

Recientemente, FORMÁCEK & KUBECZKA (1982a y 1982b) demostraron la posibilidad de determinar cualitativa y cuantitativamente los principales constituyentes de los aceites esenciales mediante ^{13}C -NMR, sin necesidad de efectuar una separación preliminar.

En el presente trabajo hemos utilizado como técnicas analíticas la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), empleando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 y un sistema GC-MS computerizado Hewlett-Packard modelo 5992 B, respectivamente. Cuando ha sido necesario, hemos efectuado un fraccionamiento preliminar del aceite esencial por cromatografía en columna de silicagel eluyendo con solventes de polaridad creciente.

B) La cromatografía de gases y la espectrometría de masas aplicadas al estudio de los aceites esenciales.

Columnas capilares.

La cromatografía de gases o cromatografía gas-líquido utiliza como fase móvil un gas, que suele ser nitrógeno, hidrógeno o helio, y como fase estacionaria un líquido retenido en un soporte sólido inerte. Se trata de un sistema de partición en el que los componentes de una muestra son separados debido a una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente, de manera que cada uno de ellos es eluido a distinta velocidad.

La separación de los componentes depende tanto de la temperatura, como del tipo de columna (capilar o empaquetada) y fase estacionaria utilizadas y del flujo de gas portador. A menudo, al trabajar a temperatura regularmente creciente (temperatura programada), pueden producirse pérdidas sensibles de la fase estacionaria,

por lo que debe seleccionarse previamente la temperatura adecuada a la fase estacionaria que se utiliza para evitar pérdidas, al mismo tiempo que se consigue una separación óptima [GAVIÑA MÚGICA & TORNER OCHOA, 1974].

En la actualidad, la aparición de las columnas capilares ha disminuido notablemente el empleo de columnas empaquetadas, principalmente debido a su elevada eficacia. Sin embargo, estas últimas aún son de gran utilidad para fraccionar mezclas de compuestos volátiles. En este tipo de columnas la fase estacionaria se encuentra recubriendo, en forma de película, partículas uniformes de un soporte sólido física y químicamente inerte. La difusión de las moléculas de la muestra alrededor de las partículas de soporte retrasa el proceso cromatográfico.

Las columnas empaquetadas pueden ser de metal o de vidrio, y suelen tener longitudes que oscilan entre los 0,5 y 6 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm.

Las columnas capilares son de longitud mucho mayor (hasta 200 m) y diámetro interno entre 0,20 y 0,75 mm. Pueden ser de varios tipos [JENNINGS & DANDENEAU, 1981]:

- WCOT ("Wall-Coated Open Tubular"): en ellas la fase estacionaria líquida se encuentra depositada directamente sobre las paredes de la columna.
- PLOT ("Porous Layer Open Tubular"): en las que la fase estacionaria recubre partículas groseras de un soporte inerte.
- SCOT ("Support-Coated Open Tubular"): en este caso la pared de la columna se recubre de una mezcla de soporte sólido finamente dividido, generalmente alúmina o sílica, y fase estacionaria líquida.

En las columnas capilares, la naturaleza del material del tubo influye más en la separación de los componentes de la muestra y en la posible formación de artefactos, que en las columnas empaquetadas [ETTRE, 1974].

Por esta razón, las primeras columnas capilares metálicas fueron substituidas por columnas de vidrio [GORETTI et al., 1977]. Éstas presentan otro tipo de problemas que derivan de la fragilidad del vidrio y de la aparición de volúmenes muertos tanto en la conexión al inyector como al detector.

Actualmente, el empleo de columnas capilares de cuarzo flexible (o sílice fundida) resuelve este tipo de inconvenientes. Su superficie es inerte ya que está formada por cuarzo de alta pureza, hecho que permite extender la fase líquida sin que se produzcan alteraciones de la misma, y el tubo capilar es robusto y flexible, lo cual aumenta la duración de la columna [BRUNA GARCÍA, 1986].

Por lo que se refiere a las fases estacionarias disponibles, puede emplearse cualquiera de las utilizadas en columnas empaquetadas (siliconas, carbowax, poliglicoles, etc...), siendo especialmente interesantes la metilsilicona, que interacciona selectivamente con dipolos, y el polietilenglicol (PEG) que retiene aquellos compuestos que pueden formar puentes de hidrógeno eluyendo antes los demás [KAISER & KLEE, 1986].

La mayoría de fases estacionarias tipo PEG tienen las mismas limitaciones que el Carbowax 20-M: son muy susceptibles al oxígeno, son solubles en agua y alcoholes de bajo peso molecular y solidifican a temperaturas relativamente altas, por lo que su uso es más restringido [TAKEOKA, et al., 1985].

Los métodos de introducción de la muestra en cromatografía de gases con columnas capilares deben reunir los siguientes requisitos: asegurar una eficacia de separación óptima de la columna, evitar cambios en la composición de la muestra, elevada precisión y reproducibilidad en los análisis cuantitativos independientemente de las diferencias de volatilidad entre los componentes de la muestra, y evitar la degradación térmica de la misma [SCHREIER, 1984]. Actualmente se utilizan [BRUNA GARCÍA, 1986; FREEMAN, 1981]:

- Split: Es el sistema más antiguo, aunque el más empleado. Se basa en vaporizar la muestra en el inyector y enviar la mayor parte a la atmósfera. Útil para el análisis de componentes que se encuentran a partir de concentraciones del 0,1%. Puede utilizarse para casi todo tipo de muestras.
- Splitless: En este caso, prácticamente toda la muestra se introduce en la columna. Gracias al "efecto disolvente", los componentes de bajo punto de ebullición aparecen como picos agudos: cuando la temperatura del horno de la columna se mantiene 20-40°C por debajo del punto de ebullición del disolvente de la muestra, el vapor de éste condensa en la columna capilar y forma una película líquida que actúa a modo de fase estacionaria reteniendo los compuestos con mayor punto de ebullición. Útil para el análisis de compuestos a niveles de traza; no obstante, el número de disolventes que se pueden utilizar es limitado.
- On-column: Consiste en colocar la muestra directamente en la columna y reconcentrarla mediante el "efecto disolvente" o una trampa de frío. Es interesante para muestras que contienen compuestos con un amplio rango de punto de ebullición o termolábiles.
- Inyección directa: La muestra es vaporizada y, a continuación, pasa directamente a la columna.

Las principales ventajas de la cromatografía con columnas capilares pueden resumirse en las siguientes:

- Separaciones con elevada resolución.
- Mayor precisión en los análisis cuali y cuantitativos.
- Mayor sensibilidad.
- Reducción del tiempo de análisis.
- Reducción del tiempo de puesta a punto de métodos de análisis.

Las columnas capilares permiten separar muchos componentes de los aceites esenciales imposibles de detectar con columnas empacadas, resultando útiles sobre todo en el análisis de sesquiterpenos. Algunos de ellos poseen estructuras muy parecidas y propie-

dades físicas y químicas similares, por lo que su separación y detección es muy difícil mediante los métodos clásicos de análisis, especialmente cuando se encuentran en concentraciones bajas. Las columnas capilares ofrecen la posibilidad de separar este tipo de compuestos [SHIBAMOTO, 1981].

La conexión en serie de dos columnas capilares de diferente polaridad (cromatografía de gases multidimensional) puede aumentar mucho la capacidad de separación de un sistema cromatográfico [MILLER, 1981; WRIGHT et al., 1986] ofreciendo, también, la posibilidad de utilizar como sistema de detección tanto la MS como la FTIR [LIGON & MAY, 1986; SLACK & HEIM, 1986; TAKATA & KAWANISHI, 1983].

Son interesantes las revisiones de JENNINGS (1986), KAISER & KLEE (1986) y NOVOTNY (1978) sobre cromatografía de gases con columnas capilares.

Determinación de los índices de retención.

La identificación de los componentes de una muestra mediante cromatografía de gases se basa en la medida de sus tiempos de retención y comparación con los de sustancias ya conocidas. No obstante, puede ocurrir que dos o más componentes eluyan de la columna al mismo tiempo, por lo que, generalmente, una misma muestra se analiza en distintas condiciones, por ejemplo: mediante dos columnas de distinta polaridad (silicona SE-30 y carbowax 20-M).

En condiciones constantes, es decir, a igual temperatura de la columna y flujo de gas portador, el tiempo de retención de un compuesto debe ser, también, constante.

En la práctica, sin embargo, estas condiciones suelen oscilar de un análisis al siguiente. Por esta razón, la medida del tiempo de retención absoluto resulta inexacta.

De mayor precisión es el cálculo del tiempo de retención relativo, que consiste en relacionar el tiempo de retención de un compuesto con el de una sustancia patrón cromatografiada en idénticas

condiciones, ya sea en otro análisis (método del patrón externo) o al mismo tiempo que el problema (método del patrón interno). Este último es el sistema preferido.

El concepto de "Índice de Retención" fue propuesto por Kovats en 1958. Es un parámetro relativo, determinado respecto a n-alcanos que cubren toda la gama de retenciones, a los que, arbitrariamente, cualesquiera que sean la temperatura de la columna y la fase estacionaria, se asigna índices de magnitud:

$$I = 100 Z$$

donde Z indica el número de átomos de carbono de cada parafina de cadena recta [BLANCO DÍEZ et al., 1983]. Es necesario especificar la fase estacionaria y la temperatura a la que se ha efectuado el análisis. Si éstos se realizan siempre en las mismas condiciones, la reproducibilidad de estos índices es muy elevada. Cuando el análisis se lleva a cabo en condiciones isoterma, se determinan mediante un cálculo logarítmico o bien gráficamente. Representando el logaritmo del tiempo de retención ajustado de una serie homóloga de n-alcanos frente al número de átomos de carbono de los mismos, se obtiene una relación lineal, a partir de la cual se puede hallar fácilmente el índice de Kovats de cualquier sustancia, conociendo su tiempo de retención ajustado.

Cuando los análisis se efectúan a temperatura programada, los índices de retención se calculan directamente a partir de los tiempos de retención, y no de sus logaritmos.

A veces, los índices de retención de n-alcanos no son suficientemente reproducibles, especialmente en columnas polares, por lo que se utilizan también otros patrones como, por ejemplo, hidrocarburos sesquiterpénicos, ésteres etílicos o metílicos [VAN STRATEN, 1981].

La medida de los índices de retención de los componentes de un aceite esencial en fases estacionarias de distinta polaridad, y la comparación con índices de patrones conocidos, proporciona in-

formación valiosa respecto a la posible identidad de los compuestos.

En el presente trabajo hemos determinado los índices de retención en dos columnas: una de características polares (carbowax 20-M) y otra de carácter apolar (silicona SE-30), respecto a una serie homóloga de ésteres metílicos de ácidos grasos. Los datos obtenidos se han comparado con los de sustancias ya conocidas, analizadas en las mismas condiciones.

Los análisis se han efectuado en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890, dotado de un detector de ionización de llama (FID) e inyector con división de flujo (split). Las condiciones analíticas han sido las siguientes:

- Columnas capilares de sílice fundida carbowax 20 M y silicona SE-30, de 25 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interno.
- Gas portador: helio.
- Flujo: 1 ml/min.
- Split: 1:60.
- Temperatura inicial de la columna: 80°C.
Temperatura final de la columna: 220°C.
Gradiente de temperatura: 4°C/min.
- Temperatura del inyector: 250°C.
- Temperatura del detector: 270°C.

Estas condiciones se han utilizado, también, para efectuar los análisis cuantitativos.

Para determinar los índices de retención de los componentes de los aceites esenciales investigados, se ha inyectado, en primer lugar, la serie de ésteres metílicos, empleando las condiciones analíticas mencionadas, asignándoles, según su orden de elución, los valores de índice de retención 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800, respectivamente (figura V-4).

A continuación, se ha preparado una mezcla, a partes iguales, de aceite esencial y solución de la serie de ésteres metílicos de ácidos grasos, analizándola seguidamente en las dos fases estacionarias (CW-20M y SE-30), según las condiciones ya citadas.

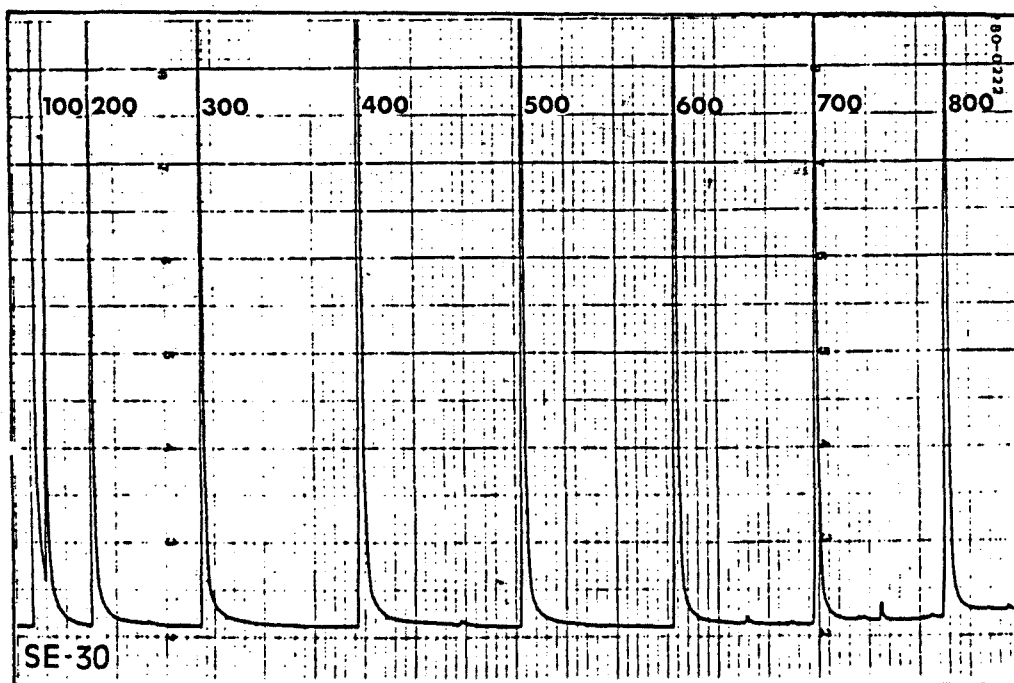
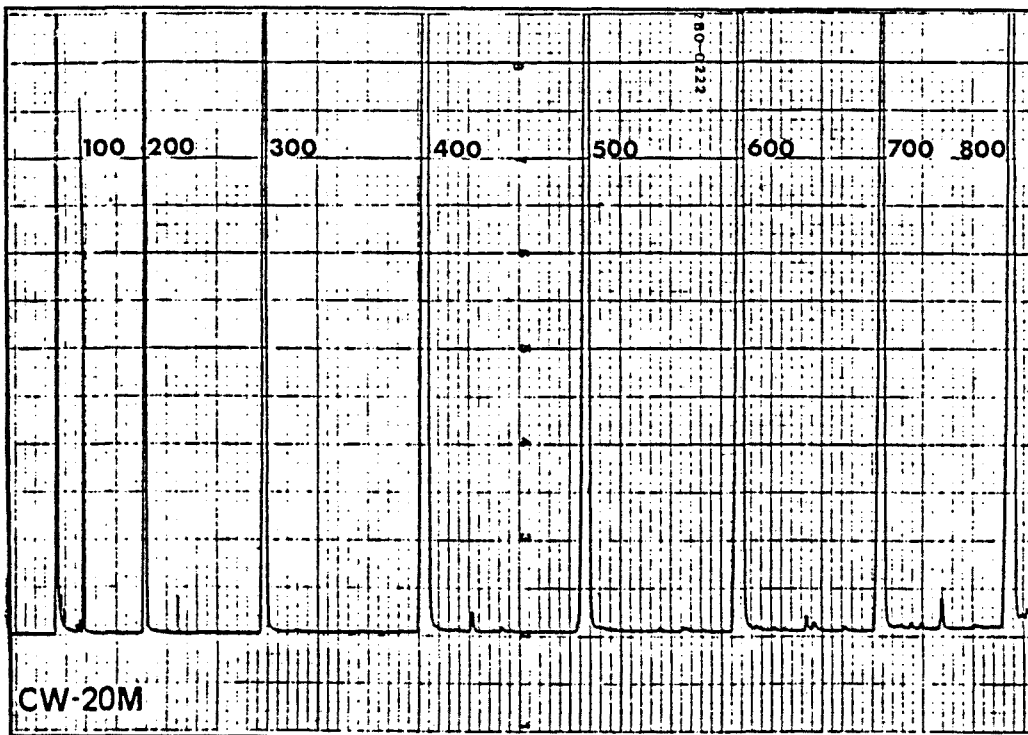


FIGURA V-4: Cromatogramas de la serie de ésteres metílicos de ácidos grasos utilizados en la determinación de los índices de retención, en CW-20M y SE-30.

Los índices de retención se han determinado según la fórmula siguiente:

$$RI_{(A)} = RI_{(n)} + \frac{\text{distancia entre A y n}}{\text{distancia entre n y n+1}} 100$$

donde (figura V-5):

$RI_{(A)}$ = índice de retención de un compuesto A.

$RI_{(n)}$ = índice de retención que, por definición, corresponde a n.

n = éster metílico que eluye anterior a A.

n+1 = éster metílico que eluye posterior a A.

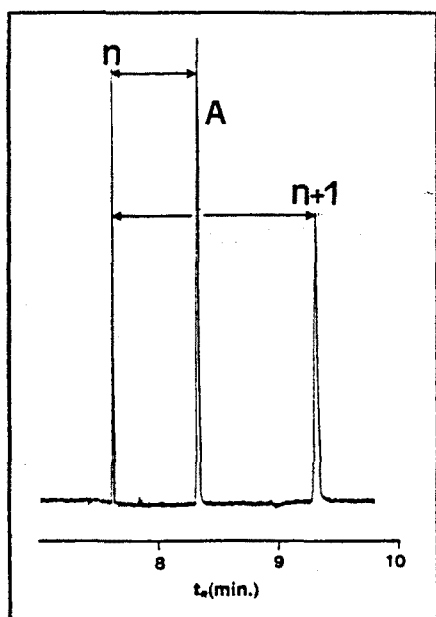


FIGURA V-5: Medida del índice de retención de un compuesto A.

Dada la imposibilidad de conseguir patrones de muchas de las sustancias que, presumiblemente, podrían encontrarse en las esencias a estudiar, una parte de los índices de retención, así como espectros de masa patrones, se han obtenido a partir de una esencia de *Thymus praecox* subsp. *arcticus* estudiada por STAHL (1984), que nos ha sido proporcionada por la misma autora. Especialmente, ha sido de gran utilidad para la identificación de sesquiterpenos.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Generalmente, la identificación de un compuesto a partir de sus índices de retención en distintas fases estacionarias no es suficiente, siendo necesaria su caracterización mediante alguna técnica espectroscópica.

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) ocupa un lugar primordial entre las técnicas analíticas utilizadas en la investigación de los aceites esenciales, ya que permite obtener la máxima información a partir de una mínima cantidad de muestra.

Una óptima combinación de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas requiere [TEN NOEVER DE BRAUW & VAN INGEN, 1981]:

- Sistema de bombeo diferencial, es decir, una bomba de difusión para el analizador de masas y otra para la fuente de iones. Esta última debe bombear al gas portador hacia el exterior y mantener unas condiciones de alto vacío aceptables.
- Presión lineal de la fuente de iones, para que la intensidad de la corriente de iones varíe linealmente con la cantidad de muestra introducida.
- Escala variable del espectrómetro de masas, con el fin de impedir la saturación del detector.
- Registro de los espectros de masas en el menor tiempo posible, que permita obtener suficiente información sobre la pureza de los picos cromatográficos.
- Compatibilidad con un sistema computerizado.
- Interfase GC-MS que proporcione una caída de presión entre la salida del cromatógrafo de gases y la entrada al espectrómetro de masas. En la actualidad se utilizan, principalmente, dos tipos de interfases: conexión directa y split abierto.

El desarrollo de las columnas capilares ha permitido la conexión directa entre ambos instrumentos, ya que en ellas el flujo de gas es lo suficientemente pequeño para ser absorbido por

- las bombas de vacío del espectrómetro de masas [FREEMAN, 1981].
- Fases estacionarias de baja volatilidad y buena estabilidad térmica.
 - Máxima resolución cromatográfica, para evitar el registro de espectros correspondientes a compuestos no separados.

Por lo que se refiere a las técnicas de ionización, las más utilizadas en la investigación de aceites esenciales son el impacto electrónico (EI-MS) y, más recientemente, la ionización química (CI-MS).

En CI-MS, el empleo de gases adecuados aumenta la intensidad de los iones casi moleculares y reduce el grado de fragmentación. Ello permite, por un lado, determinar la masa molecular de compuestos que no producen un ión molecular en EI-MS y, por otro, detectar sustancias que no han sido separadas por cromatografía de gases [LANGE & SCHULTZE, 1986a].

La detección y registro de señales se efectúa mediante un sistema automático de adquisición y tratamiento de datos. Los sistemas GC-MS computerizados registran automáticamente espectros de masas de la muestra eluida a intervalos de tiempo muy cortos que pueden ser menores al segundo, reconocen aquellos que corresponden a un mismo compuesto y almacenan todos los datos obtenidos.

Puede obtenerse el registro de las señales correspondientes a iones totales ("Total Ion Current" o T.I.C.), y/o las correspondiente a un ión determinado ("Single Ion Detection" o S.I.D.) o a varios iones ("Multiple Ion Detection" o M.I.D.). Por ejemplo: los iones a $m/z = 136$ (característico de monoterpenos) y a $m/z = 204$ (característico de sesquiterpenos) [TEN NOEVER DE BRAUW & VAN INGEN, 1981].

Los espectros obtenidos se comparan visual o automáticamente con los de sustancias conocidas. La efectividad de la búsqueda por ordenador depende del criterio de comparación seguido. La mayoría de programas codifican los espectros de masas en forma simplificada, seleccionando los fragmentos más significativos [ZAMUREENKO et al.,

1984]. El más utilizado elige de cada espectro los diez fragmentos que proporcionan los valores más altos al efectuar el producto $m/z \times$ intensidad relativa.

La espectrometría de masas de alta resolución proporciona información adicional, ya que permite conocer la composición elemental tanto del ión molecular como de los fragmentos y, por tanto más detalles sobre los grupos funcionales y estructura de la molécula [LANGE & SCHULTZE, 1986b].

La identificación de una sustancia exclusivamente por su espectro de masas no es definitiva si no se aportan otros datos como, por ejemplo, los índices de retención. De este modo se pueden diferenciar compuestos que tienen espectros de masas muy parecidos. Existen sistemas GC-MS computerizados que, automáticamente efectúan una preselección en base a los índices de retención antes de iniciar la comparación de los espectros de masas [ALENCAR et al., 1984; HUBSCHMANN & SCHUBERT, 1986].

La identificación de los componentes de los aceites esenciales por GC-MS y determinación de sus índices de retención utilizando dos tipos de columnas capilares (CW-20M y SE-30) es definitiva.

En el presente trabajo hemos utilizado un sistema GC-MS Hewlett-Packard, modelo 5992 B, en el que la conexión entre la columna capilar y el espectrómetro de masas es de tipo split abierto. El sistema dispone de una librería de datos que permite comparar los espectros de masas obtenidos con los de compuestos conocidos, en base a los diez fragmentos más significativos.

Las condiciones analíticas han sido las siguientes:

- Columnas capilares de sílice fundida, CW-20M y SE-30, de 25 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interno.
- Gas portador: helio.
- Flujo: 1 ml/min.
- Split: 1:60.
- Temperatura inicial de la columna: 80°C.
- Temperatura final de la columna: 220°C.

Gradiente de temperatura: 8°C/min.

- Temperatura inyector: 250°C.

Los espectros de masas han sido registrados cada 5 segundos, entre $m/z = 35$ y $m/z = 300$, utilizando una energía de ionización de 70 eV.

La identificación de los compuestos a partir de su espectro de masas se ha realizado por comparación con los espectros almacenados en la librería de datos, y con espectros de sustancias descritas en la bibliografía [STENHAGEN et al., 1974].

Análisis cuantitativo.

Una vez identificados los componentes de un aceite esencial, el siguiente paso consiste en cuantificarlos. Las determinaciones se basan en la medida de las áreas de los picos cromatográficos, que son proporcionales a la cantidad de cada componente según la relación:

$$Q_i = A_i \times K_i$$

donde: Q_i = concentración de un compuesto i.

A_i = área del pico correspondiente a i.

K_i = factor de sensibilidad del compuesto i.

El factor de sensibilidad, o factor de respuesta, depende de la estructura del compuesto y del tipo y sensibilidad del detector utilizado.

El cálculo del área de los picos suele efectuarse automáticamente mediante un integrador electrónico conectado a la salida del detector, o bien manualmente multiplicando la altura de cada pico por su anchura a la mitad de la altura.

Las columnas capilares dan lugar a cromatogramas con picos altos y estrechos cuya área es difícil de calcular por métodos manuales sin cometer errores; en este caso, los métodos automáticos son los que proporcionan mayor exactitud en las determinaciones.

En el presente trabajo los análisis cuantitativos se han reali-

zado mediante un cromatógrafo de gases con columnas capilares e integrador electrónico Hewlett-Packard modelo 3390. Las condiciones analíticas utilizadas han sido las mismas que para la determinación de los índices de retención.

Al utilizar un detector de ionización de llama (FID) y teniendo en cuenta los componentes habitualmente presentes en los aceites esenciales, se ha adoptado la simplificación de suponer el factor de sensibilidad K_i constante para todos los compuestos. Es decir:

$$Q_1 = A_1 \times K; \quad Q_2 = A_2 \times K; \quad \dots$$

de donde:

$$\frac{Q_1}{Q_2} = \frac{A_1}{A_2}$$

lo cual indica que existe proporcionalidad directa entre las cantidades de cada componente y las áreas de los picos correspondientes.

V.2.- ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE DIVERSAS ESPECIES DE THYMUS L.

V.2.1.- INTRODUCCIÓN.

A continuación, se dan los resultados obtenidos en la investigación de los aceites esenciales, efectuada por cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía en columna.

No ha sido posible investigar el aceite esencial de todos los táxones indicados en la tabla III-1 por no haber podido disponer de suficiente cantidad de muestra. Por ello, solamente se ha estudiado el aceite esencial de las muestras nº3 (*T. moroderi*), nº4 (*T. membranaceus*), nº 5 (*T. membranaceus* x *T. moroderi*), nº6 (*T. funkii*), nº8 (*T. camphoratus*), nº11 (*T. glandulosus*), nº12 (*T. baeticus*) y nº14 (*T. willkomii*). De cada uno de ellos se indica:

- **Contenido en aceite esencial** (expresado en % volumen/peso) determinado según se muestra en el apartado V.1.3.
- **Composición cualitativa.** La identificación de los componentes del aceite esencial se ha llevado a cabo por:
 - a) Determinación de sus índices de retención por GC en dos fases estacionarias distintas (CW-20M y SE-30), según la metodología citada en el apartado V.1.4.B.
 - b) GC-MS en CW-20M y SE-30 (para las condiciones analíticas, ver apartado V.1.4.B.).
 - c) Cromatografía en columna de óxido de aluminio, para efectuar una pre-separación de los componentes de la esencia según sus grupos funcionales. Así, se obtienen fracciones de menor complejidad, cuyo análisis por GC-MS permite identificar componentes que en el aceite esencial total quedan enmascarados por otros mayoritarios. La cromatografía en columna ha sido utilizada, en el presente trabajo, en la investigación del aceite esencial de *T. moroderi*.

- **Composición cuantitativa**, determinada por GC en base a las áreas de los picos obtenidos, utilizando las mismas condiciones analíticas que para la determinación de los índices de retención (ver apartado V.1.4.B.).

Las determinaciones se han realizado tanto en columna de CW-20M como de SE-30, ya que hay componentes que en una de estas fases estacionarias eluyen al mismo tiempo que otros y no se pueden detectar.

Las cantidades inferiores al 0,2% se han considerado trazas (t).

Es bien conocida la variabilidad que presentan los aceites esenciales en especies del género *Thymus*, especialmente en *T. vulgaris* [PASSET, 1971]. Por esto, hemos creído interesante estudiar la esencia de individuos de algunos de los táxones investigados, concretamente *T. moroderi*, *T. membranaceus* y *T. membranaceus* x *T. moroderi*. Para ello, se ha analizado, cuali y cuantitativamente, el aceite esencial de varios individuos recolectados al azar, de la población previamente estudiada.

V.2.2.- RESULTADOS.

A) Aceite esencial de *Thymus moroderi*.

Contenido en esencia: 1,2% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

El aceite esencial de *T. moroderi* ha sido estudiado por GC, GC-MS y cromatografía en columna.

En la figura V-6 se muestran los cromatogramas en columna de CW-20M y SE-30 de la esencia de esta especie. La numeración de los picos se ha realizado atendiendo al cromatograma obtenido por GC-MS en cada fase estacionaria, en donde los componentes son numerados por orden de elución.

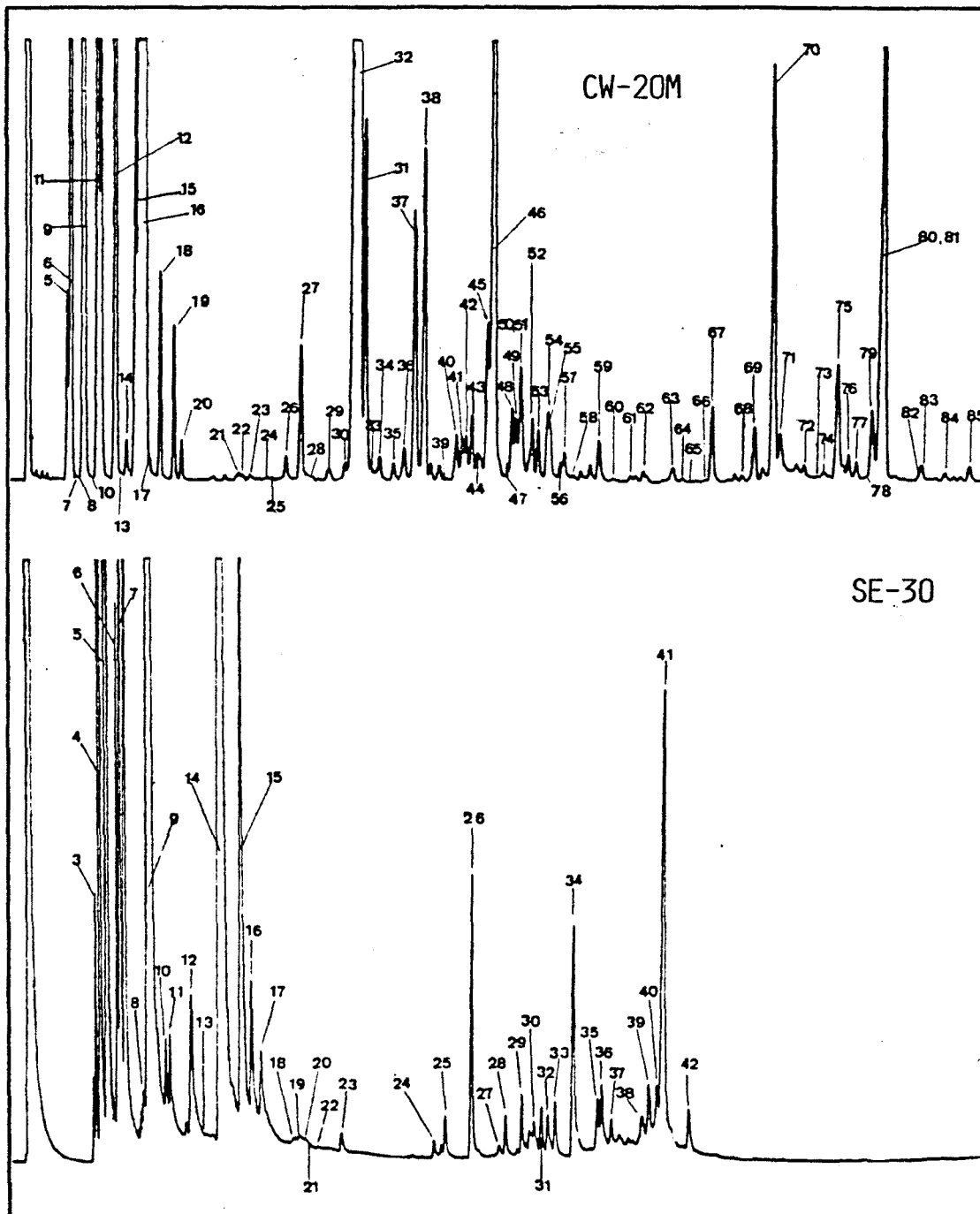


FIGURA V-6: Análisis del aceite esencial de *T. moroderi* en columna de CW-20M y SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Dado el gran número de componentes presentes en la esencia, se ha utilizado la cromatografía en columna para fraccionarla y poder identificar algunos componentes minoritarios. Para ello, se ha utilizado una columna de 40 cm de longitud y 1 cm de diámetro interno, rellena de alúmina (Al_2O_3) de grado de actividad I (Merck, 1077) a la que se ha añadido un 4% de agua para llevarla a grado III. Se ha sembrado 1 ml del aceite esencial y, a continuación, se ha eluido mediante la siguiente secuencia de disolventes de polaridad creciente:

Éter de petróleo -----	20 ml
Éter de petróleo:éter etílico (9:1) -----	10 ml
Éter de petróleo:éter etílico (8:2) -----	10 ml
Éter de petróleo:éter etílico (6:4) -----	10 ml
Éter etílico -----	10 ml
Éter etílico:MeOH (9,9:0,1) -----	10 ml
Éter etílico:MeOH (9,8:0,2) -----	10 ml
Éter etílico:MeOH (9,6:0,4) -----	10 ml
Éter etílico:MeOH (9,2:0,8) -----	10 ml
MeOH -----	100 ml

En estas condiciones, los compuestos se separan según su funcionalización (hidrocarburos, alcoholes, éteres, aldehidos, cetonas y ésteres).

Las fracciones recogidas se han concentrado a temperatura ambiente, añadiéndoles una pequeña cantidad de una sal neutra que absorbe el agua que pueden contener y que dificultaría el análisis posterior por GC-MS.

En la tabla V-3 se exponen los resultados obtenidos en el estudio del aceite esencial de *T. moroderi*. En ella se indica, para cada componente, el nº del pico en CW-20M y SE-30, el % en que se encuentra y el método o métodos de identificación.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos monoterpénicos (30%)				
6	4	α -pineno	6,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
9	5	canfeno	10,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
11	7	β -pineno	3,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
11	6	sabineno	1,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
12	7	mirceeno	4,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
14	8	α -terpineno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
15	9	limoneno	1,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
17	9	cis-ocimeno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
18	10	γ -terpineno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
19	8	p-cimeno	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
20	12	terpinoleno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
Monoterpenos oxigenados (59%)				
27	11	trans-sabineno hidrato	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
-	-	cis-sabineno hidrato	t	CC/GC-MS
31	12	linalol	2,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
37	16	terpinen-4-ol	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
45	17	α -terpineol	0,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
46	15	borneol	5,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
48	19	citronelol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
56	-	mirtenol	0,2	GC-MS, RI ₁ , CC/GC-MS
59	-	geraniol	0,2	GC-MS, RI ₁ , CC/GC-MS
74	23	timol	t	GC-MS, RI ₂ , CC/GC-MS
-	-	carvacrol	t	CC/GC-MS
-	-	isoborneol	t	CC/GC-MS
-	-	trans-pinocarveol	t	CC/GC-MS
-	-	óxido linalol	t	CC/GC-MS
-	-	óxido rosa	t	CC/GC-MS
29	13	canfolenal	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
49	21	geranial	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	-	mirtenal	t	CC/GC-MS
32	14	alcanfor	22,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
-	-	criptona	t	CC/GC-MS
-	-	carvona	t	CC/GC-MS
-	-	verbenona	t	CC/GC-MS
-	-	dihidrocarvona	t	CC/GC-MS
35	-	acetato isobornilo	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS

TABLA V-3: Aceite esencial de *T. moroderi*. Ver leyenda al final de la tabla.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
47	-	acetato nerilo	t	GC-MS, RI ₁
62	-	butirato geranilo	t	GC-MS, RI ₁ , CC/GC-MS
-	-	acetato citronelilo	t	CC/GC-MS
-	-	butirato bornilo	t	CC/GC-MS
-	-	acetato geranilo	t	CC/GC-MS
-	-	isobutirato geranilo	t	CC/GC-MS
-	-	propionato geranilo	t	CC/GC-MS
-	-	caproato geranilo	t	CC/GC-MS
Hidrocarburos sesquiterpénicos (2%)				
30	24	α -copaeno	t	GC-MS, RI ₁ , CC/GC-MS
38	26	β -cariofileno	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
43	27	α -humuleno	t	GC-MS, RI ₂ , CC/GC-MS
53	33	δ -cadineno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
54	32	γ -cadineno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
51	-	β -bisaboleno	0,3	GC-MS, RI ₁ , CC/GC-MS
Sesquiterpenos oxigenados (6,8%)				
70	34	β -elemol	2,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
72	-	hedicariol	0,2	RI ₁ , CC/GC-MS
75	39	γ -cadinol	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
76	-	10-epicadinol	t	GC-MS, RI ₁ , CC/GC-MS
78	40	α -elemol	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
79	-	α -cadinol	0,3	GC-MS, RI ₁
81	41	ledol	3,2	GC-MS
-	-	cubenol	t	CC/GC-MS
80	-	β -eudesmol	t	CC/GC-MS
67	36	epoxicariofileno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
-	-	epoxisocariofileno	t	CC/GC-MS
Otros (0,3%)				
23	8	3-octanol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
26	7	1-octen-3-ol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂ , CC/GC-MS
-	-	3-octanona	t	CC/GC-MS
22	-	acetato 1-octen-3-ol	t	GC-MS, RI ₁ , CC/GC-MS
-	-	butirato hexilo	t	CC/GC-MS
-	-	2-metil-butirato hexilo	t	CC/GC-MS
-	-	caproato hexilo	t	CC/GC-MS

TABLA V-3 (continuación): Aceite esencial de *T. moroderi*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁=Índice de retención en CW-20M. RI₂= Índice de retención en SE-30. CC/GC-MS=cromatografía en columna y análisis de las fracciones por GC-MS. t= trazas (< 0,2%).

Aceite esencial de los individuos.

Los resultados obtenidos en el análisis de los aceites esenciales de 10 individuos de *T. moroderi* se muestran en la tabla V-4, en la que se indican, solamente, los datos correspondientes a aquellos componentes que presentan mayor variabilidad entre los individuos. Algunos de estos compuestos (los sesquiterpenos S-1, S-2, S-3, S-4 y S-5) no han podido ser identificados a partir de su espectro de masas, pero dada su oscilación, hemos creído interesante incluirlos en los resultados. Junto a los porcentajes de los componentes de cada individuo, se indican también los hallados en la esencia de la población.

COMPONENTES	% EN POBLACIÓN	% EN INDIVIDUOS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CANFENO	10,6	9,4	18,2	13,6	8,3	6,5	14,3	9,7	15,5	12,4	13,6
SABINENO	1,7	2,2	2,2	0,5	2,9	2,7	0,5	1,2	0,3	0,5	0,6
β -PINENO	3,8	4,1	1,9	2,2	4,2	4,6	2,1	4,1	1,7	2,2	2,0
MIRCENO	4,7	4,5	0,5	5,2	3,5	2,3	4,8	3,4	4,9	2,6	4,8
CINEOL 1:8	24,5	36,7	10,7	12,3	29,3	32,2	7,8	35,8	13,1	18,0	10,2
ALCANFOR	22,8	14,7	30,4	23,1	15,6	15,6	26,9	15,8	28,2	25,4	24,8
BORNEOL	5,0	3,7	7,8	12,2	2,4	2,6	3,5	2,4	6,4	3,6	5,6
α -TERPINEOL	0,7	1,4	0,3	0,2	0,9	0,9	0,1	0,5	0,2	0,3	0,2
TIMOL	t	0,2	0,2	t	t	t	0,4	t	0,5	0,2	0,4
β -CARIOFILENO	1,0	t	1,2	1,2	0,8	0,5	3,1	0,4	0,7	2,6	0,7
S-1 (*)	t	t	t	t	t	0,2	0,3	0,4	0,8	0,1	0,7
S-2 (*)	t	t	t	0,5	0,5	0,3	0,1	0,4	0,5	-	0,5
γ -CADINENO	0,3	0,3	t	t	t	0,3	t	t	0,3	0,5	0,8
δ -CADINENO	0,3	0,3	0,4	0,3	0,6	0,3	0,8	0,4	1,3	0,4	1,2
β -ELEMOL	2,2	3,1	5,5	3,4	1,5	1,4	5,6	1,8	1,6	8,1	2,1
EPOXICARIOFILENO	0,3	0,4	1,6	0,4	0,4	-	0,9	0,4	2,2	0,6	t
S-3 (*)	-	t	-	t	t	8,7	t	t	t	t	t
S-4 (*)	-	0,3	-	0,5	t	t	0,7	-	0,3	1,0	0,3
T-CADINOL	0,5	0,3	0,6	0,4	t	t	0,3	0,2	0,3	0,4	0,4
α -ELEMOL	0,3	0,7	1,2	6,5	-	0,3	1,9	t	0,2	3,0	3,1
LEDOL	3,2	1,6	1,5	3,2	4,9	5,6	2,2	6,7	9,0	3,0	5,7
S-5 (*)	-	t	t	t	5,3	t	t	2,3	5,9	-	4,7

TABLA V-4: Componentes del aceite esencial de los individuos de *T. moroderi* que muestran mayor variabilidad. (*): Sesquiterpenos no identificados.

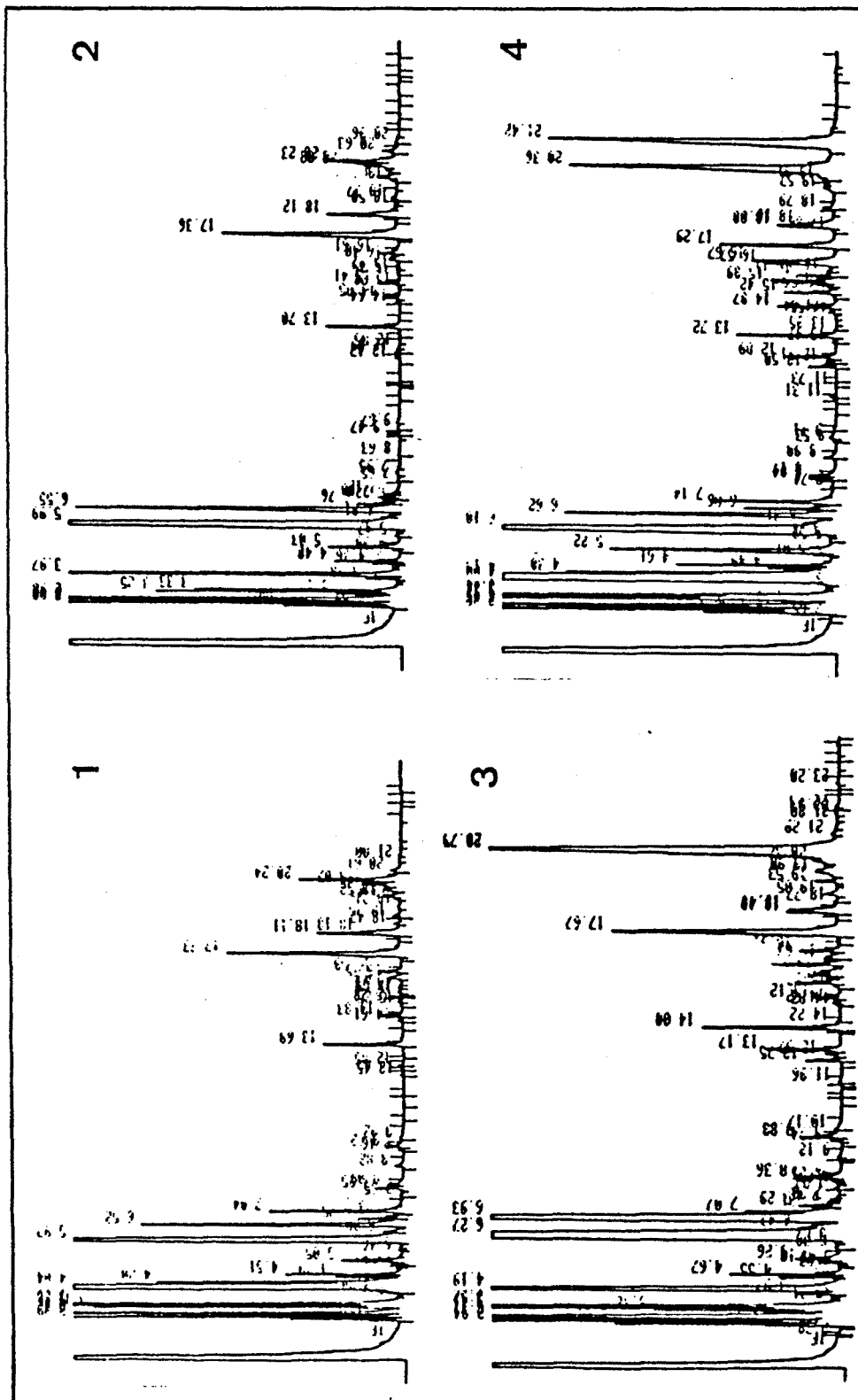
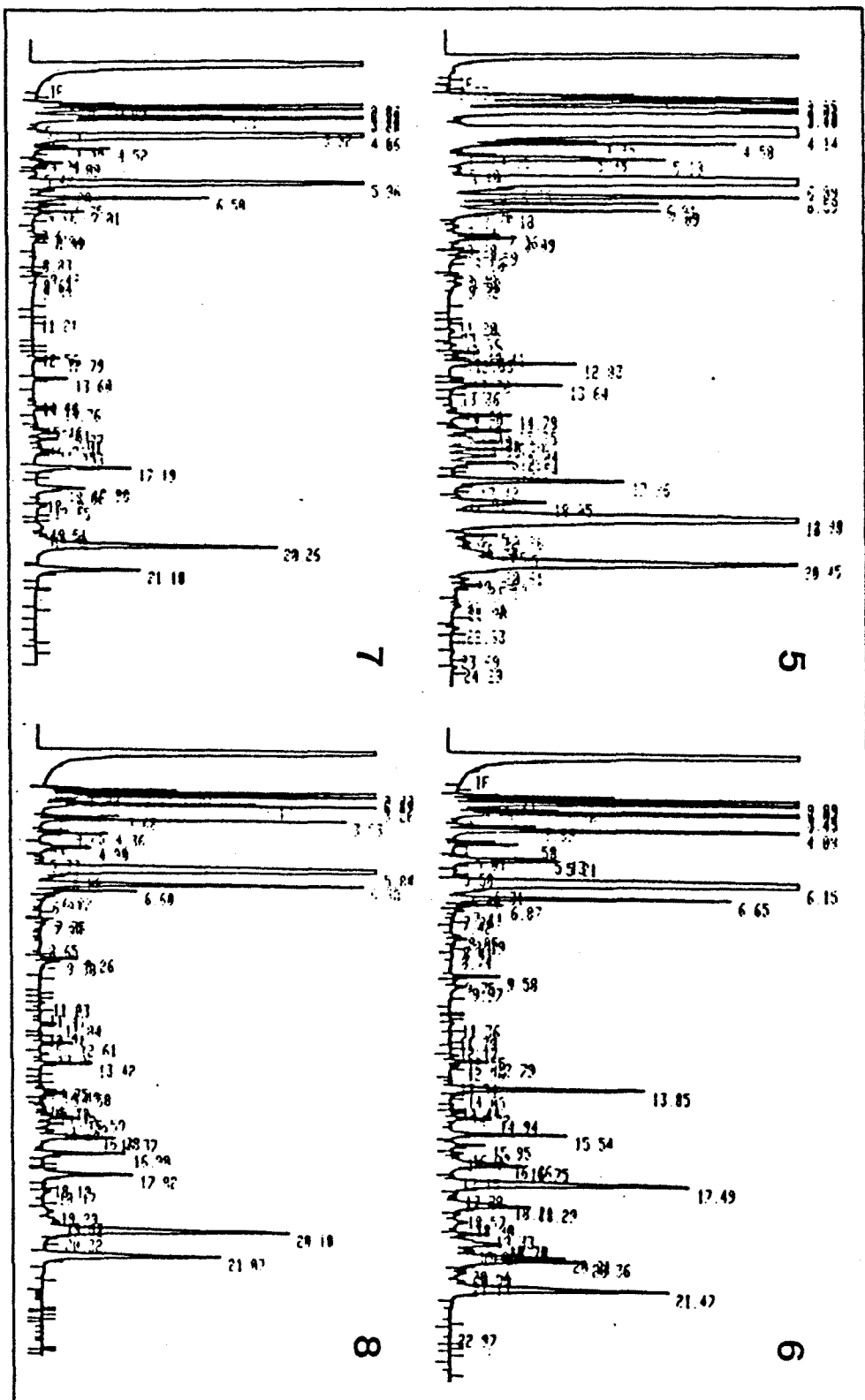


FIGURA V-7: Cromatogramas del aceite esencial de los individuos de *I. moroderi*, obtenidos en columna SE-30.

FIGURA V-7 (continuación): Cromatogramas del aceite esencial de los individuos de *T. moroderi*, obtenidos en columna SE-30.



B) Aceite esencial de Thymus membranaceus.

Contenido en esencia: 1,5% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

La investigación del aceite esencial de *T. membranaceus* se ha realizado por GC y GC-MS.

Las figuras V-8 y V-9 ilustran los cromatogramas de la esencia obtenidos en columna de CW-20M y SE-30, respectivamente.

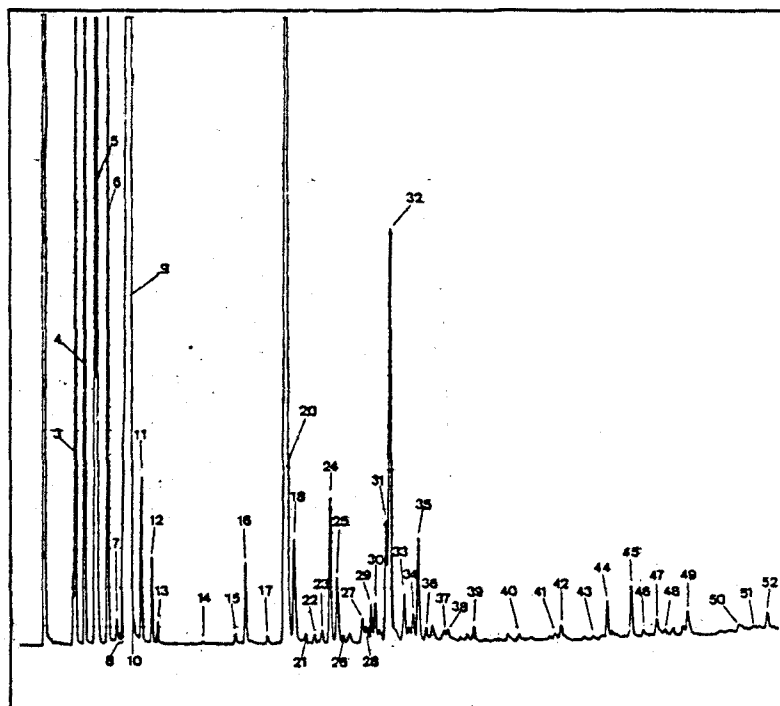


FIGURA V-8: Aceite esencial de *T. membranaceus*. Columna CW-20M. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

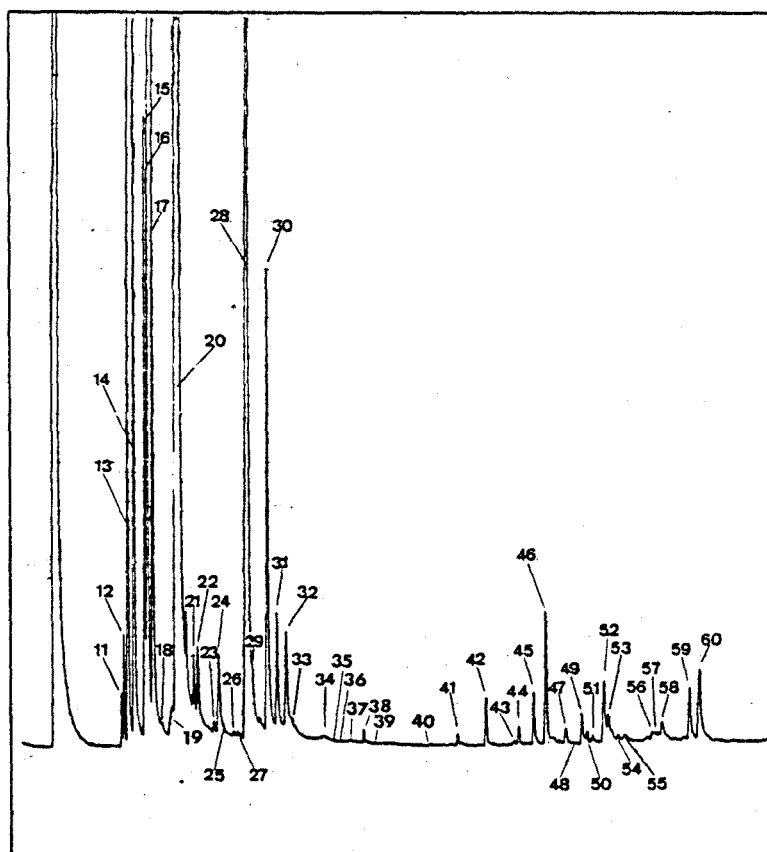


FIGURA V-9: Aceite esencial de *T. membranaceus*. Columna SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de los índices de retención, GC-MS y análisis cuantitativo, en CW-20M y SE-30, se resumen en la tabla V-5.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos monoterpénicos (29%)				
3	13	α -pineno	5,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
4	14	canfeno	8,1	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
5	16	β -pineno	5,1	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
5	15	sabineno	3,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
6	17	mirreno	4,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
7	19	α -terpineno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
8	20	limoneno	1,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
10	20	cis-ocimeno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
11	21	γ -terpineno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
12	19	p-cimeno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
13	24	terpinoleno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Monoterpenos oxigenados (63,6%)				
9	20	cineol 1:8	41,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
16	22	trans-sabineno hidrato	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
18	24	linalol	1,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	25	cis-sabineno hidrato	t	GC-MS, RI ₂
24	31	terpinen-4-ol	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
31	32	α -terpineol	1,1	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
32	30	borneol	3,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
38	-	mirtenol	t	GC-MS, RI ₁
47	38	carvacrol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
17	26	canfolenal	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	37	geranial	t	GC-MS, RI ₂
20	28	alcanfor	13,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
21	-	acetato linalilo	t	GC-MS, RI ₁
22	-	acetato isobornilo	t	GC-MS, RI ₁

TABLA V-5: Aceite esencial de *T. membranaceus*. Ver leyenda al final de la tabla.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos sesquiterpénicos (2%)				
26	42	β -cariofileno	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
30	43	α -humuleno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
30	44	β -cubebeno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
33	45	D-germacreno	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
34	-	β -bisaboleno	t	GC-MS, RI ₁
35	46	biciclogermacreno	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
36	-	δ -cadineno	t	GC-MS, RI ₁
-	47	ϵ -cadineno	0,2	GC-MS, RI ₂
Sesquiterpenos oxigenados (1,2%)				
44	49	β -elemol	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
48	-	10-epicadinol	t	GC-MS, RI ₁
49	-	α -cadinol	t	GC-MS, RI ₁
42	52	epoxicariofileno	0,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Otros (0,05%)				
15	17	1-octen-3-ol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂

TABLA V-5 (continuación): Aceite esencial de *T. membranaceus*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁=Índice de retención en CW-20M. RI₂=Índice de retención en SE-30. t=trazas ($\leq 0,2\%$).

Aceite esencial de los individuos.

En la tabla V-6 se muestran los resultados obtenidos en los análisis de los aceites esenciales de 10 individuos de *T. membranaceus*, atendiendo a los componentes que presentan mayor variabilidad entre ellos. Se indican, además, los porcentajes de cada componente en la esencia de la población estudiada.

En la figura V-10 se reúnen los cromatogramas correspondientes al aceite esencial de cada individuo, obtenidos en columna SE-30.

COMPONENTES	% EN POBLACIÓN	% EN INDIVIDUOS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CANFENO	8,1	8,1	8,9	12,1	10,1	13,2	7,9	10,3	8,8	9,2	9,6
β -PINENO	5,1	1,7	1,8	1,8	1,5	2,2	1,9	2,1	3,1	1,6	2,8
MIRCENO	4,6	4,0	3,9	3,3	3,2	4,8	3,3	3,7	4,1	3,6	5,0
CINEOL 1:8	41,2	38,6	26,2	19,8	27,1	40,3	20,1	36,4	34,9	25,5	32,9
γ -TERPINENO	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,7	0,1
t-SABINENO HIDRATO	0,5	0,8	0,2	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7	t	0,8
ALCANFOR	13,7	17,5	19,6	22,0	26,0	13,7	20,4	15,5	14,1	24,2	14,9
BORNEOL	3,9	2,2	6,4	5,7	4,2	2,9	5,6	4,5	5,1	6,2	7,3
β -CARIOFILENO	0,4	t	t	0,6	0,3	0,2	0,6	0,4	1,0	0,7	0,8
β -CUBEBENO	t	t	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	t	t	t	t
BICICLOGERMACRENO	0,8	1,3	0,9	1,7	0,3	1,5	1,5	2,3	1,0	1,5	1,5
γ -CADINENO	0,2	-	0,4	-	0,5	0,9	1,3	-	t	0,2	0,2
β -ELEMOL	0,4	t	-	-	0,3	t	t	0,8	-	0,3	-
EPOXICARIOFILENO	0,7	0,8	0,8	1,5	0,2	0,8	1,5	1,5	0,7	0,9	0,7
CARVACROL	t	t	t	t	0,3	t	0,2	0,3	0,2	0,4	t
S-1 (*)	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5
S-2 (*)	0,5	-	1,7	5,6	2,0	5,8	6,2	t	t	t	0,9
S-3 (*)	0,9	5,1	1,1	3,0	0,7	2,0	2,1	6,1	4,9	5,1	4,4

TABLA V-6: Componentes de la esencia de los individuos de *T. membranaceus* que presentan mayor variabilidad. (*): Sesquiterpenos no identificados.

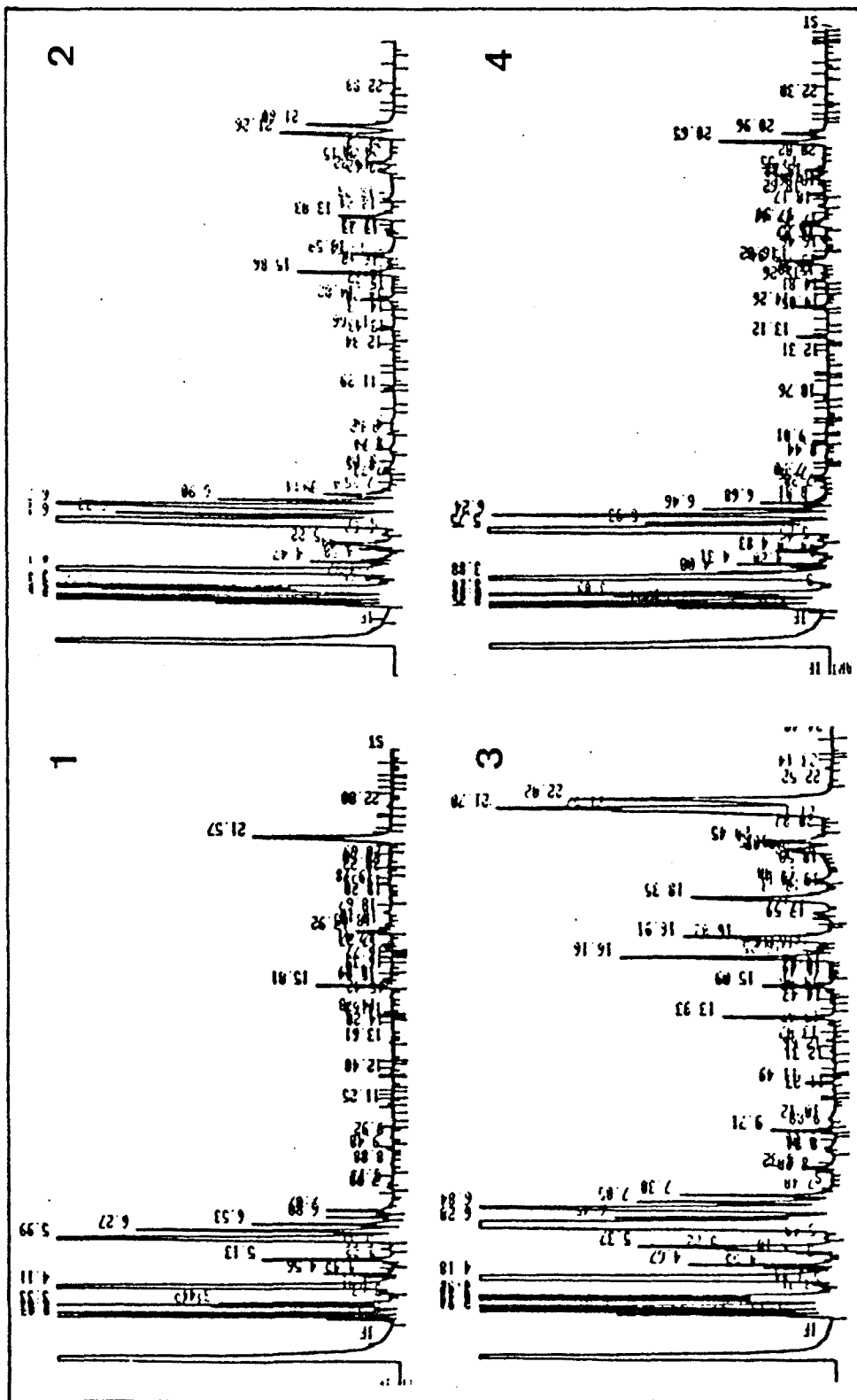
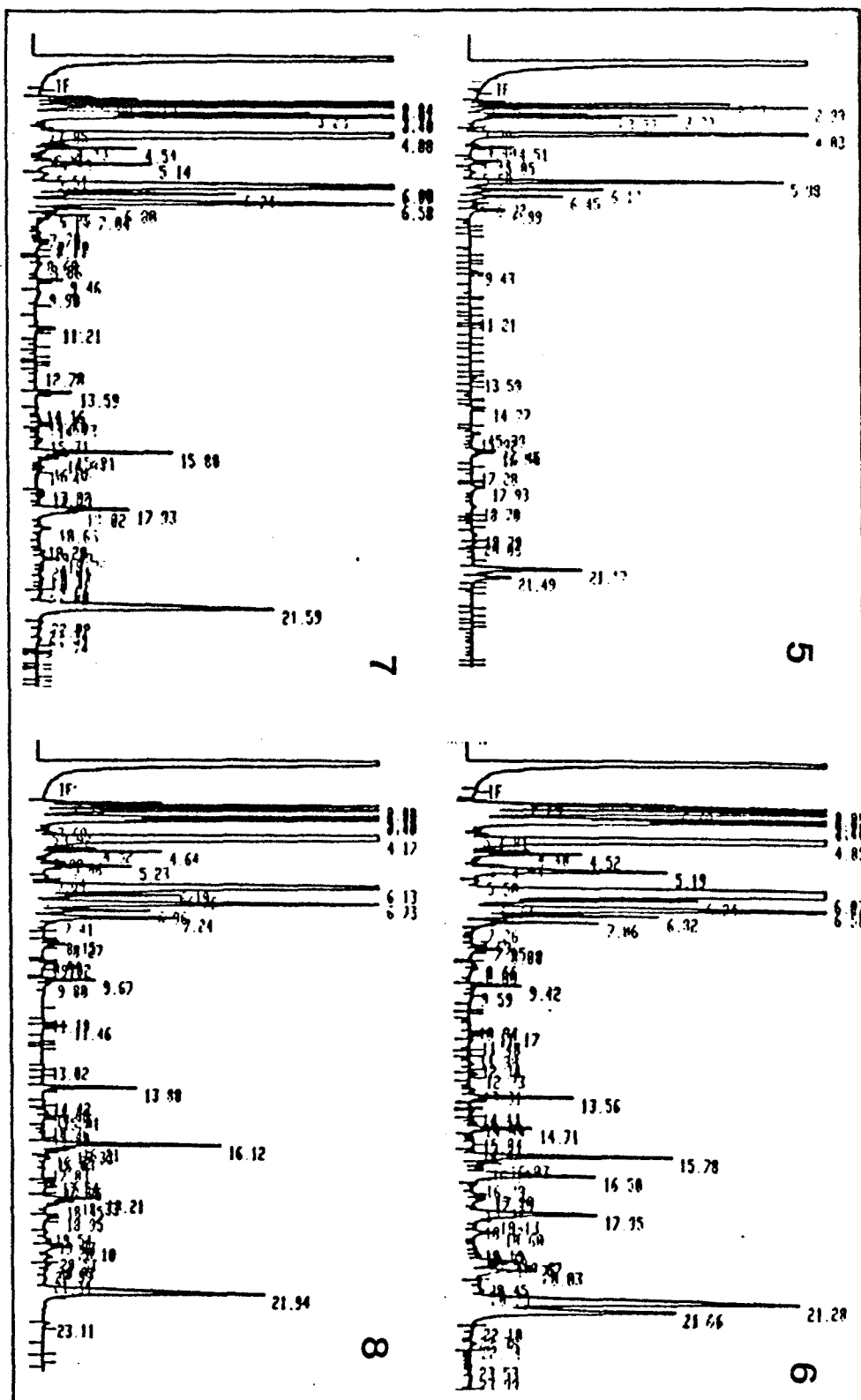


FIGURA V-10: Cromatogramas del aceite esencial de los individuos de *I. membranaceus*, obtenidos en columna SE-30.

FIGURA V-10 (continuación): Cromatogramas del aceite esencial de los individuos de *T. membranaceus*, obtenidos en columna SE-30.



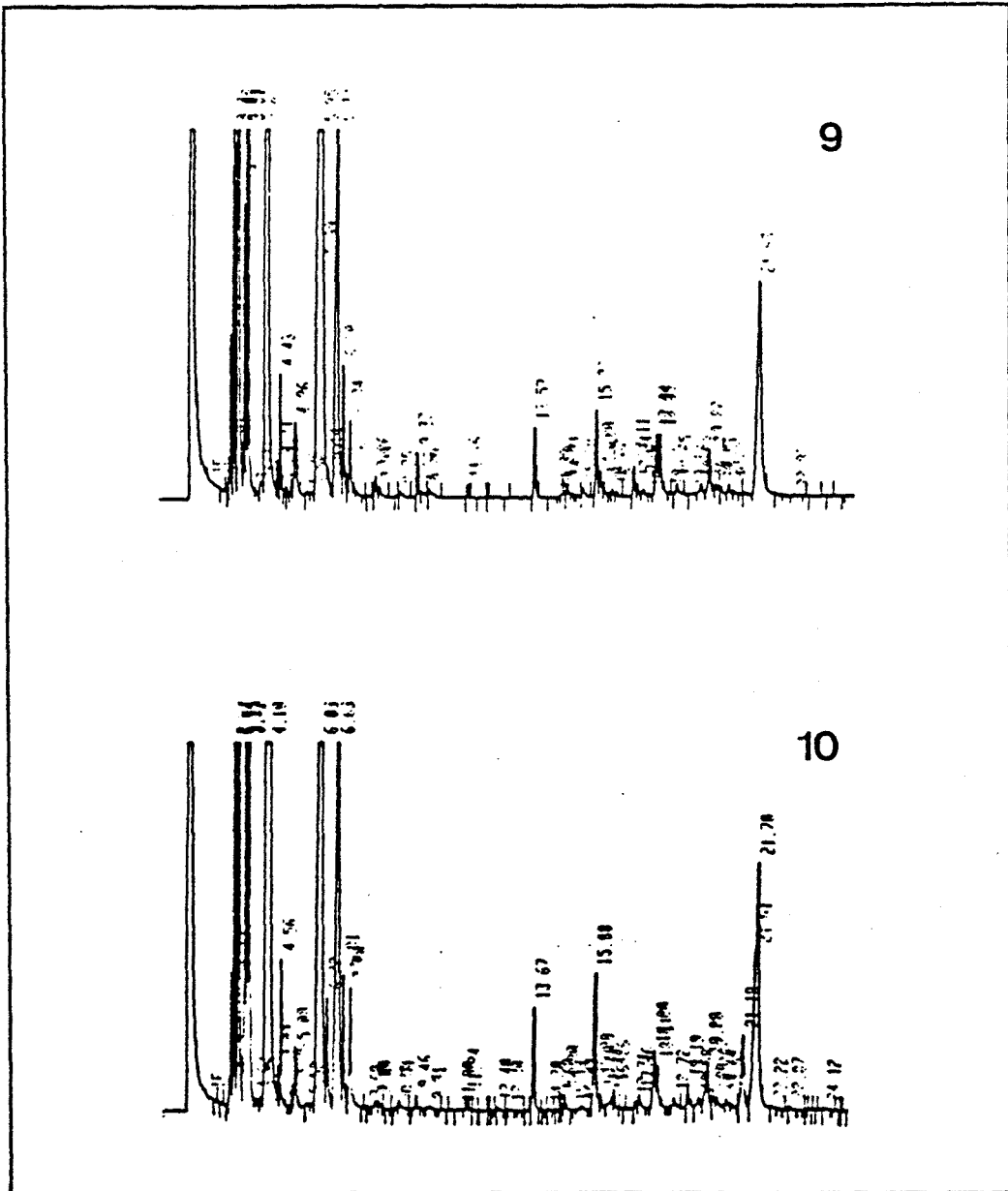


FIGURA V-10 (continuación): Cromatogramas del aceite esencial de los individuos de *T. membranaceus*, obtenidos en columna SE-30.

C) Aceite esencial de T. membranaceus x T. moroderi.

Contenido en esencia: 1,4% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

El aceite esencial de T. membranaceus x T. moroderi se ha estudiado por GC y GC-MS.

En la figura V-11 se muestran los cromatogramas de la esencia obtenidos en CW-20M y SE-30.

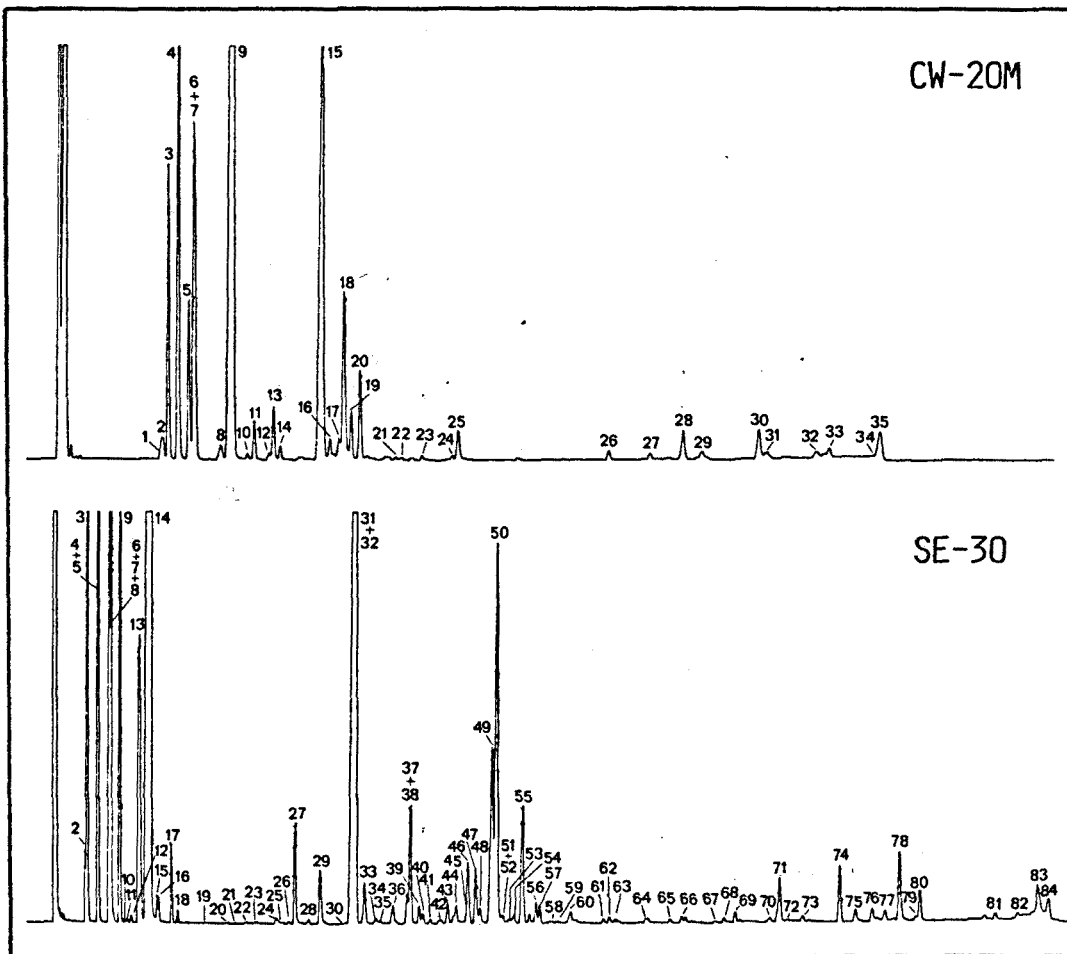


FIGURA V-11: Análisis del aceite esencial de T. membranaceus x T. moroderi en columna de CW-20M y SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Los resultados obtenidos en los análisis cuali y cuantitativo del aceite esencial se reúnen en la tabla V-7.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
 Hidrocarburos monoterpénicos (29%)				
3	3	α -pineno	5,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
4+5	4	canfeno	8,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
6	6	β -pineno	3,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
7	5	sabineno	2,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
9	7	mirreno	3,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
11	8	δ^3 -careno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
12	8	α -terpineno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
13	9	limoneno	3,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
15	9	cis-ocimeno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
16	10	γ -terpineno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
17	8	p-cimeno	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
18	12	terpinoleno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
 Monoterpenos oxigenados (60%)				
14	9	cineol 1:8	32,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
27	11	trans-sabineno hidrato	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
32	13	linalol	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
33	14	cis-sabineno hidrato	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
37	19	terpinen-4-ol	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
44	-	trans-pinocarveol	0,2	GC-MS, RI ₁
45	-	lavandulol	t	GC-MS, RI ₁
49	20	α -terpineol	2,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
50	18	borneol	4,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
53	-	citronelol	t	GC-MS, RI ₁
61	-	geraniol	t	GC-MS, RI ₁
78	25	carvacrol	0,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
30	-	canfolenal	t	GC-MS, RI ₁

TABLA V-7: Aceite esencial de *T. membranaceus* x *T. moroderi*. Ver leyenda al final de la tabla.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
48	21	neral	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
54	23	geranial	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
31	15	alcanfor	15,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
39	-	dihidrocarvona	0,2	GC-MS, RI ₁
41	-	dihidrocarvona	t	GC-MS, RI ₁
63	-	isopiperitenona	t	GC-MS, RI ₁
-	22	carvona	t	GC-MS, RI ₂
36	24	acetato isobornilo	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
60	-	isobutirato geranilo	t	GC-MS, RI ₁
64	-	butirato geranilo	t	GC-MS, RI ₁
Hidrocarburos sesquiterpénicos (2,33%)				
38	26	β -cariofileno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
47	-	α -humuleno + β -cubebeno	0,6	GC-MS, RI ₁
51	27	D-germacreno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
55	28	biciclogermacreno	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
56	29	δ -cadineno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
57	-	γ -cadineno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
59	-	β -curcumeno	t	GC-MS, RI ₁
Sesquiterpenos oxigenados (0,6%)				
66	-	δ -cadinol	t	GC-MS, RI ₁
76	32	T-cadinol	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
77	33	10-epicadinol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
69	-	epoxicariofileno	t	GC-MS, RI ₁
Otros (0,21%)				
19	-	6-metil-5-hepten-2-ona	t	GC-MS, RI ₁
20	-	acetato 1-octen-3-ol	t	GC-MS, RI ₁
21	-	3-octanol	t	GC-MS, RI ₁
24	7	1-octen-3-ol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂

TABLA V-7 (continuación): Aceite esencial de *T. membranaceus* x *T. moroderi*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁=Índice de retención en CW-20M. RI₂=Índice de retención en SE-30. t=trazas (<0,2%).

Aceite esencial de los individuos.

Se ha analizado el aceite esencial de 5 individuos de *T. membranaceus* x *T. moroderi*. Los porcentajes de los componentes que presentan mayor interés se reúnen en la tabla V-8, junto a su contenido en la esencia de la población estudiada.

La figura V-12 ilustra los cromatogramas correspondientes a cada uno de los individuos.

COMPONENTES	% EN POBLACIÓN	% EN INDIVIDUOS				
		1	2	3	4	5
CANFENO	8,6	8,5	12,6	9,0	8,5	8,4
SABINENO	2,8	3,7	1,6	2,7	3,5	3,4
β -PINENO	3,8	4,9	2,8	3,8	4,9	4,8
MIRCENO	3,9	4,2	5,3	4,7	4,1	4,1
CINEOL 1:8	32,9	33,8	21,2	34,3	33,9	34,7
γ -TERPINENO	0,2	0,2	2,0	t	0,2	0,2
ALCANFOR	15,5	14,3	24,5	16,3	15,0	14,0
BORNEOL	4,4	4,9	6,0	3,6	4,7	4,7
α -TERPINEOL	2,0	-	0,6	2,2	1,8	1,8
CARVACROL	0,7	0,6	1,1	0,6	0,6	0,6
β -CARIOFILENO	0,2	0,2	0,3	0,5	0,2	0,2
D-GERMACRENO	0,2	0,2	t	t	0,2	0,2
BICICLOGERMACRENO	1,0	0,9	1,1	1,3	0,9	0,9
δ -CADINENO	0,2	0,3	-	t	0,4	0,3
T-CADINOL	0,3	0,2	t	0,2	0,2	0,2
10-EPICADINOL	0,2	0,3	0,2	t	0,3	0,4
S-1 (*)	0,3	1,2	t	t	1,2	1,2
S-2 (*)	0,7	2,0	3,6	2,7	1,9	1,9

TABLA V-8: Componentes del aceite esencial de los individuos de *T. membranaceus* x *T. moroderi* que presentan mayor variabilidad. (*): Sesquiterpenos no identificados.

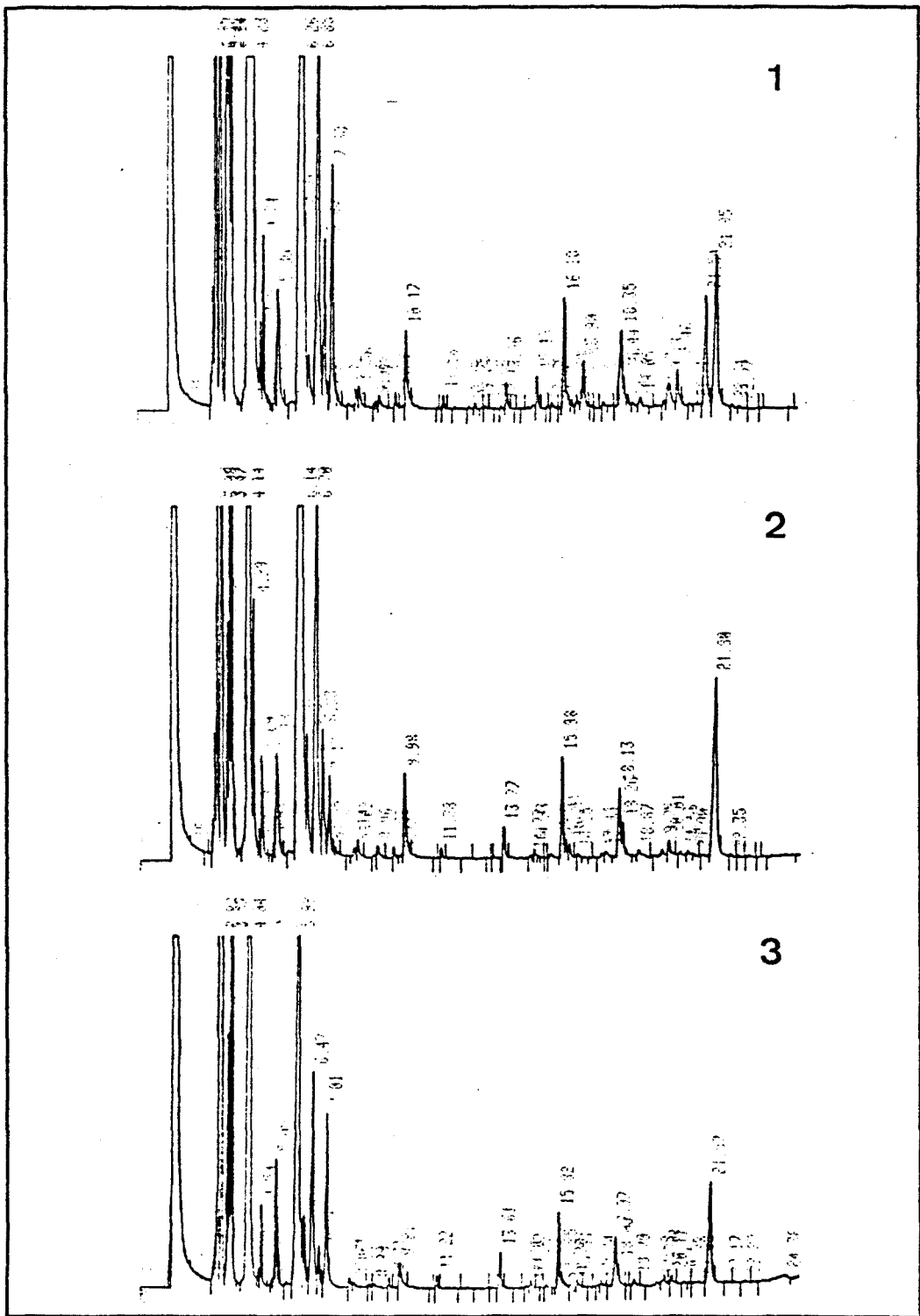


FIGURA V-12: Cromatogramas del aceite esencial de los individuos de *T. membranaceus* x *T. moroderi*, obtenidos en columna SE-30.

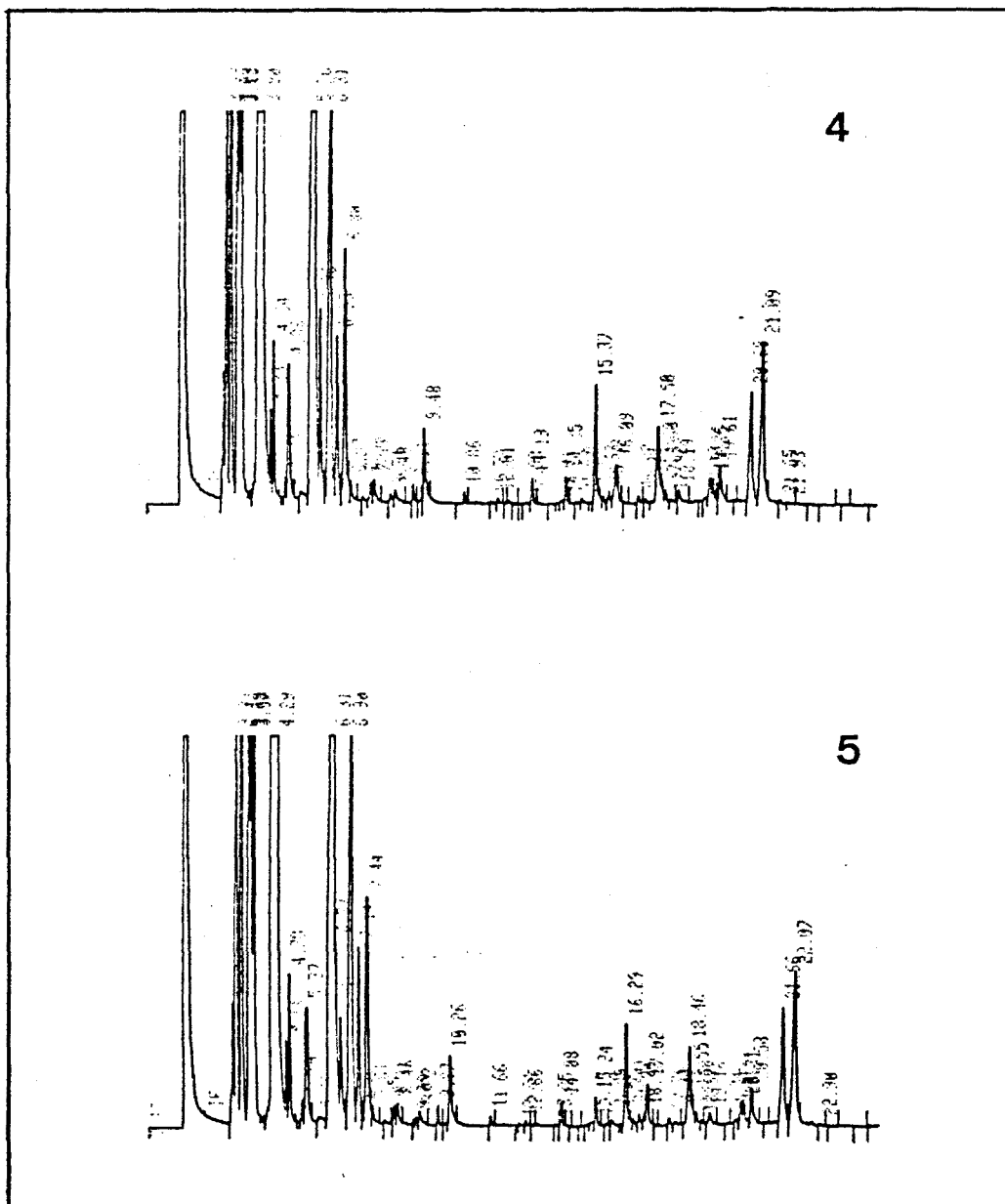


FIGURA V-12 (continuación): Cromatogramas del aceite esencial de los individuos de *T. membranaceus* x *T. moroderi*, obtenidos en columna SE-30.

D) Aceite esencial de *Thymus funkii*.

Contenido en esencia: 0,5% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

El estudio del aceite esencial de *T. funkii* se ha realizado por GC y GC-MS.

La figura V-13 muestra los cromatogramas de la esencia obtenidos en columna de CW-20M y SE-30.

En la tabla V-9 se exponen los resultados de la investigación del aceite esencial de *T. funkii*.

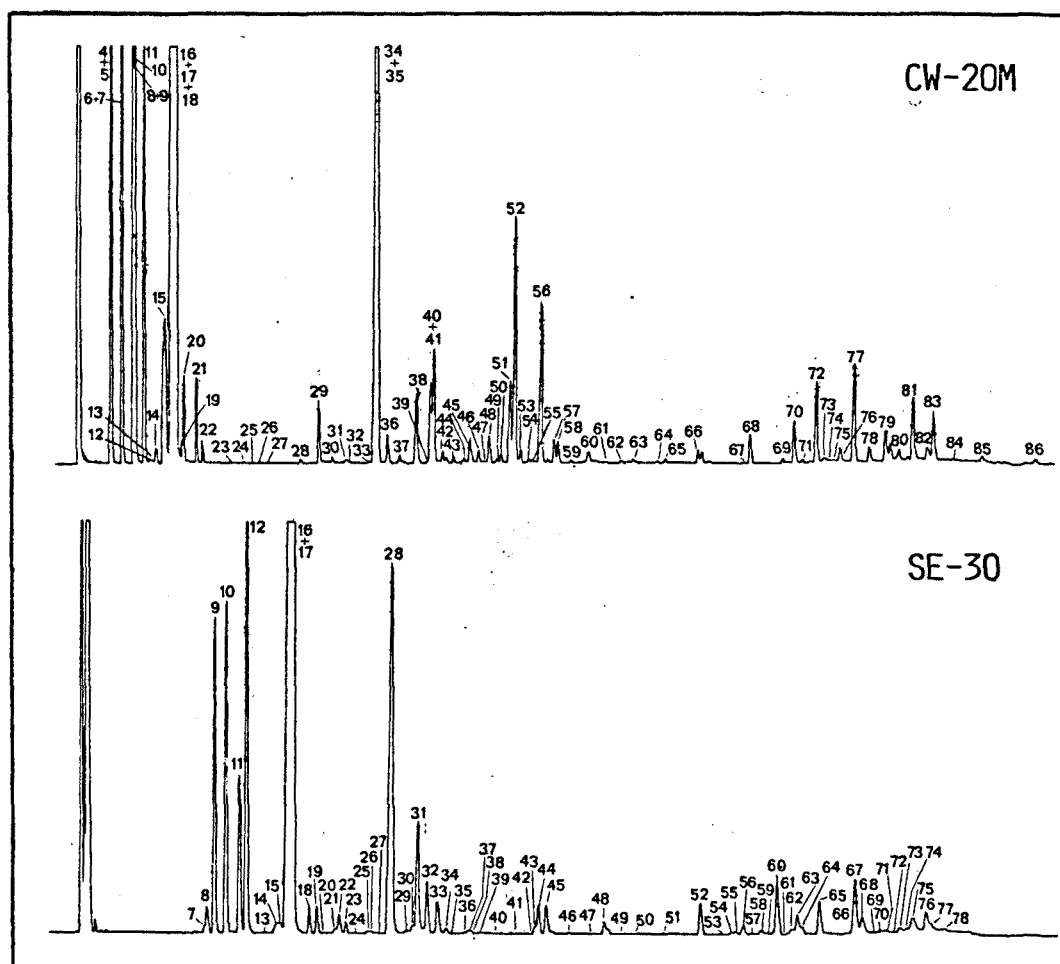


FIGURA V-13: Análisis del aceite esencial de *T. funkii* en columna de CW-20M y SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos monoterpénicos (27%)				
4+5	9	α -pineno	5,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
6+7	10	canfeno	5,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
8+9	12	β -pineno	6,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
10	11	sabineno	2,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
11	12	mirreno	2,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
13	13	Δ^1 -careno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
14	14	α -terpineno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
15	16+17	limoneno	2,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
19	16+17	cis-ocimeno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
20	18	γ -terpineno	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
21	15	p-cimeno	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
22	21	terpinoleno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	20	α -p-dimetilestireno	t	GC-MS, RI ₂
Monoterpenos oxigenados (65,2%)				
16+17+18	16+17	cineol 1:8	47,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
29	19	trans-sabineno hidrato	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
34	22	linalol	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
36	23	cis-sabineno hidrato	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
40	32	terpinen-4-ol	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
46	-	trans-pinocarveol	0,2	GC-MS, RI ₁
47	-	lavandulol	t	GC-MS, RI ₁
51	33	α -terpineol	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
52	31	borneol	2,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
55	37	citronelol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
62	36	carveol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
79	43	timol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
81	45	carvacrol	0,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	38	nerol	t	GC-MS, RI ₂
24	24	óxido rosa	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
32	25	canfolenal	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
50	-	neral	t	GC-MS, RI ₁
-	41	geranial	t	GC-MS, RI ₂

TABLA V-9: Aceite esencial de *T. funkii*. Ver leyenda al final de la tabla.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
35	28	alcanfor	10,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
42	-	dihidrocarvona	t	GC-MS, RI ₁
38	44	acetato isobornilo	0,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
39	42	acetato lavandulilo	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
65	64	butirato geranilo	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	39	formiato bornilo	t	GC-MS, RI ₂
-	48	acetato α -terpenilo	t	GC-MS, RI ₂
-	49	acetato geranilo	t	GC-MS, RI ₂
-	50	propionato bornilo	t	GC-MS, RI ₂
-	59	isobutirato geranilo	t	GC-MS, RI ₂
Hidrocarburos sesquiterpénicos (2,8%)				
49	-	α -humuleno	t	GC-MS, RI ₁
49	54	β -cubebeno	t	GC-MS, RI ₁
53	56	D-germacreno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
56	60	biciclogermacreno	1,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
57	63	δ -cadineno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
58	58	γ -cadineno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
59	61	β -curcumeno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	52	β -cariofileno	0,6	GC-MS, RI ₂
-	62	α -cadineno	t	GC-MS, RI ₂
Sesquiterpenos oxigenados (1,6%)				
71	72	cubenol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
72	65	β -elemol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
74	66	hedicariol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
79	75	I-cadinol	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
80	76	10-epicadinol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
82	77	α -elemol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
83	76	α -cadinol	0,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
68	68	epoxicariofileno	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Otros (0,2%)				
23	-	6-metil-5-hepten-2-ona	t	GC-MS, RI ₁
25	-	acetato 1-octen-3-ol	t	GC-MS, RI ₁
26	-	3-octanol	t	GC-MS, RI ₁
27	-	nonanal	t	GC-MS, RI ₁
28	-	1-octen-3-ol	t	GC-MS, RI ₁

TABLA V-9 (continuación): Aceite esencial de *T. funkii*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁ = Índice de retención en CW-20M. RI₂ = Índice de retención en SE-30. t = trazas (<0.2%).

E) Aceite esencial de Thymus camphoratus.

Contenido en esencia: 0,2% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

El aceite esencial de *T. camphoratus* ha sido investigado por GC y GC-MS.

En la figura IV-14 se muestran los cromatogramas de la esencia obtenidos en columna de CW-20M y SE-30.

Los resultados del análisis cuali y cuantitativo del aceite esencial de *T. camphoratus* se resumen en la tabla V-10.

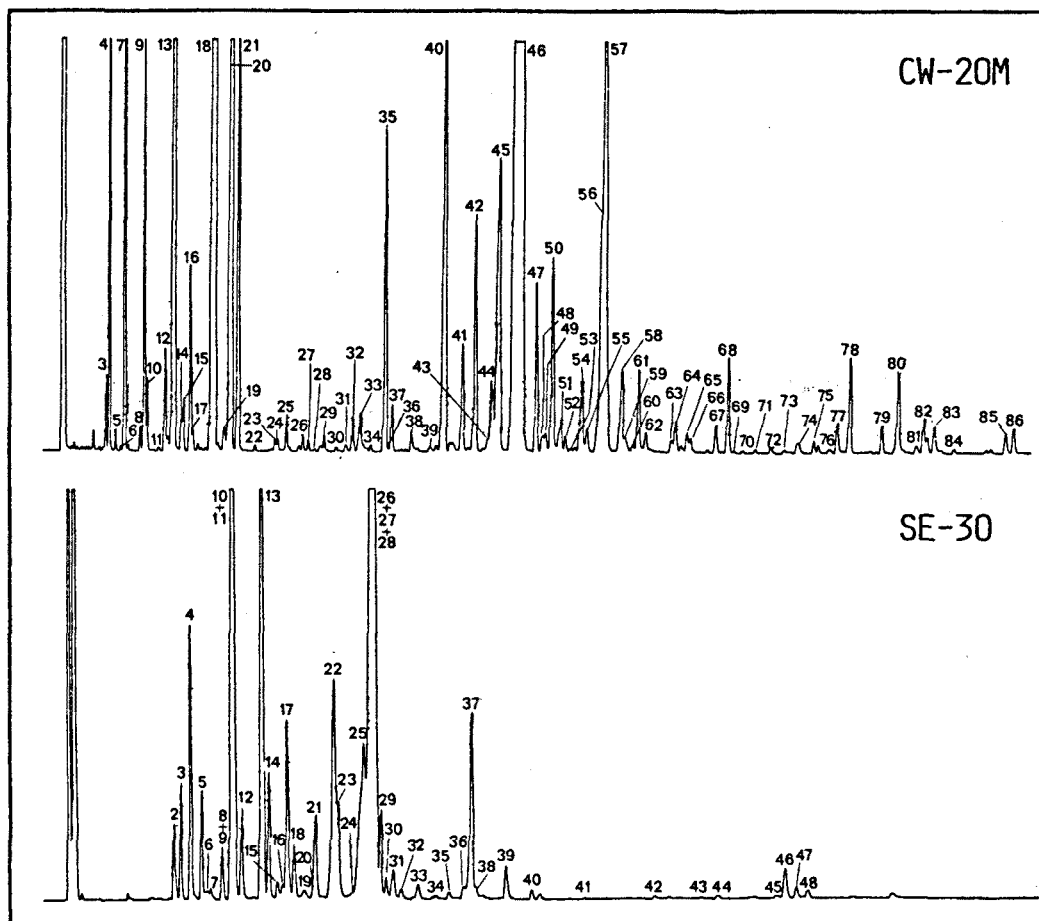


FIGURA V-14: Análisis del aceite esencial de *T. camphoratus* en columna de CW-20M y SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos monoterpénicos (39%)				
4	3	α -pineno	1,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
7	4	canfeno	3,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
8	6	β -pineno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
9	5	sabineno	1,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
11	6	mirreno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
12	8	α -felandreno	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
13	10	α -terpineno	7,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
15	-	limoneno	0,3	GC-MS, RI ₁
16	12	β -felandreno	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
18	13	γ -terpineno	12,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
20	11	p-cimeno	7,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
21	17	terpinoleno	2,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
33	16	α -p-dimetilestireno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Monoterpenos oxigenados (51%)				
35	14	trans-sabineno hidrato	2,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
41	18	cis-sabineno hidrato	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
46	28	terpinen-4-ol	29,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
51	-	trans-pinocarveol	0,3	GC-MS, RI ₁
56	29	α -terpineol	1,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
57	26+27	borneol	6,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
67	33	carveol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
68	-	p-cimen-8-ol	0,6	GC-MS, RI ₁
85	-	timol	0,2	GC-MS, RI ₁
86	39	carvacrol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
38	20	canfolenal	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
49	-	mirtenal	t	GC-MS, RI ₁
53	-	neral	0,2	GC-MS, RI ₁
64	-	aldehído cumínico	0,2	GC-MS, RI ₁
40	22	alcanfor	5,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
59	31	verbenona	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	24	pinocarvona	t	GC-MS, RI ₂
45	37	acetato isobornilo	3,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
40	-	acetato α -terpenilo	0,2	GC-MS, RI ₂

TABLA V-10: Aceite esencial de *T. camphoratus*. Ver leyenda al final de la tabla.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Sesquiterpenos oxigenados (0,65%)				
81	-	β -elemol	t	GC-MS, RI ₁
78	46	epoxicariofileno	0,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Otros (0,4%)				
26	-	acetato 1-octen-3-ilo	t	GC-MS, RI ₁
30	-	butirato hexilo	t	GC-MS, RI ₁
31	31	2-metil-butirato hexilo	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂

TABLA V-10 (continuación): Aceite esencial de *T. camphoratus*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁=Índice de retención en CW-20M. RI₂=Índice de retención en SE-30. t=trazas (<0,2%).

F) Aceite esencial de *Thymus aestivus*.

Contenido en esencia: 1,7% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

Para investigar el aceite esencial de *T. aestivus* se ha utilizado la GC y GC-MS.

Los cromatogramas de la esencia, en columna de CW-20M y SE-30, se ilustran en la figura V-15.

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de los índices de retención, GC-MS y análisis cuantitativo, en CW-20M y SE-30, se resumen en la tabla V-11.

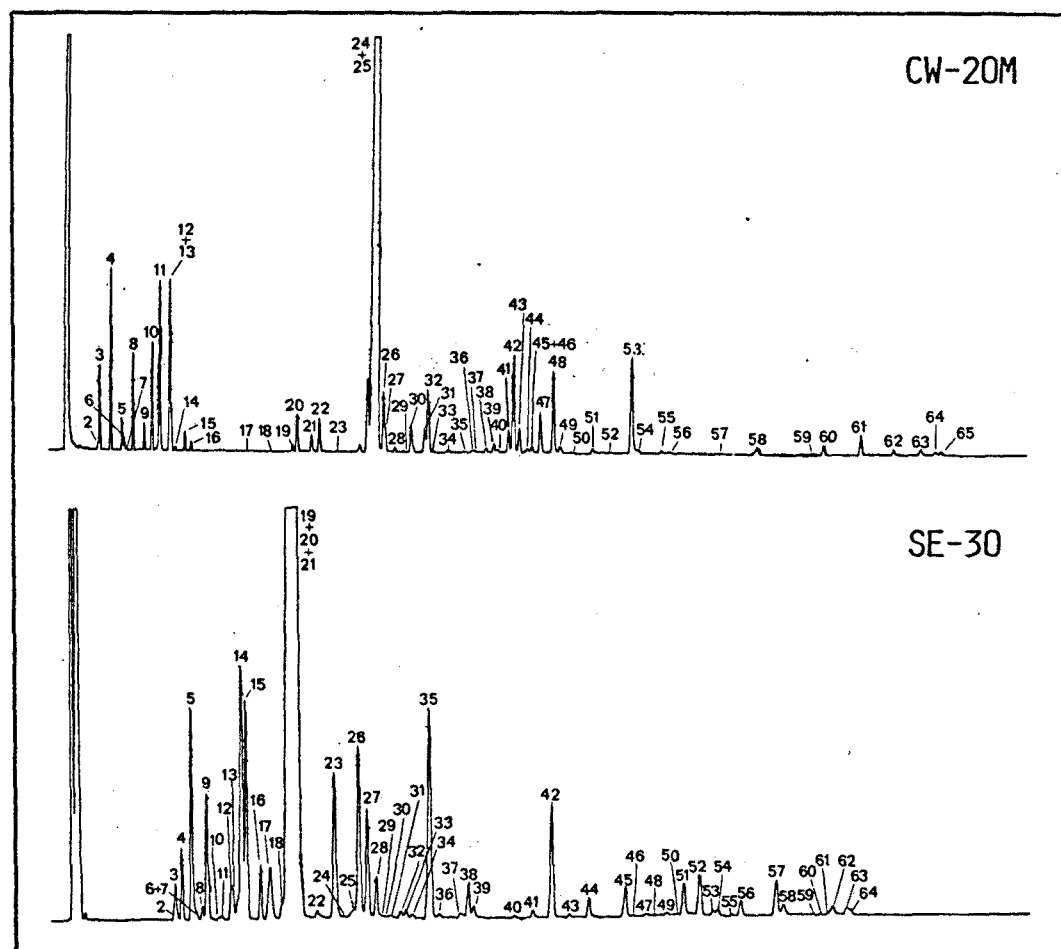


FIGURA V-15: Análisis del aceite esencial de *T. aestivus* en columna de CW-20M y SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos monoterpénicos (11,3%)				
3	4	α -pineno	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
4	5	canfeno	2,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
5	9	β -pineno	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
6	8	sabineno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
8	9	mirreno	1,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	11	α -felandreno	t	GC-MS, RI ₂
9	12	α -terpineno	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
10	14	limoneno	1,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
12	15	cis-ocimeno	2,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
13	16	γ -terpineno	0,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
15	13	p-cimeno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
16	19+20+21	terpinoleno	0,2	GC-MS, RI ₁
Monoterpenos oxigenados (84,5%)				
11	14	cineol 1:8	4,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
21	-	trans-sabineno hidrato	0,4	GC-MS, RI ₁
24+25	19+20+21	linalol	62,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
27	22	cis-sabineno hidrato	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
32	27	terpinen-4-ol	1,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
37	-	lavandulol	t	GC-MS, RI ₁
41	28	α -terpineol	0,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
42	26	borneol	2,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
51	-	nerol	t	GC-MS, RI ₁
53	35	geraniol	3,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
63	39	carvacrol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
20	17	óxido linalol	0,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
22	18	óxido linalol	0,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	10	2-isopropil-5-metil-5-vinil- tetrahidrofurano	t	GC-MS
40	33	neral	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
46	36	geranial	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
24+25	23	alcanfor	2,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
45	30	verbenona	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂

TABLA V-11: Aceite esencial de *T. aestivus*. Ver leyenda al final de la tabla.

Nº PICO CW-20 M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
26	-	acetato linalilo	1,6	GC-MS, RI ₁
30	38	acetato isobornilo	0,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
48	42	acetato geranilo	1,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
56	55	butirato geranilo	t	GC-MS, RI ₁
-	37	acetato lavandulilo	t	GC-MS, RI ₂
-	41	acetato nerilo	t	GC-MS, RI ₂
Hidrocarburos sesquiterpénicos (2,85%)				
32	45	β -cariofileno	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
39	48	α -humuleno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
39	49	β -cubebeno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
43	51	D-germacreno	0,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
47	52	biciclogermacreno	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	54	δ -cadineno	t	GC-MS, RI ₂
49	-	β -sesquifelandreno	0,2	GC-MS, RI ₁
50	53	γ -cadineno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	44	β -burboneno	0,3	GC-MS, RI ₂
-	46	α -cubebeno	t	GC-MS, RI ₂
Sesquiterpenos oxigenados (0,7%)				
59	59	cubenol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
60	56	β -elemol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
62	62	T-cadinol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
64	63	α -elemol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
58	58	epoxicariofileno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Otros (0,3%)				
14	7	3-octanona	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
17	-	3-octanol	t	GC-MS, RI ₁
18	34	2-metil-butirato hexilo	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
19	6	1-octen-3-ol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂

TABLA V-11 (continuación): Aceite esencial de *T. aestivus*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁=Índice de retención en CW-20M. RI₂=Índice de retención en SE-30. t=trazas (<0,2%).

G) Aceite esencial de Thymus glandulosus.

Contenido en esencia: 0,9% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

El aceite esencial de *T. glandulosus* se ha estudiado, también, por GC y GC-MS.

En la figura V-16 se muestran los cromatogramas de la esencia obtenidos en columna de CW-20M y SE-30.

En la tabla V-12 se exponen los resultados del análisis cuali y cuantitativo del aceite esencial de *T. glandulosus*.

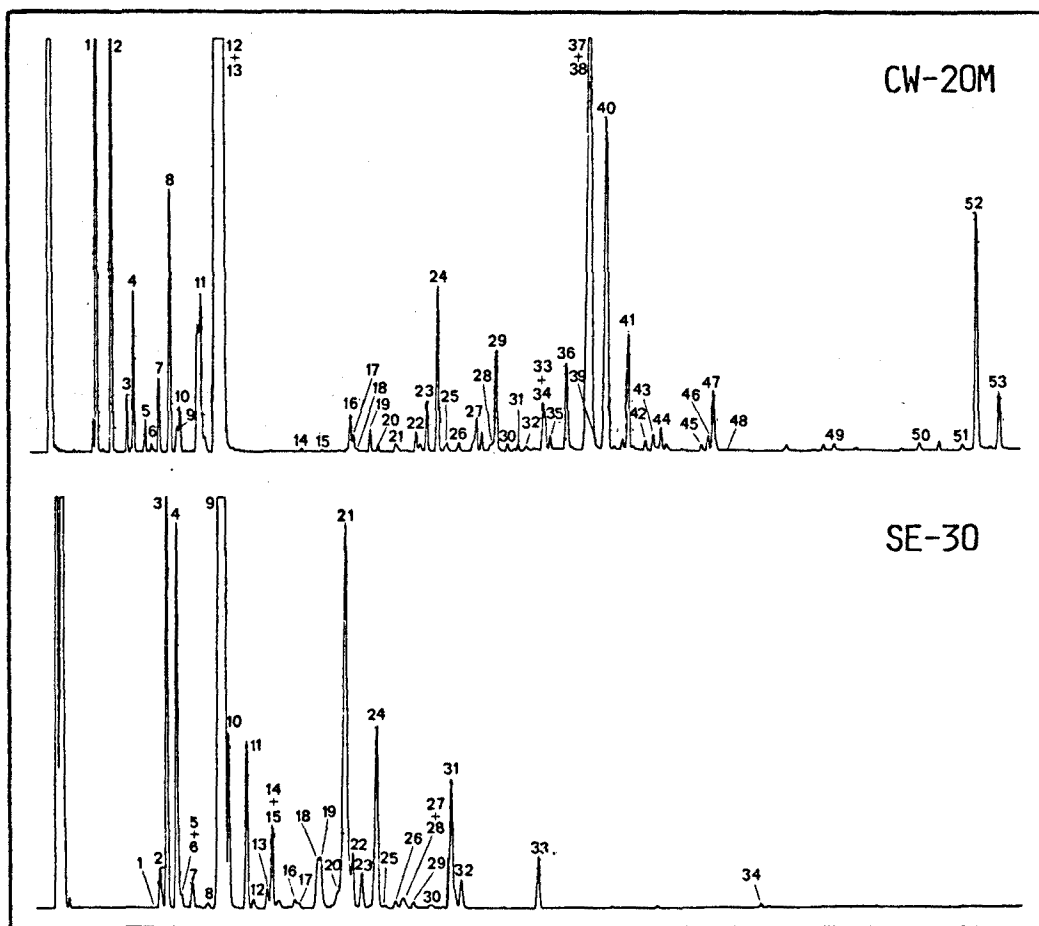


FIGURA V-16: Análisis del aceite esencial de *T. glandulosus* en columna de CW-20M y SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos monoterpénicos (76,4%)				
1	3	α -pineno	7,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
2	4	canfeno	5,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
3	7	β -pineno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
5	7	mirreno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
6	-	α -felandreno	t	GC-MS, RI ₁
-	8	Δ^3 -careno	t	GC-MS, RI ₂
7	9	α -terpineno	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
8	10	limoneno	1,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
9	-	β -felandreno	0,2	GC-MS, RI ₁
11	11	γ -terpineno	2,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
12+13	9	p-cimeno	58,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
12+13	14	terpinoleno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
17	13	α -p-dimetilestireno	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Monoterpenos oxigenados (22,5%)				
10	10	cineol 1:8	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
28	28	carvacrol metil éter	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
20	12	trans-sabineno hidrato	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
24	15	linalol	1,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
29	22	terpinen-4-ol	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
34	-	trans-pinocarveol	0,2	GC-MS, RI ₁
37	23	α -terpineol	0,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
38	21	borneol	8,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
45	25	carveol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
46	29	geraniol	0,1	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
47	-	p-cimen-8-ol	0,5	GC-MS, RI ₁
52	31	tímol	2,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
53	32	carvacrol	0,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
18	-	óxido linalol	t	GC-MS, RI ₁
21	-	óxido linalol	t	GC-MS, RI ₁
22	16	canfolenal	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
32	-	mirtenal	t	GC-MS, RI ₁
44	27	aldehído cumínico	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂

TABLA V-12: Aceite esencial de *T. glandulosus*. Ver leyenda al final de la tabla.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
-	18	alcanfor	0,8	GC-MS, RI ₂
30	-	dihidrocarvona	t	GC-MS, RI ₁
40	24	verbenona	4,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
48	30	isopiperitenona	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	20	pinocarvona	t	GC-MS, RI ₂
27	-	acetato isobornilo	0,3	GC-MS, RI ₁
33	19	acetato mirtenilo	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
41	33	acetato geranilo	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Otros (0,45%)				
14	-	3-octanol	t	GC-MS, RI ₁
16	5	1-octen-3-ol	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	6	3-octanona	t	GC-MS, RI ₂

TABLA V-12 (continuación): Aceite esencial de *T. glandulosus*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁=Índice de retención en CW-20M. RI₂=Índice de retención en SE-30. t=traza^s (< 0,2%).

H) Aceite esencial de *Thymus baeticus*.

Contenido en esencia: 1,0% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

La investigación del aceite esencial de *T. baeticus* se ha llevado a cabo por GC y GC-MS.

Los cromatogramas de la esencia obtenidos en columna de CW-20M y SE-30 se ilustran en la figura V-17.

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de los índices de retención, GC-MS y análisis cuantitativo, en CW-20M y SE-30, se resumen en la tabla V-13.

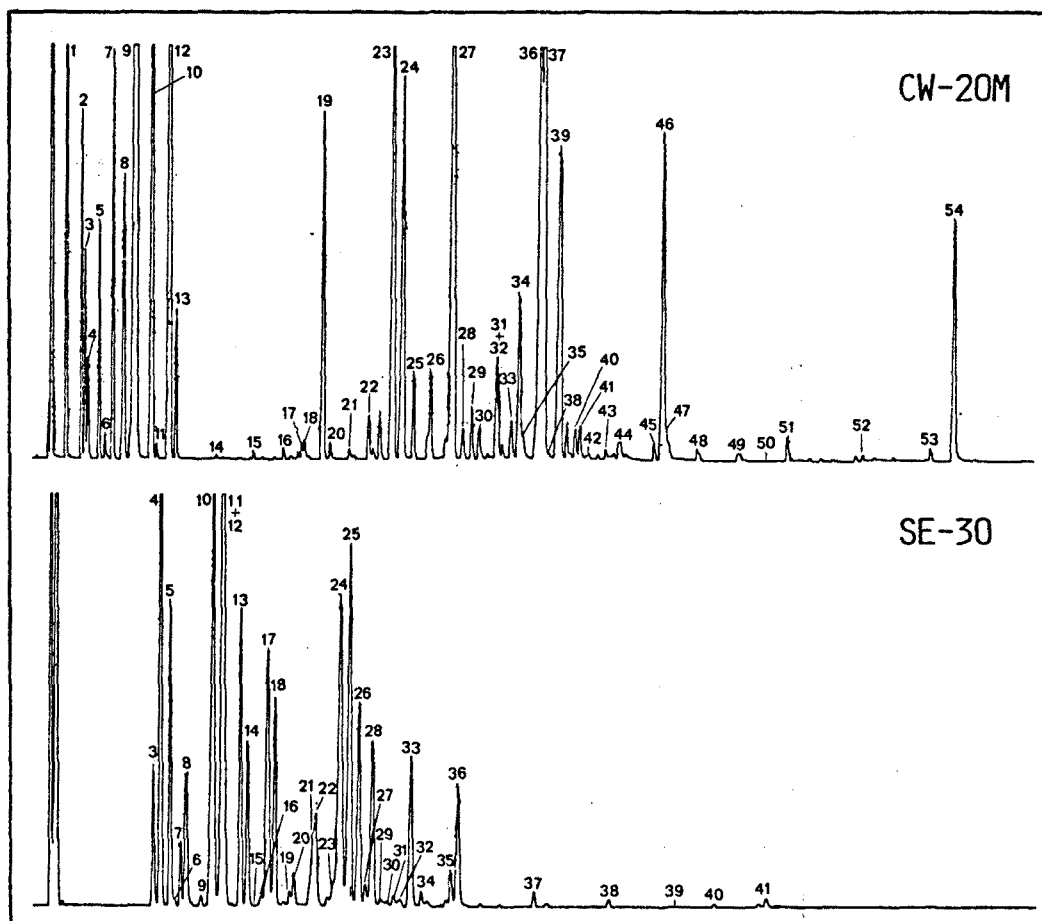


FIGURA V-17: Análisis del aceite esencial de *T. baeticus* en columna de CW-20M y SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos monoterpénicos (37,3%)				
0	4	α -pineno	10,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
1	5	canfeno	3,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
2	8	β -pineno	2,1	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
3	7	sabineno	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
5	8	mirreno	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
6	9	α -felandreno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
7	10	α -terpineno	2,1	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
8	11	limoneno	2,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
10	13	γ -terpineno	4,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
12	10	p-cimeno	8,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
13	16	terpinoleno	0,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	12	cis-ocimeno	2,1	GC-MS, RI ₂
Monoterpenos oxigenados (60%)				
9	11	cineol 1:8	14,4	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
19	14	trans-sabineno hidrato	2,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
23	17	linalol	5,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
24	18	cis-sabineno hidrato	3,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
27	25	terpinen-4-ol	7,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
32	-	trans-pinocarveol	t	GC-MS, RI ₁
36	26	α -terpineol	4,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
37	24	borneol	7,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
44	30	nerol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
45	29	carveol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
46	33	geraniol	3,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
53	-	tímol	t	GC-MS, RI ₁
54	36	carvacrol	2,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
18	-	óxido linalol	0,2	GC-MS, RI ₁
20	-	óxido linalol	t	GC-MS, RI ₁
21	-	canfolenal	t	GC-MS, RI ₁
35	31	neral	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	34	geranial	0,3	GC-MS, RI ₂

TABLA V-13: Aceite esencial de *T. baeticus*. Ver leyenda al final de la tabla.

<u>Nº PICO</u> <u>CW-20M</u>	<u>Nº PICO</u> <u>SE-30</u>	<u>COMPONENTES</u>	<u>%</u>	<u>MÉTODOS DE</u> <u>IDENTIFICACIÓN</u>
28	27	dihidrocarvona	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
30	-	dihidrocarvona	0,3	GC-MS, RI ₁
34	21	alcanfor	1,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
39	28	verbenona	3,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
41	32	carvona	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	23	pinocarvona	0,2	GC-MS, RI ₂
26	35	acetato isobornilo	0,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
31	22	acetato mirtenilo	1,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
41	37	acetato geranilo	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
49	40	butirato geranilo	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Hidrocarburos sesquiterpénicos (0,2%)				
	38	β -cariofileno	0,2	GC-MS, RI ₂
Sesquiterpenos oxigenados (0,2%)				
51	41	epoxicariofileno	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Otros (0,15%)				
11	-	3-octanona	t	GC-MS, RI ₁
15	-	3-octanol	t	GC-MS, RI ₁
17	6	1-octen-3-ol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂

TABLA V-13 (continuación): Aceite esencial de *T. baeticus*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁=Índice de retención en CW-20M. RI₂=Índice de retención en SE-30. t=trazas (<0,2%).

I) Aceite esencial de Thymus willkomii.

Contenido en esencia: 0,9% (v/p).

Análisis cuali y cuantitativo:

El aceite esencial de *T. willkomii* ha sido investigado por GC y GC-MS.

La figura V-18 muestra los cromatogramas de la esencia obtenidos en columna de CW-20M y SE-30.

Los resultados del análisis cuali y cuantitativo del aceite esencial de *T. willkomii* se resumen en la tabla V-14.

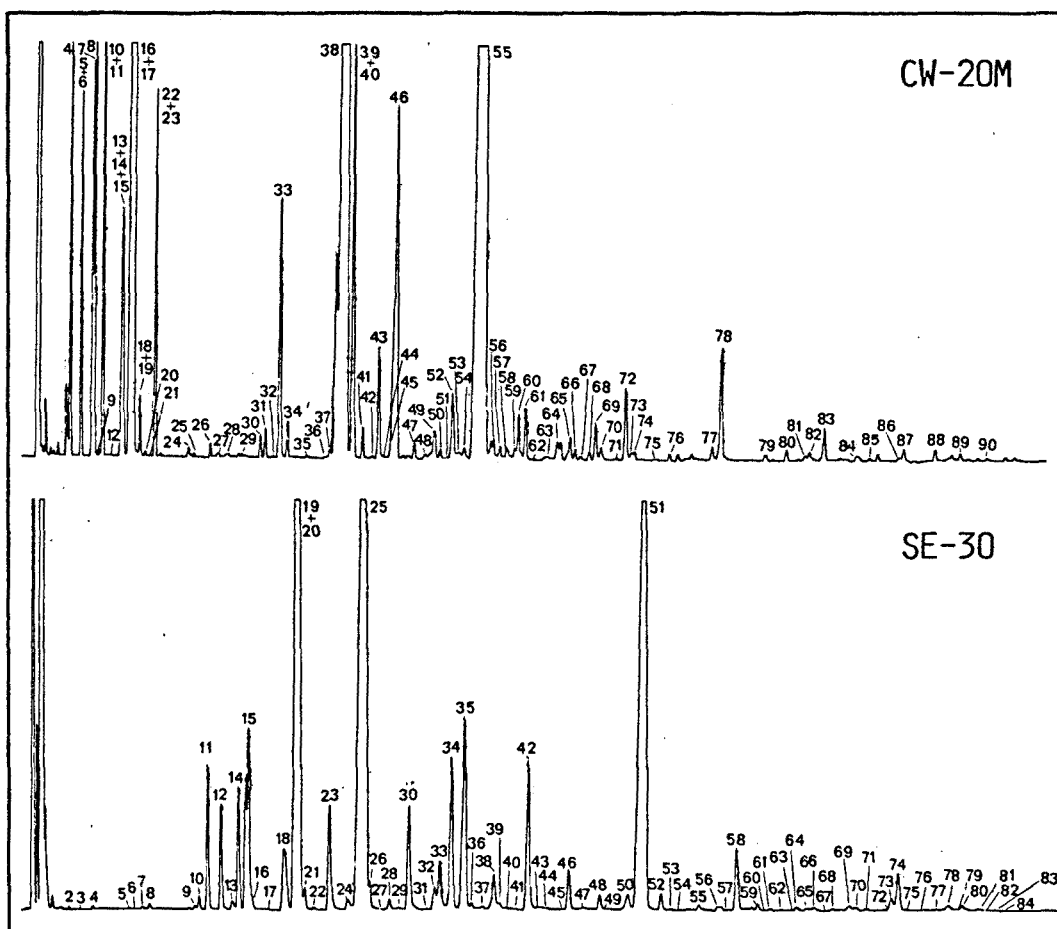


FIGURA V-18: Análisis del aceite esencial de *T. willkomii* en columna de CW-20M y SE-30. Condiciones analíticas: ver apartado V.1.4.B.

Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
Hidrocarburos monoterpénicos (12,5%)				
4	11	α -pineno	1,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
5+6	12	canfeno	1,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
7+8	15	β -pineno	1,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
9	14	sabineno	1,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
10+11	15	mirreno	2,1	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
12	-	α -felandreno	t	GC-MS, RI ₁
-	17	Δ^1 -careno	t	GC-MS, RI ₂
13+14	18	α -terpineno	0,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
15	19	limoneno	1,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
18	20	cis-ocimeno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
19	22	γ -terpineno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
22	18	p-cimeno	0,9	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
23	-	terpinoleno	0,6	GC-MS, RI ₁
Monoterpenos oxigenados (80,7%)				
16+17	19	cineol 1:8	20,0	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
33	23	trans-sabineno hidrato	1,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
38	25	linalol	25,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
40	26	cis-sabineno hidrato	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
46	34	terpinen-4-ol	3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
50	-	trans-pinocarveol	t	GC-MS, RI ₁
51	-	lavandulol	t	GC-MS, RI ₁
-	33	borneol	1,2	GC-MS, RI ₂
62	40	nerol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
68	-	carveol	t	GC-MS, RI ₁
69	39	geraniol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
31	24	óxido linalol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
34	-	óxido linalol	0,2	GC-MS, RI ₁
48	-	mirtenal	t	GC-MS, RI ₁
54	37	neral	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	27	canfolenal	t	GC-MS, RI ₂
-	43	geranial	t	GC-MS, RI ₂
38	30	alcanfor	1,7	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	31	pinocarvona	t	GC-MS, RI ₂
-	41	carvona	t	GC-MS, RI ₂
39	42	acetato linalilo	2,5	GC-MS, RI ₁ , RI ₂

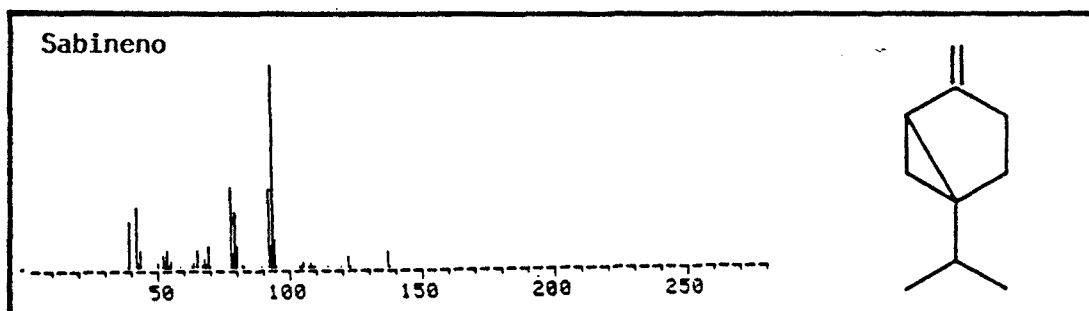
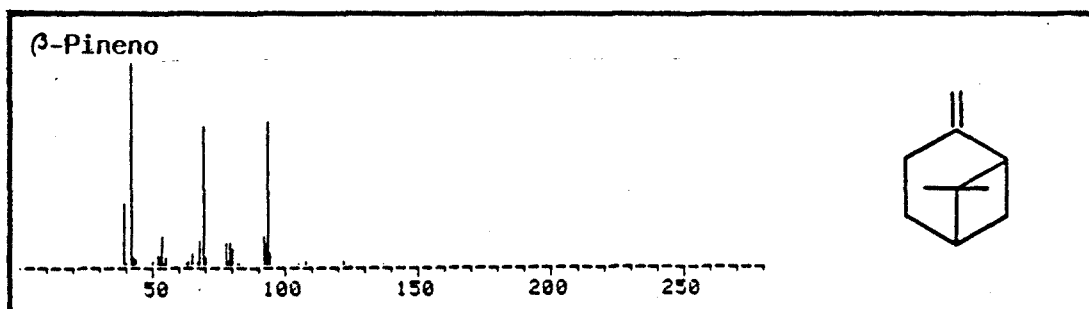
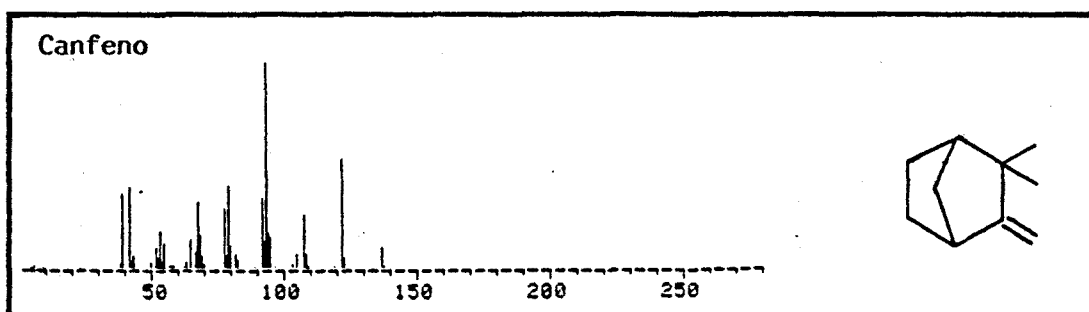
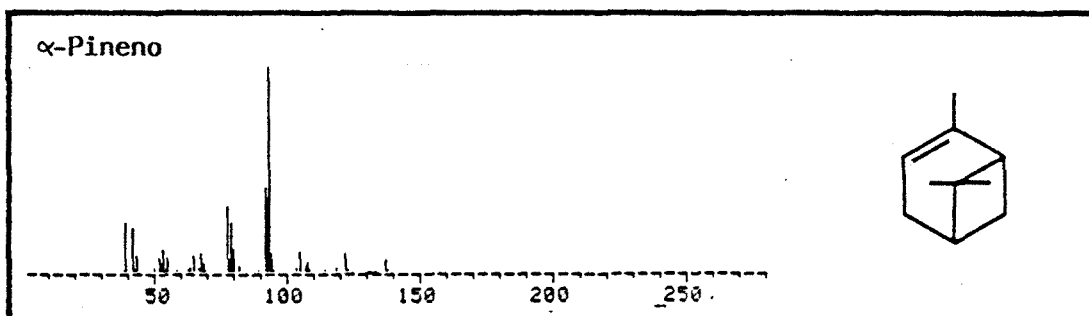
TABLA V-14: Aceite esencial de *T. willkomii*. Ver leyenda al final de la tabla.

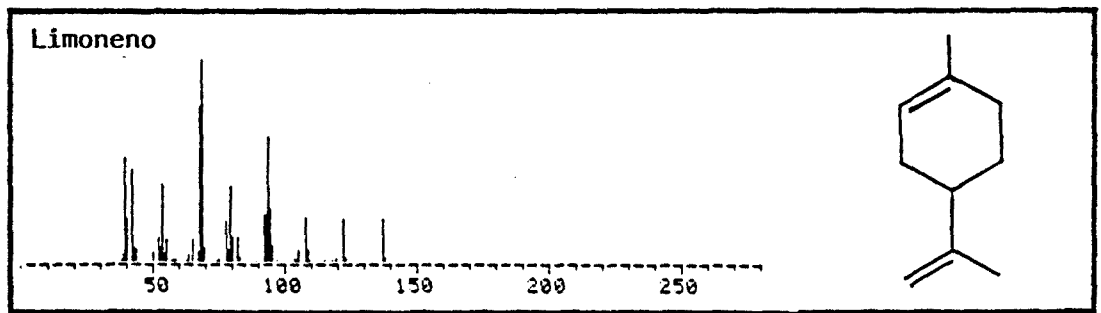
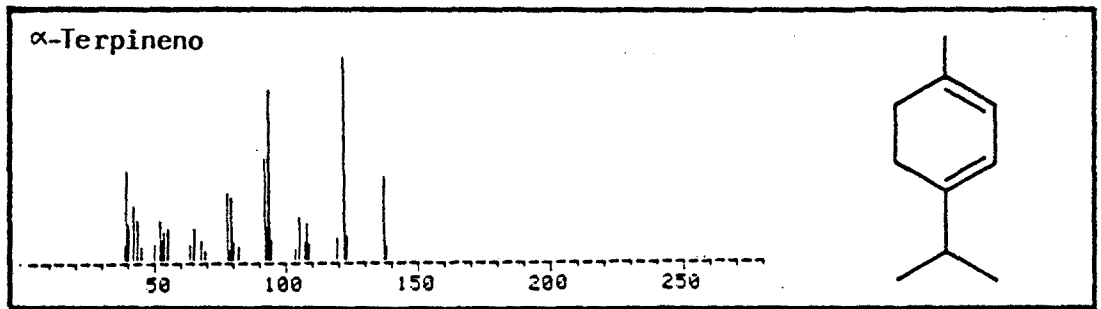
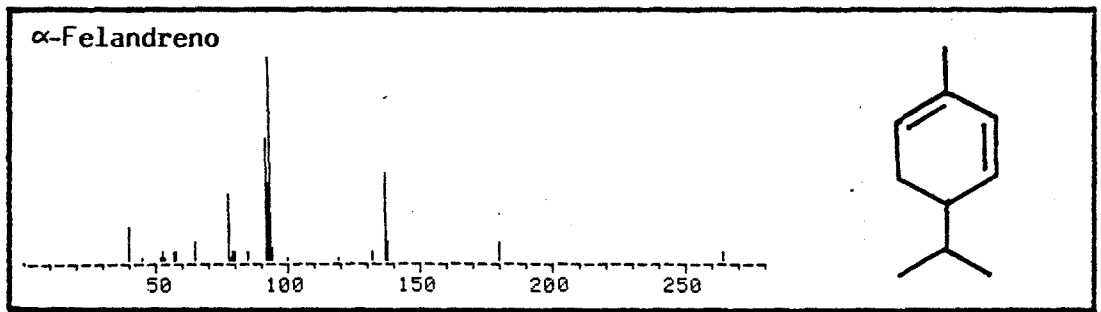
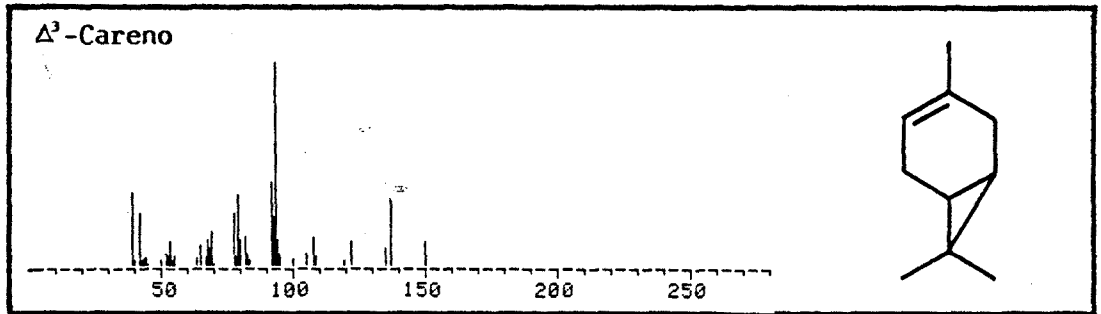
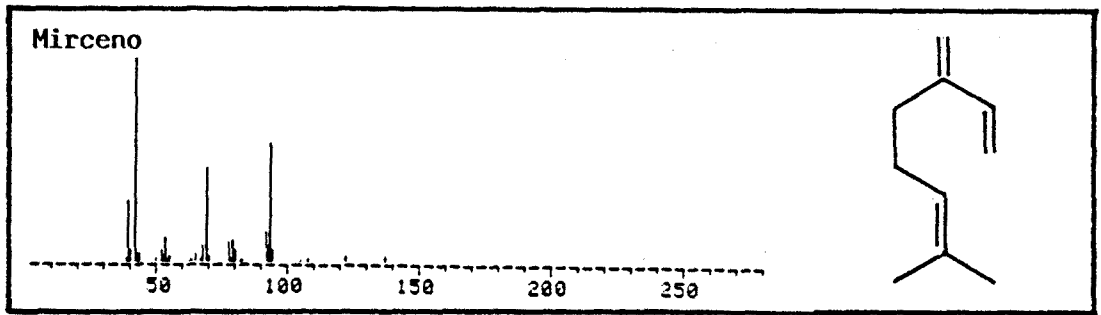
Nº PICO CW-20M	Nº PICO SE-30	COMPONENTES	%	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN
43	46	acetato isobornilo	0,6	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
44	45	acetato lavandulilo	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
55	51	acetato α -terpenilo	22,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
60	52	acetato geranilo	0,3	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
64	-	isobutirato geranilo	t	GC-MS, RI ₁
65	59	propionato geranilo	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
73	69	butirato geranilo	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	57	propionato citronelilo	t	GC-MS, RI ₂
-	60	butirato bornilo	t	GC-MS, RI ₂
Hidrocarburos sesquiterpénicos (1,3%)				
-	58	β -cariofileno	1,0	GC-MS, RI ₂
-	61	α -humuleno	t	GC-MS, RI ₂
-	62	β -cubebeno	t	GC-MS, RI ₂
56	64	D-germacreno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
59	66	biciclogermacreno	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
-	67	α -cadineno	t	GC-MS, RI ₂
-	68	δ -cadineno	t	GC-MS, RI ₂
Sesquiterpenos oxigenados (1,4%)				
81	70	β -elemol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
84	-	T-cadinol	t	GC-MS, RI ₁
85	80	10-epicadinol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
86	77	α -elemol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
87	-	α -cadinol	t	GC-MS, RI ₁
-	71	hedicariol	t	GC-MS, RI ₂
-	72	δ -cadinol	t	GC-MS, RI ₂
-	73	epoxiisocariofileno	0,2	GC-MS, RI ₂
78	74	epoxicariofileno	0,8	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
Otros (0,4%)				
20	-	3-octanona	t	GC-MS, RI ₁
25	7	hexanol	t	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
26	-	acetato 3-octenilo	t	GC-MS, RI ₁
29	-	butirato hexilo	t	GC-MS, RI ₁
30	13	1-octen-3-ol	0,2	GC-MS, RI ₁ , RI ₂
32	-	butirato cis-3-hexenilo	t	GC-MS, RI ₁

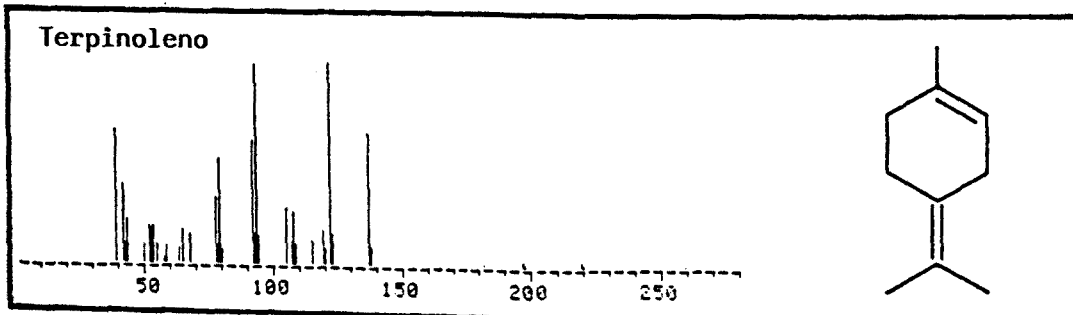
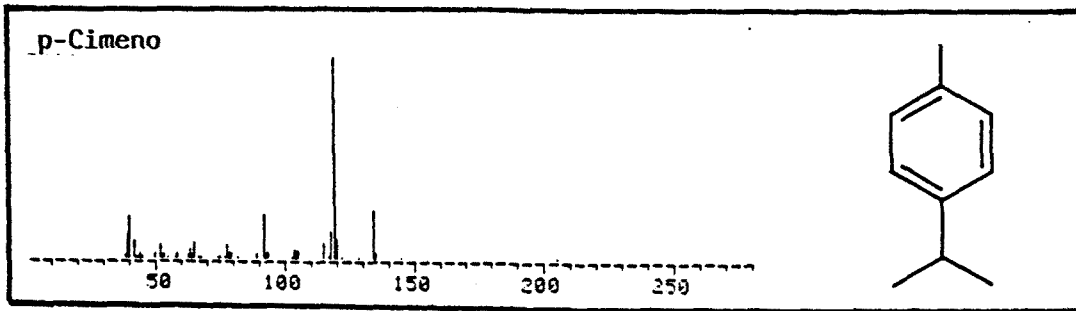
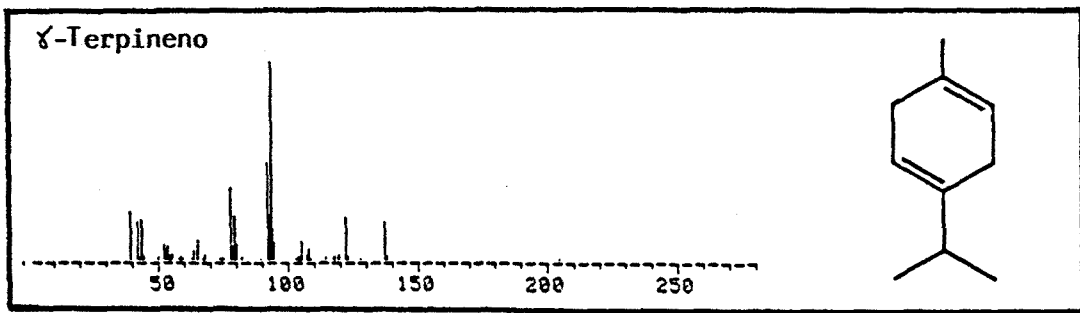
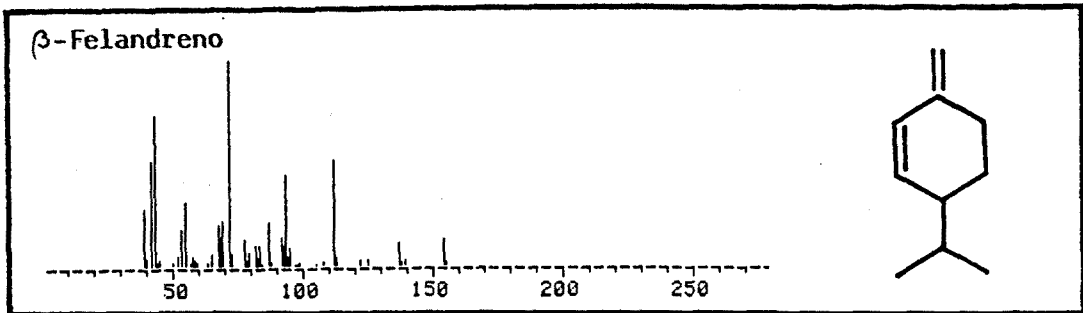
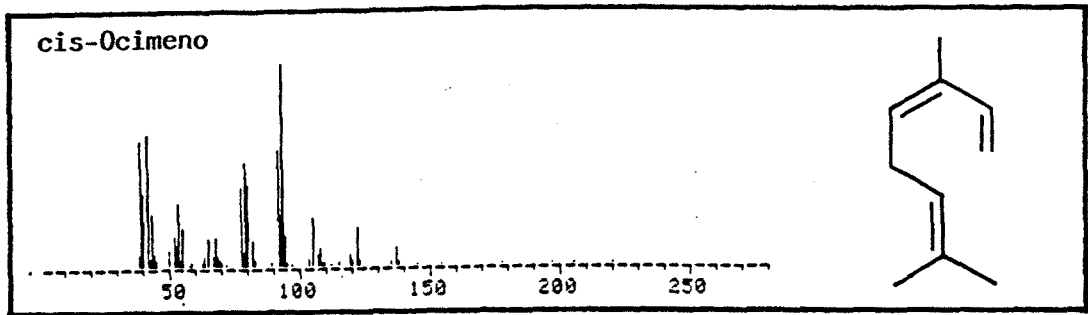
TABLA V-14 (continuación): Aceite esencial de *T. willkomii*. Resultados obtenidos en el análisis cuali y cuantitativo. RI₁=Índice de retención en CW-20M. RI₂=Índice de retención en SE-30. t=trazas (<0,2%).

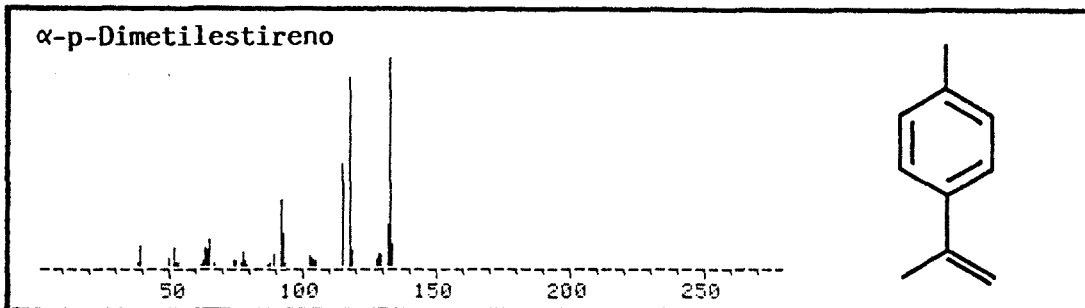
V.2.3.- ESPECTROS DE MASAS Y FÓRMULAS DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS.

A) Hidrocarburos monoterpénicos.

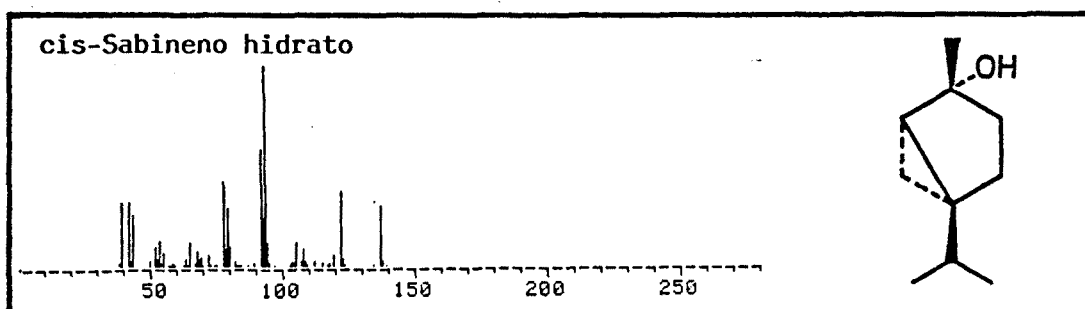
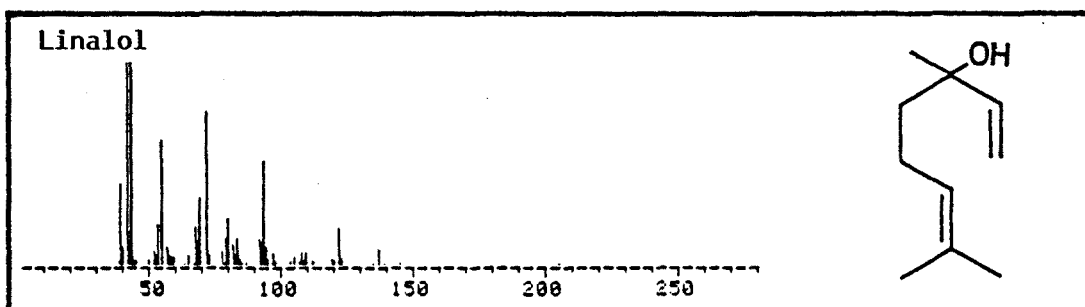
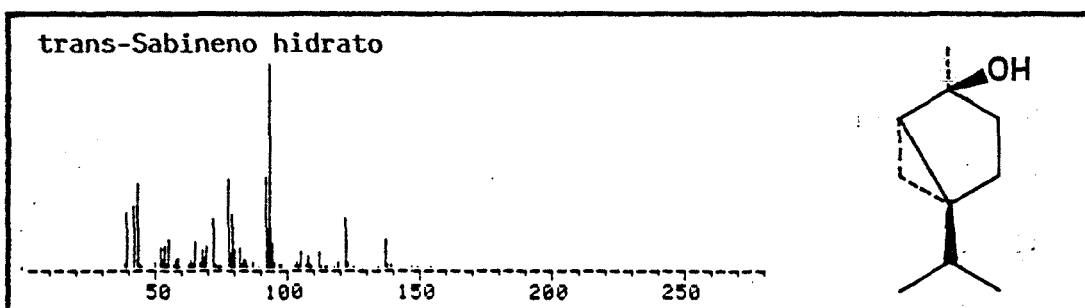


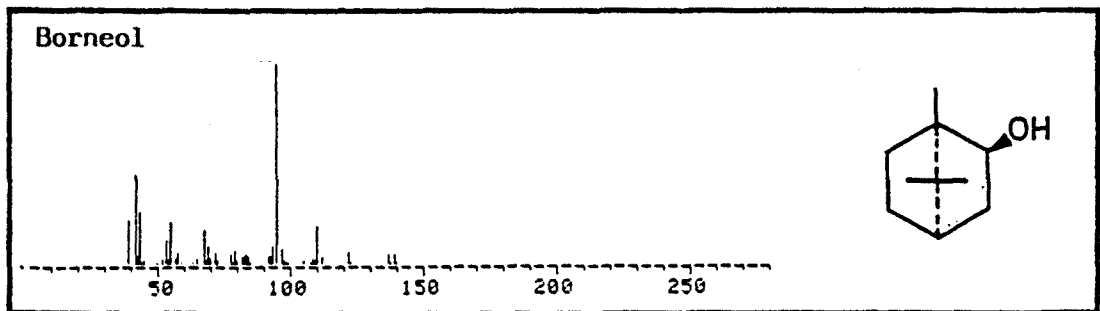
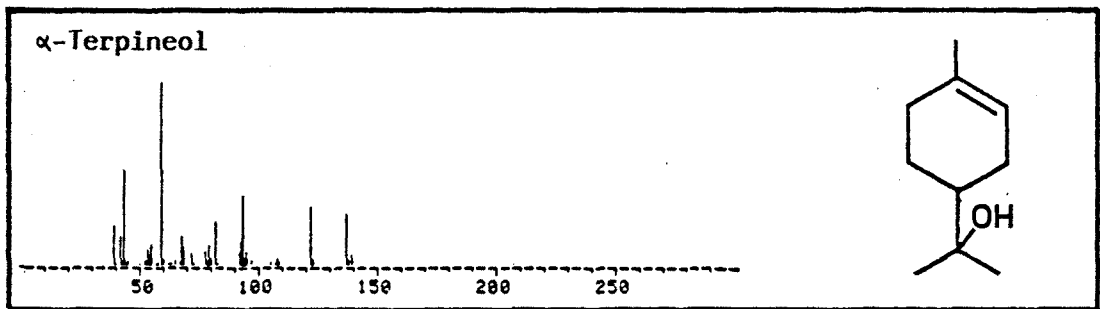
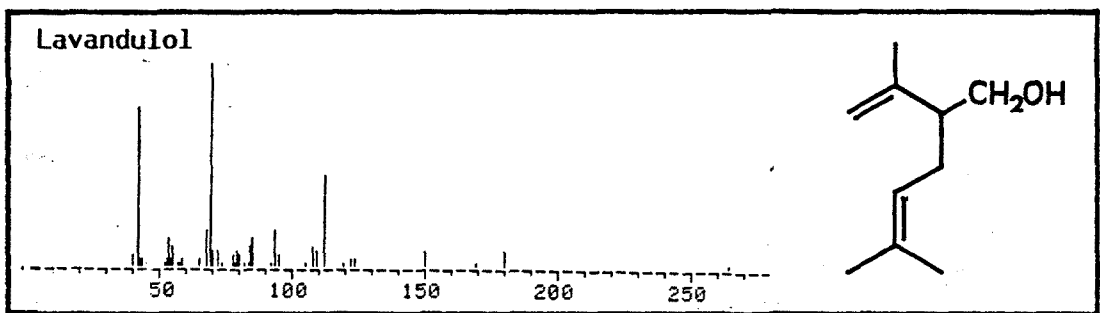
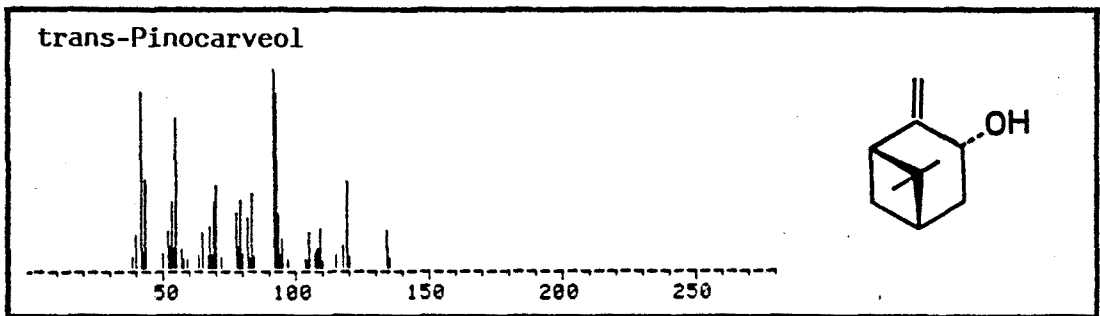
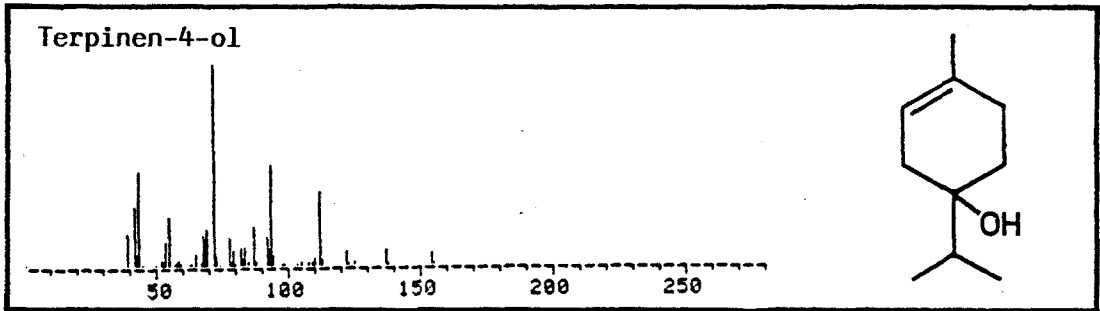


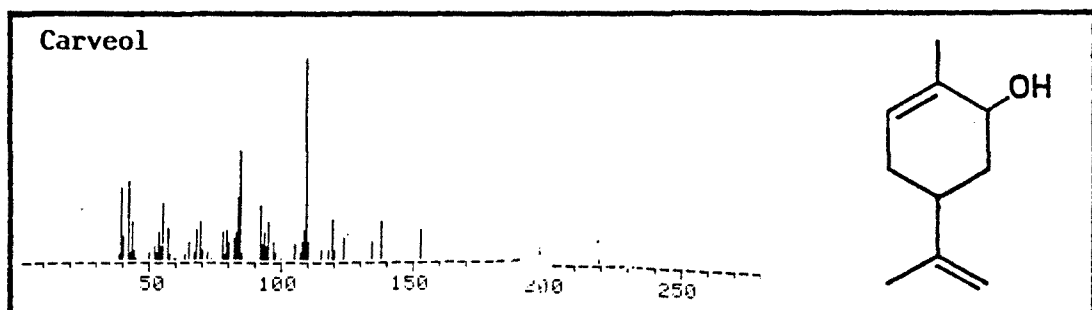
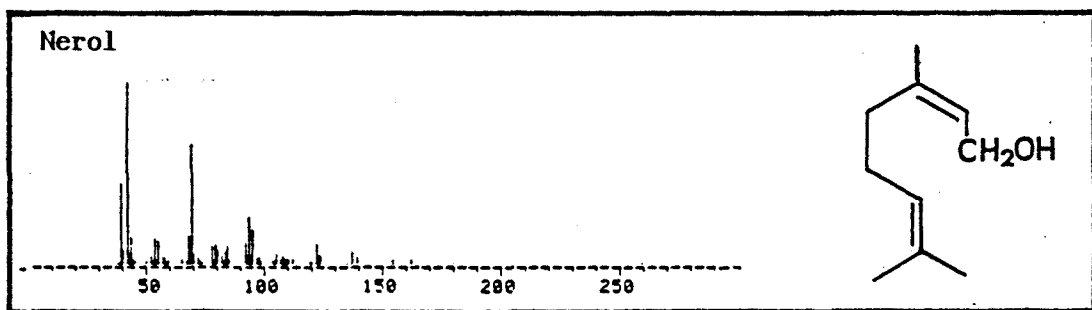
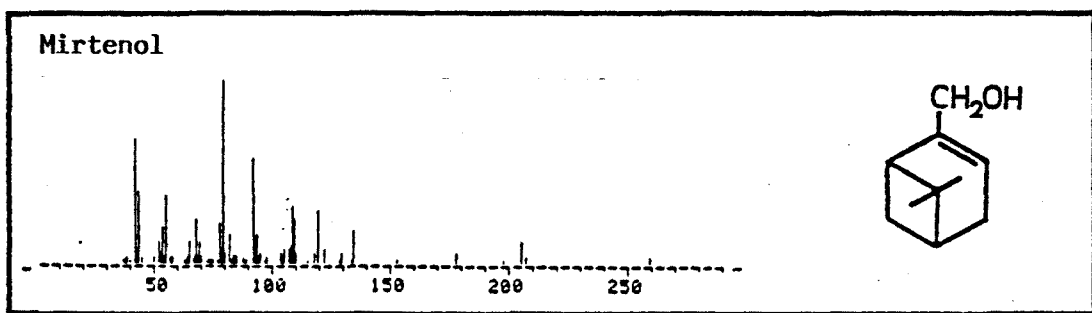
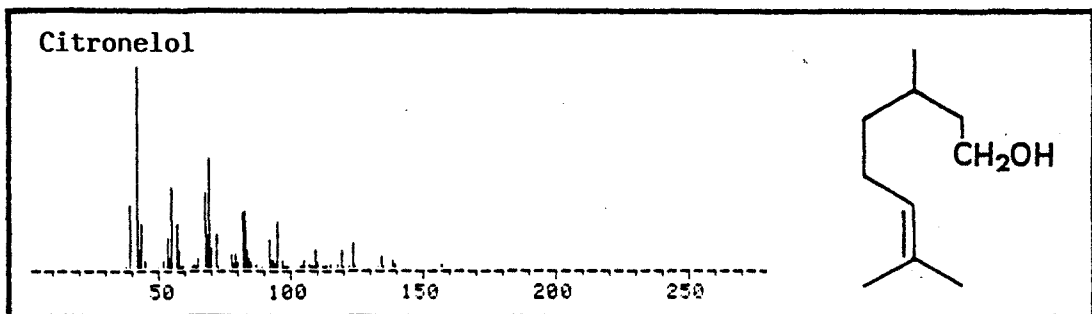
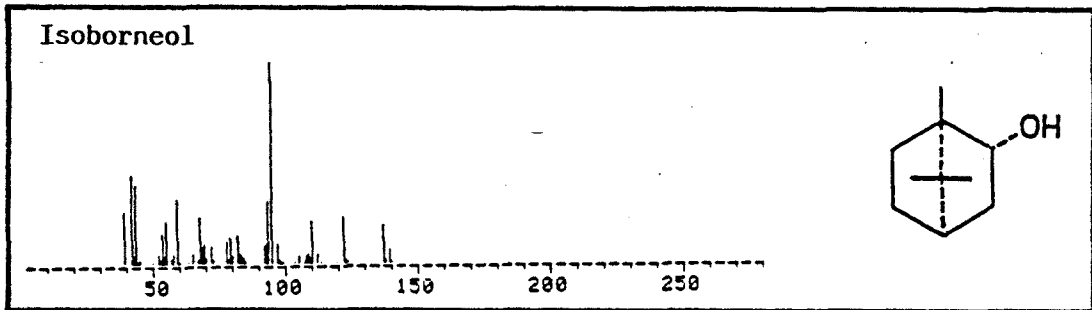


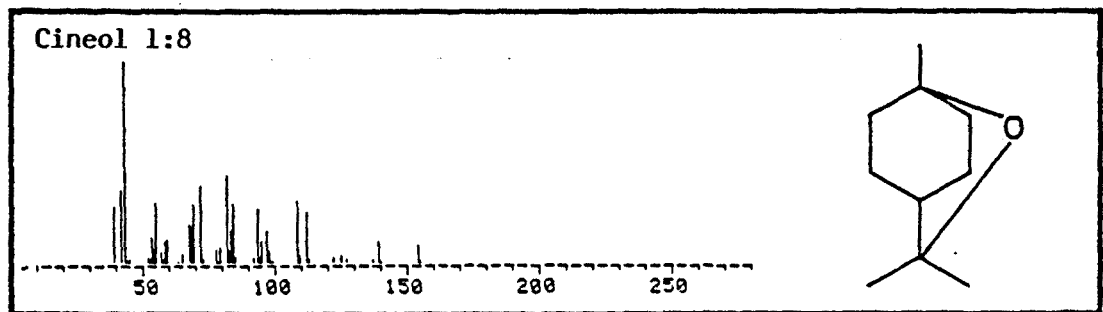
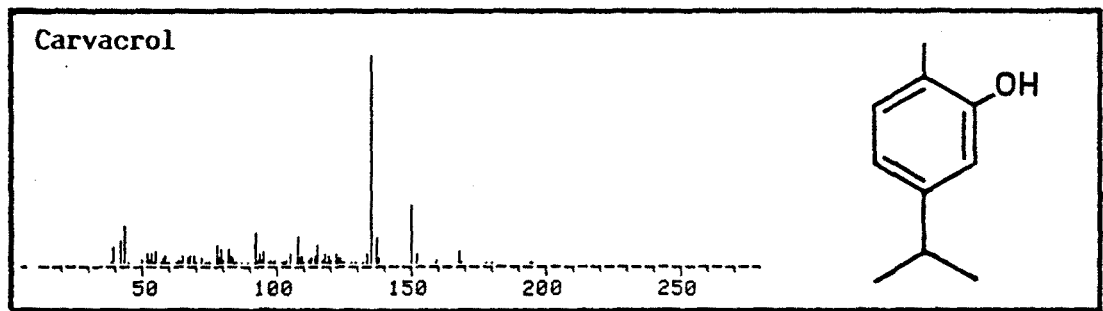
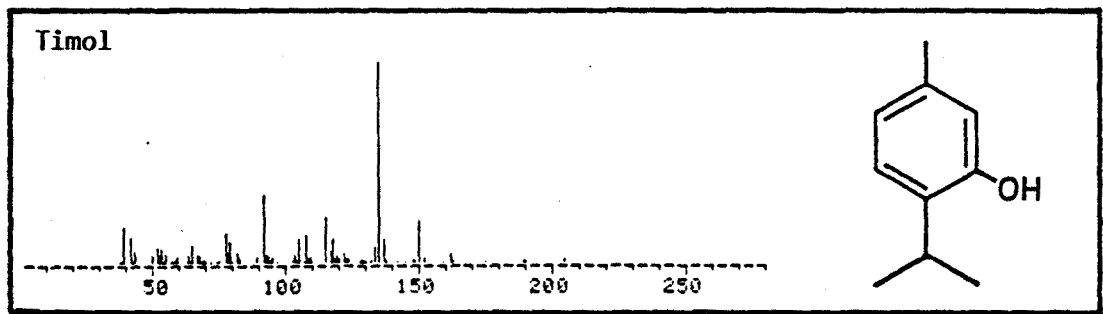
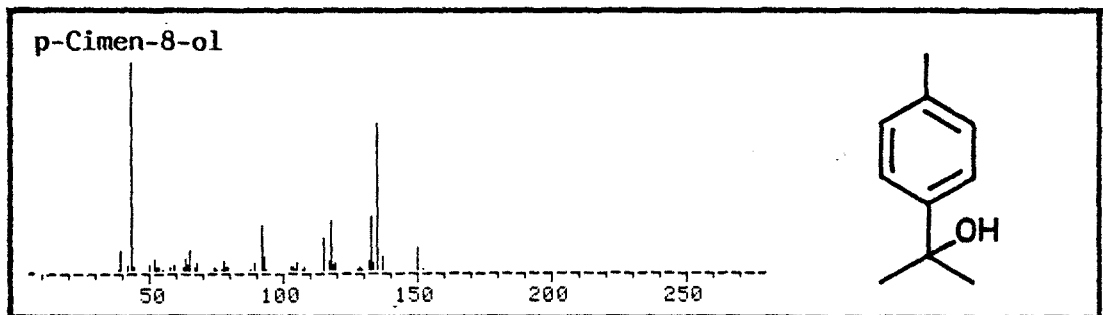
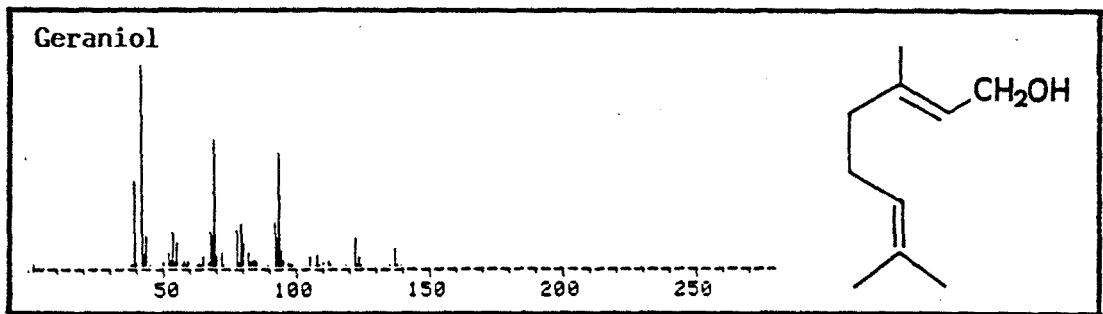


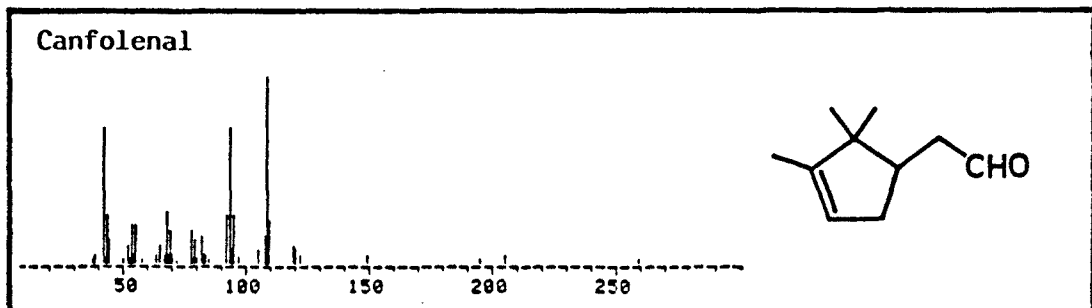
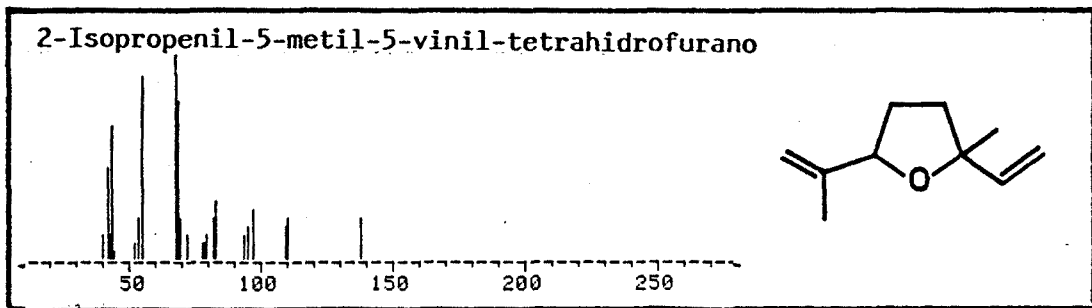
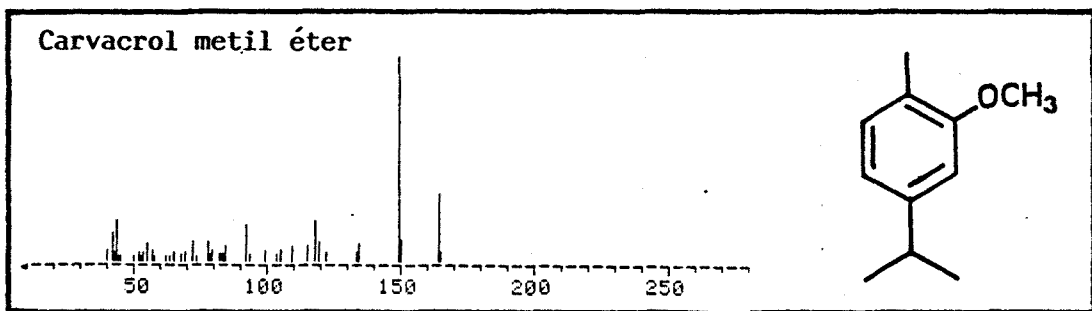
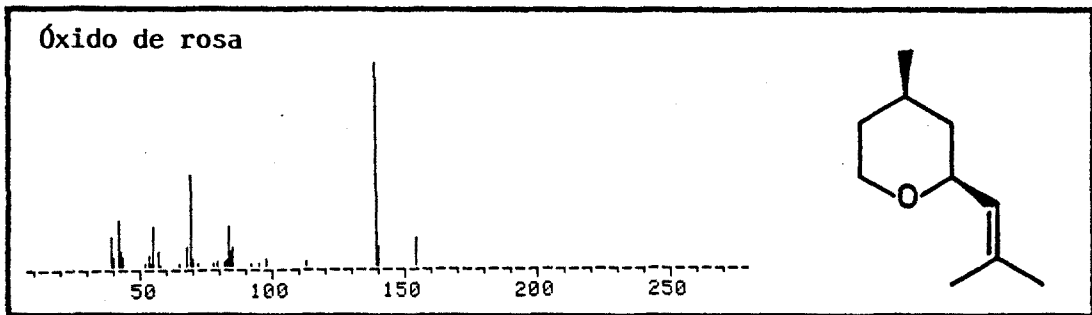
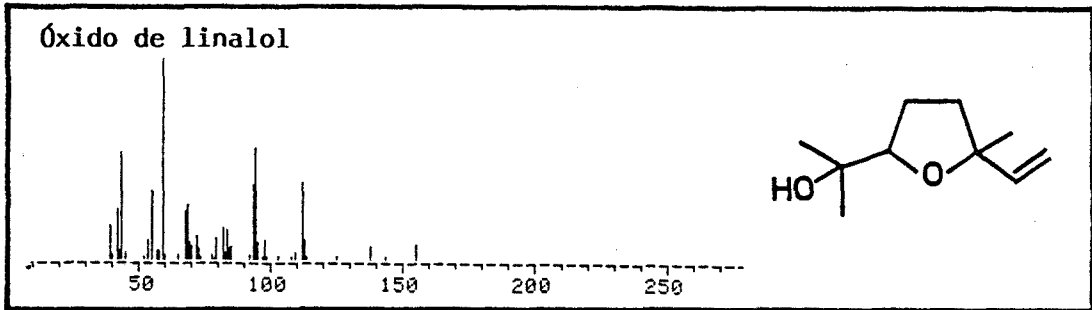
B) Monoterpenos oxigenados.

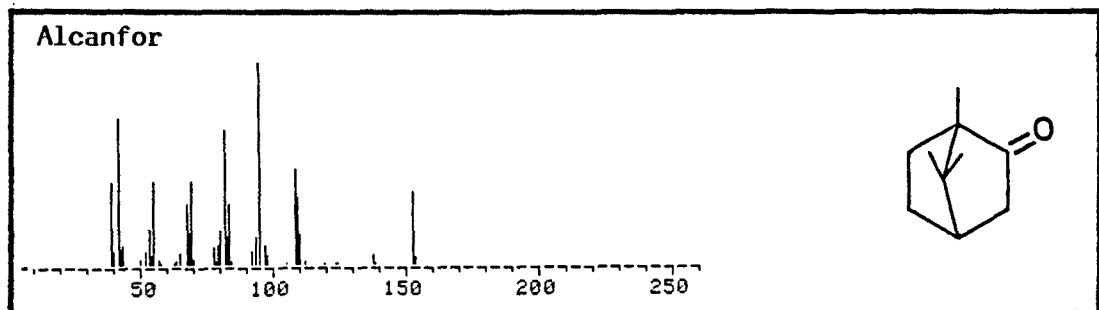
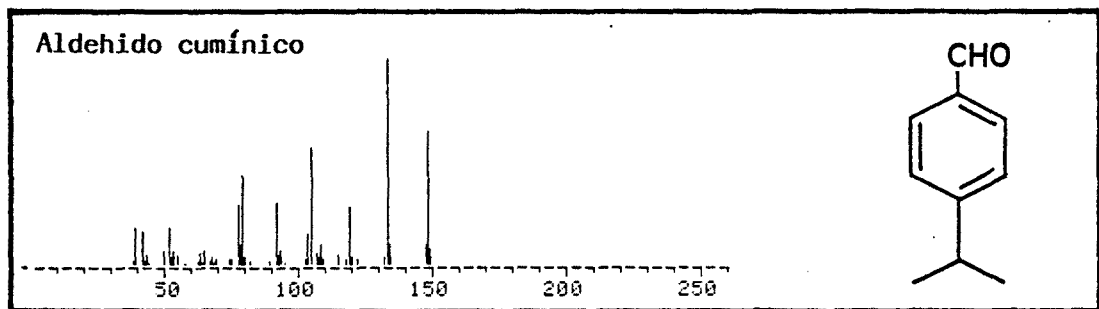
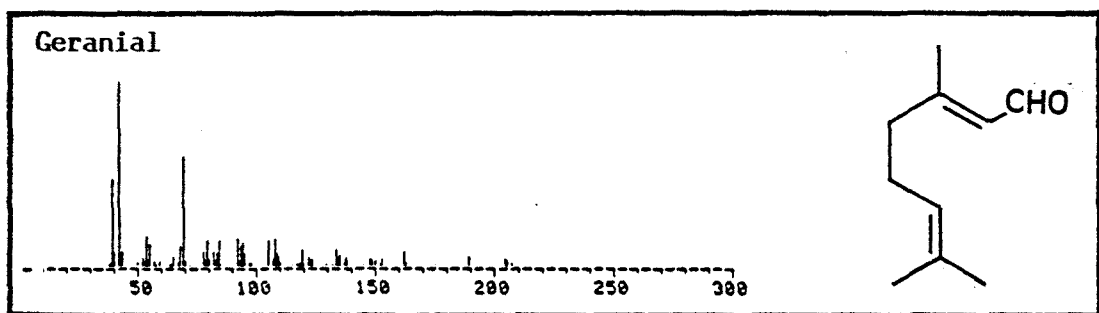
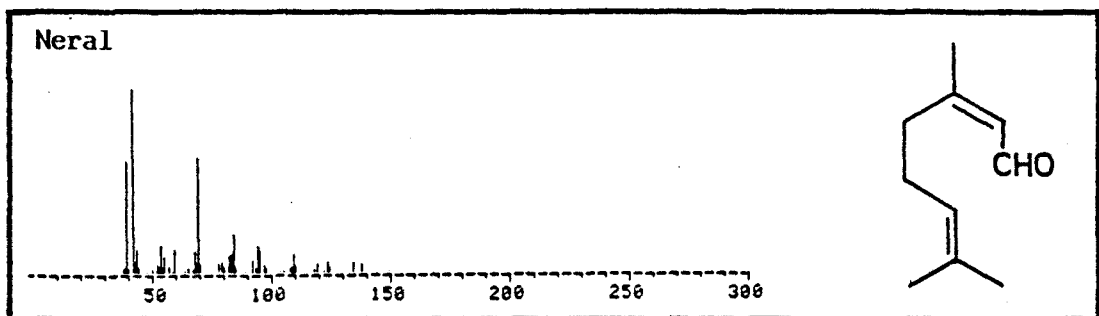
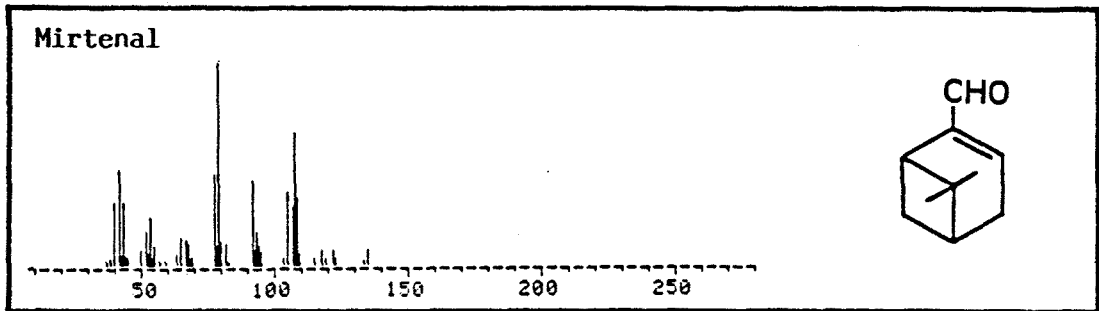


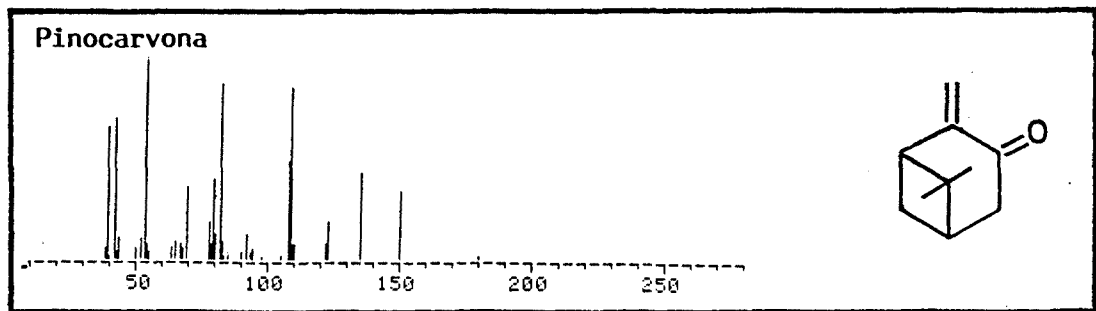
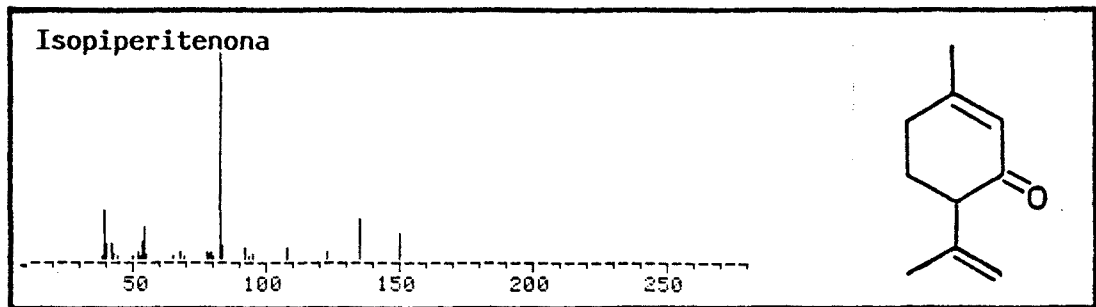
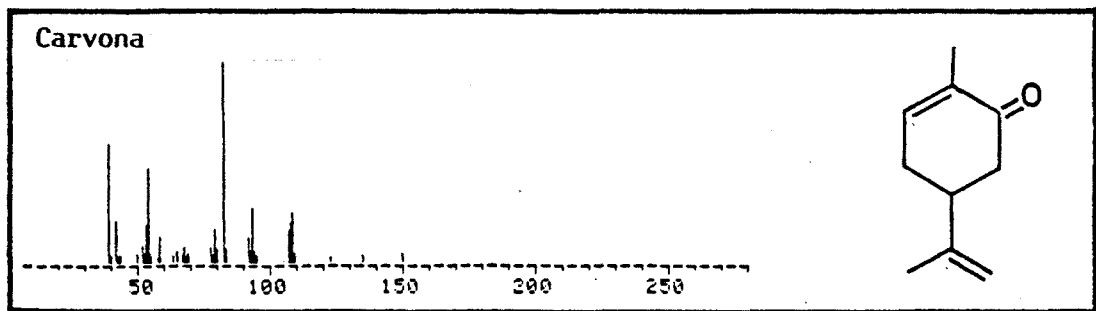
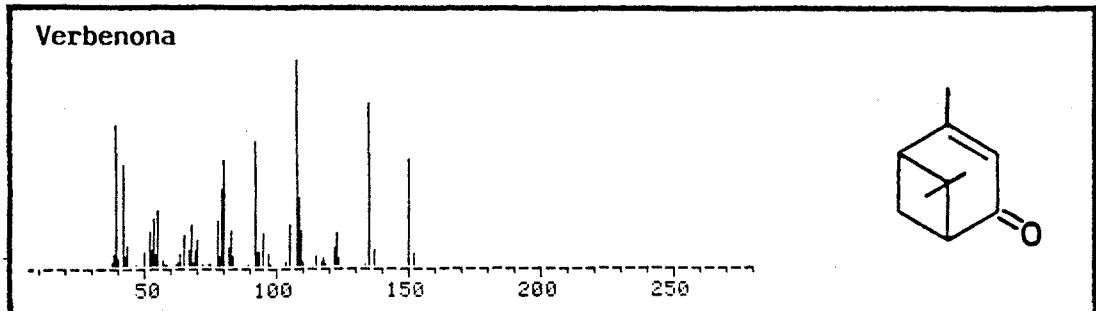
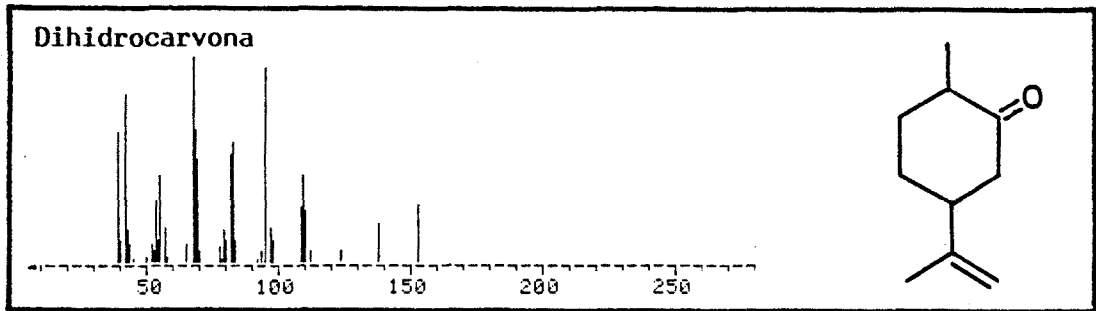


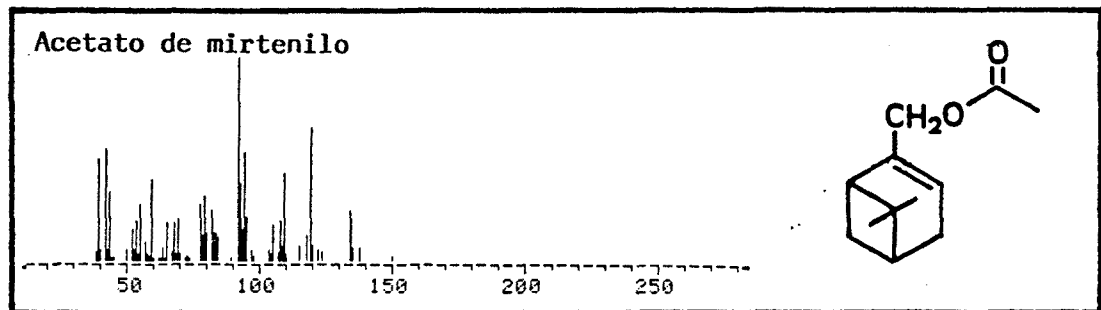
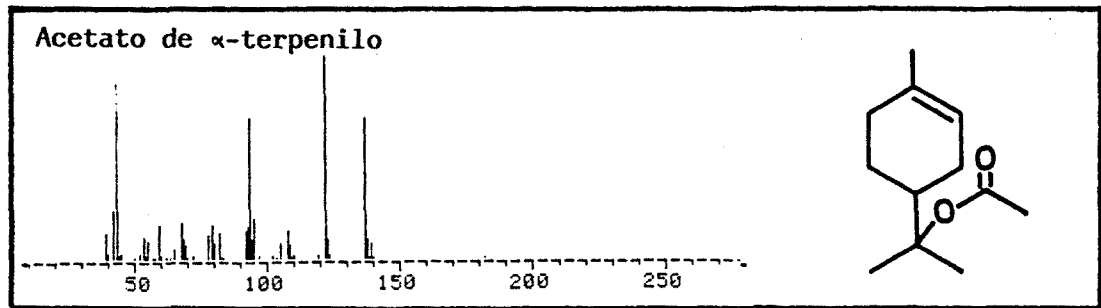
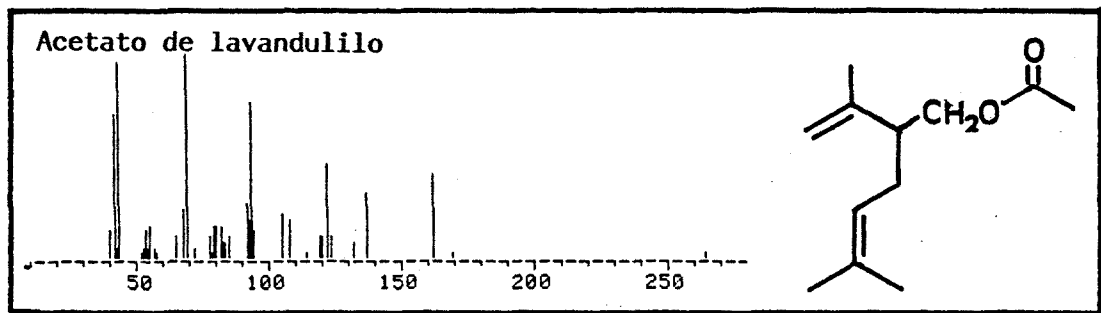
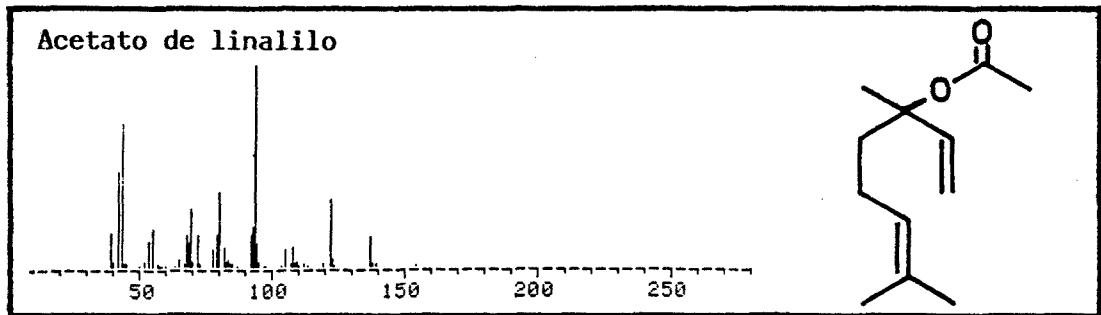
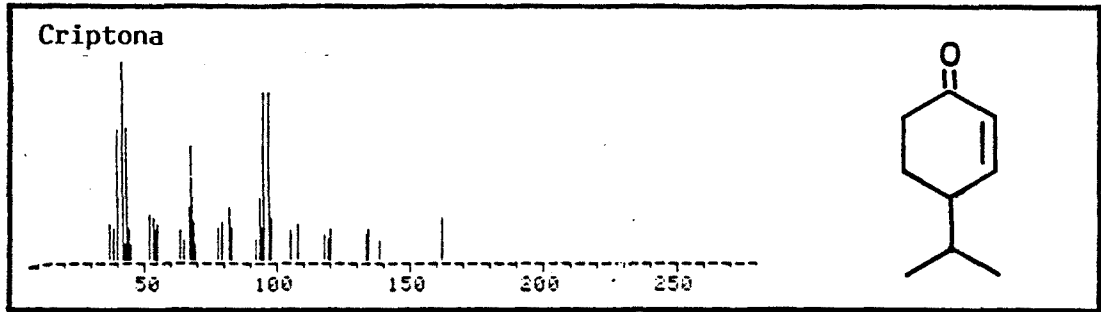


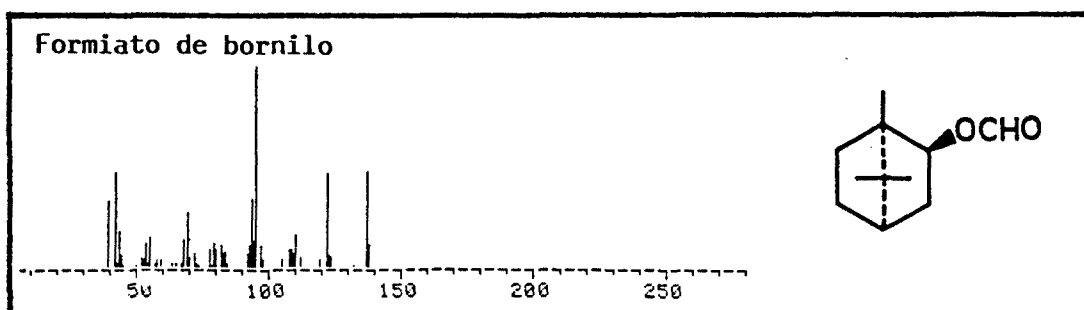
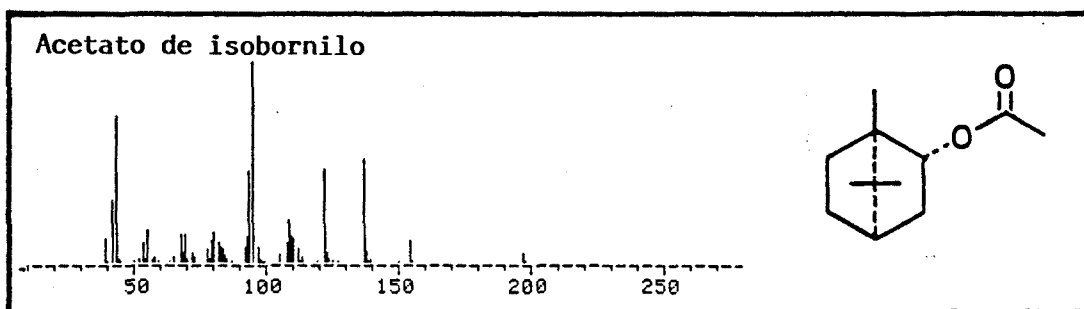
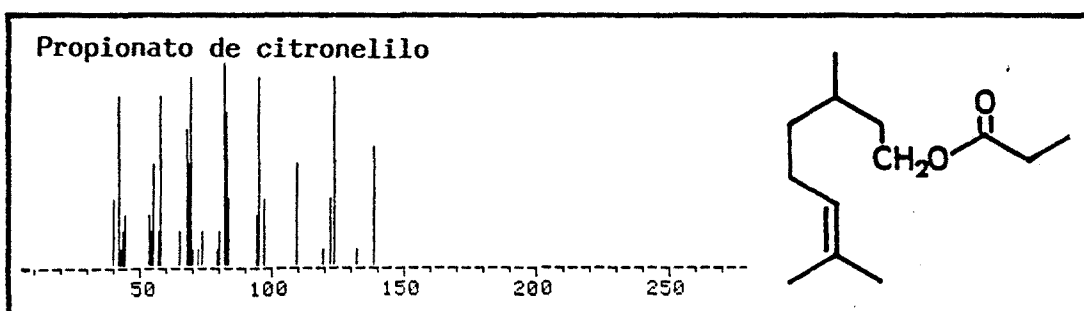
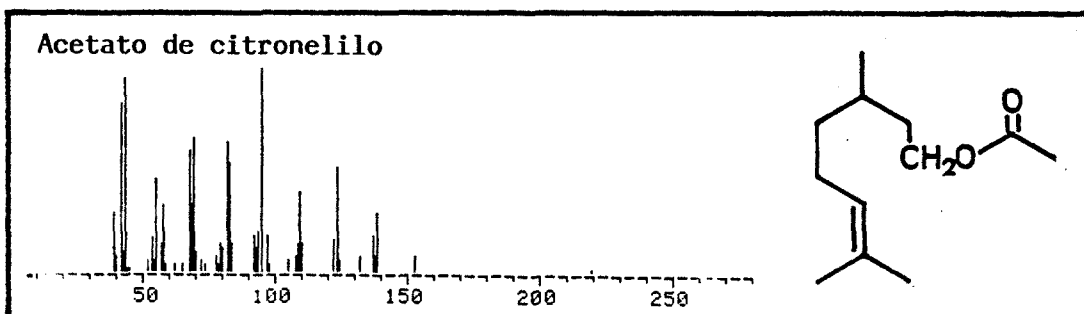
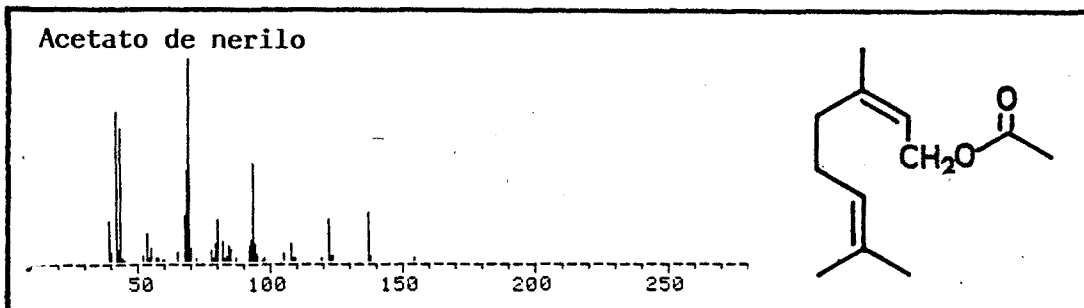


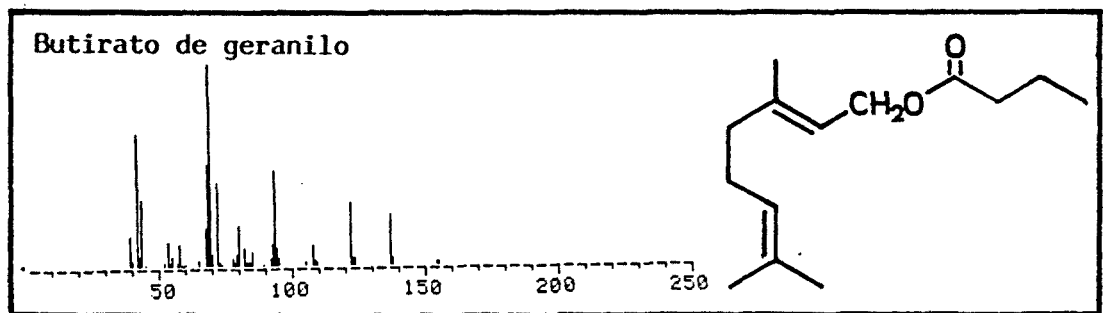
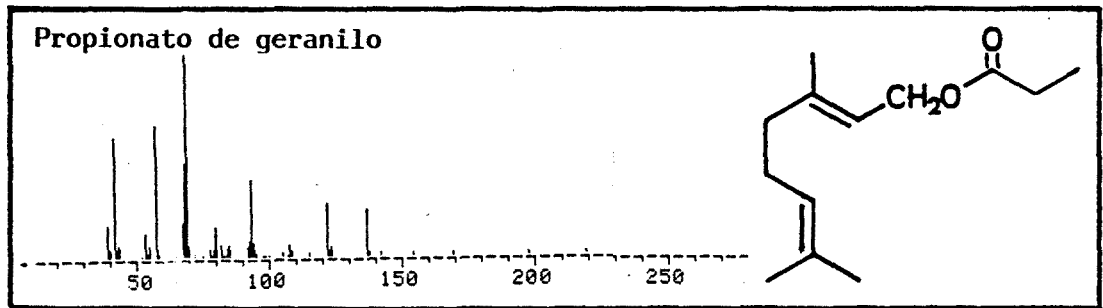
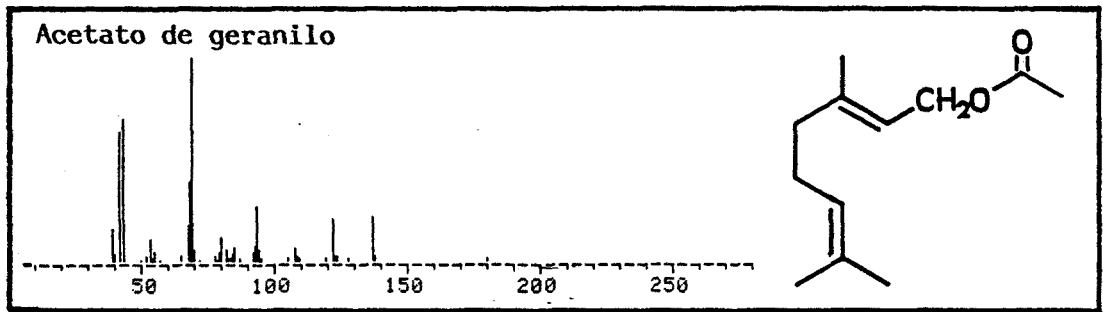
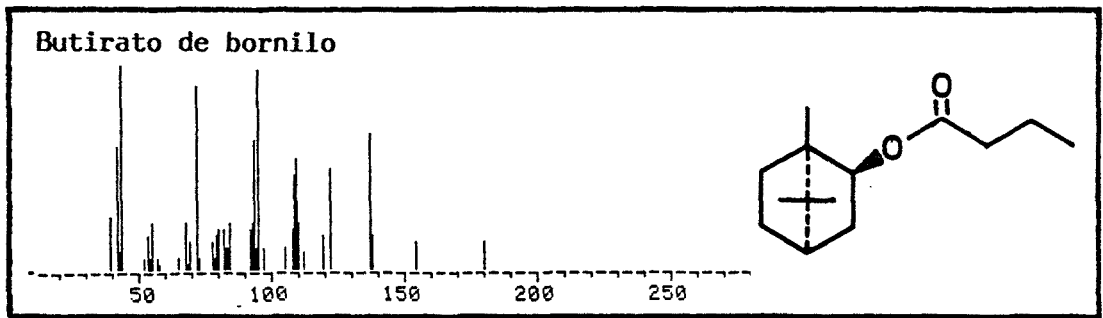
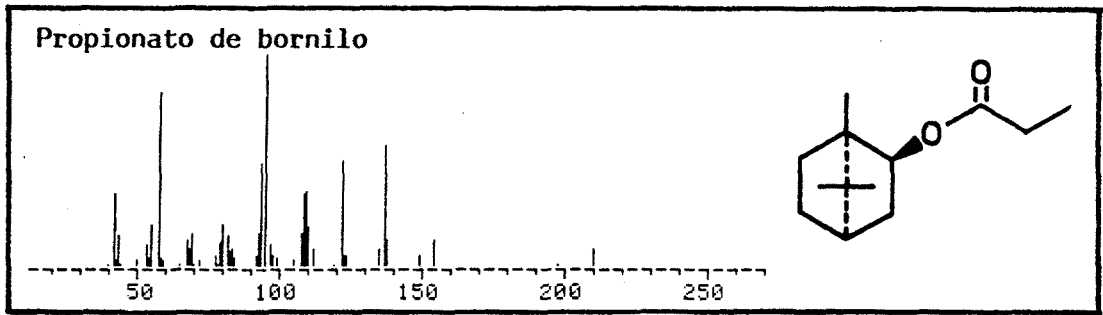


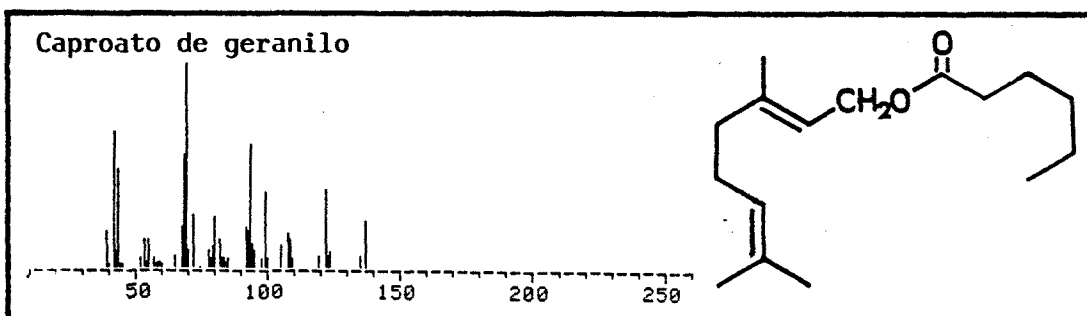
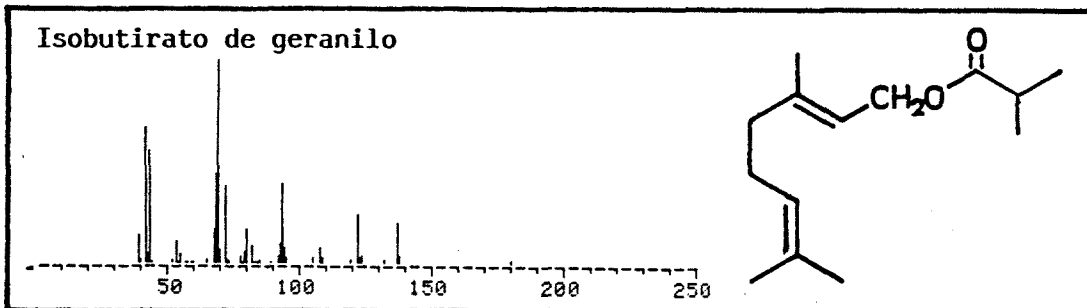




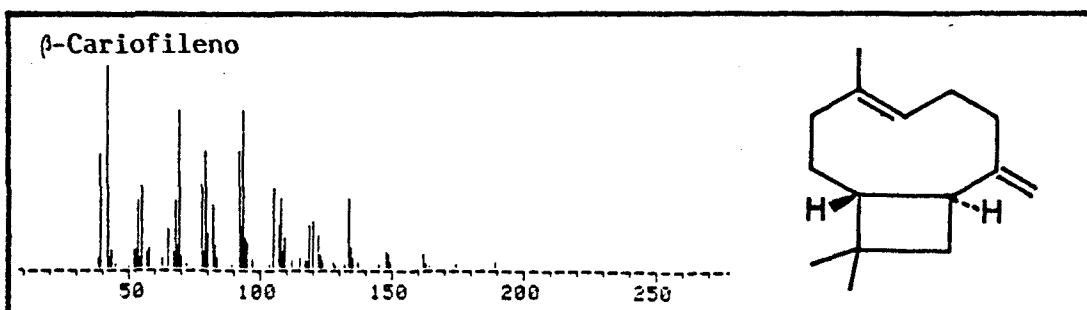
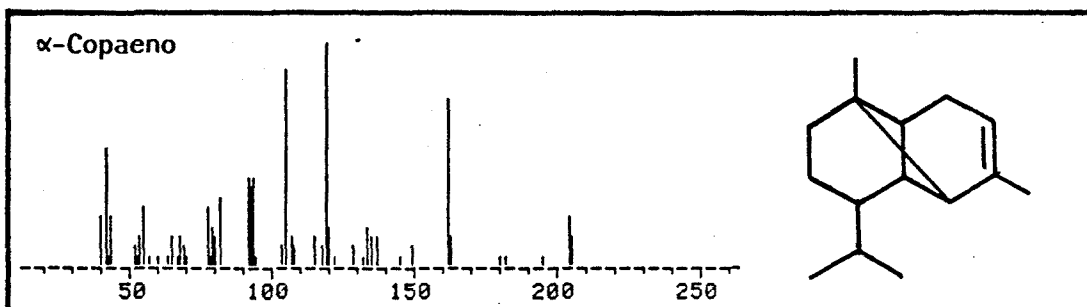


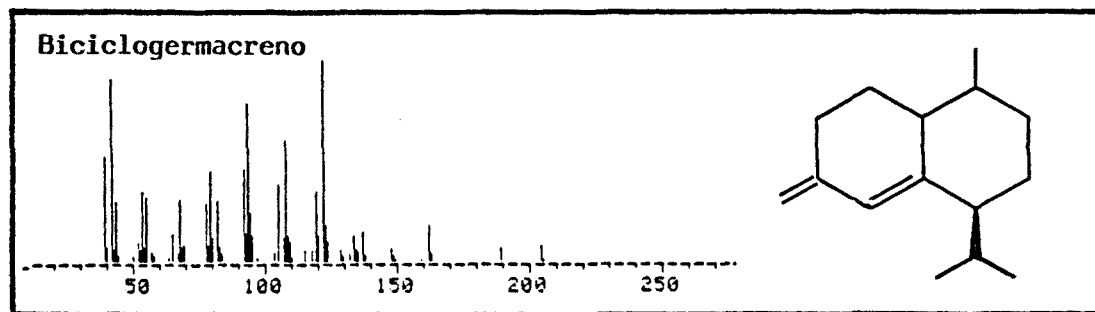
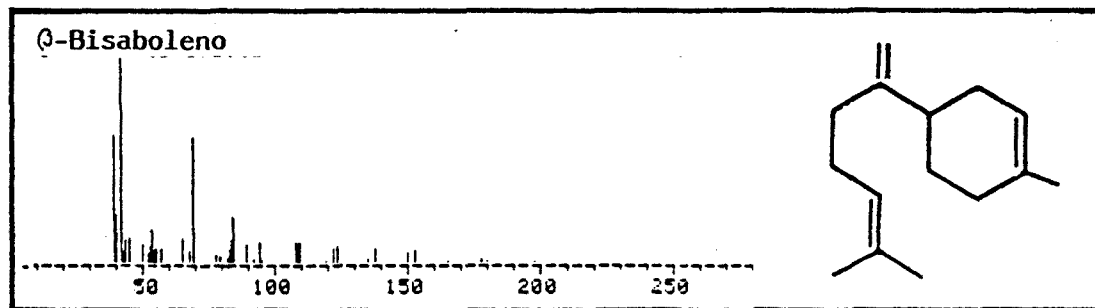
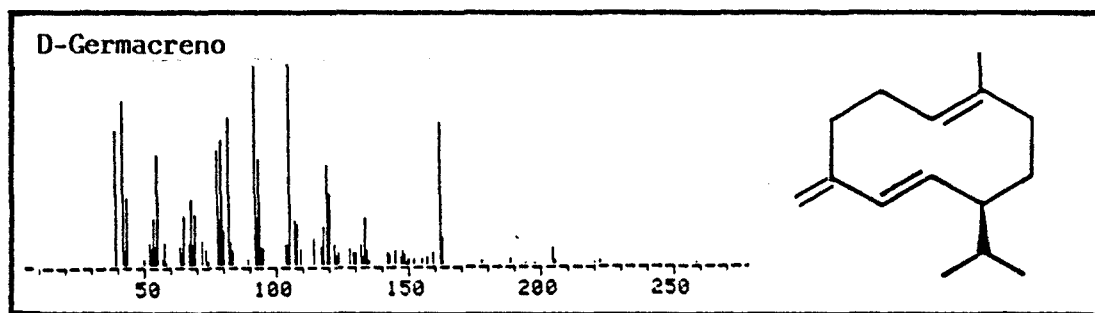
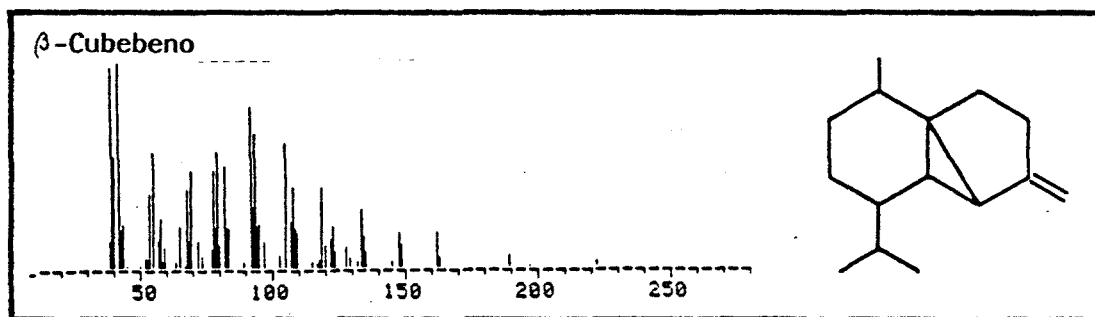
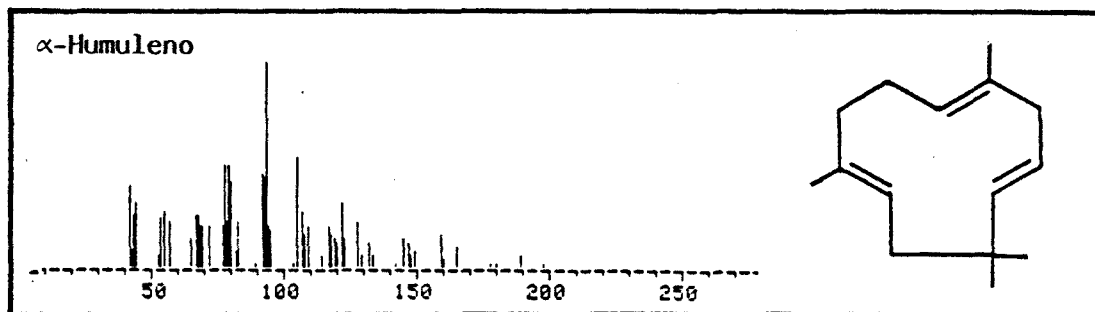


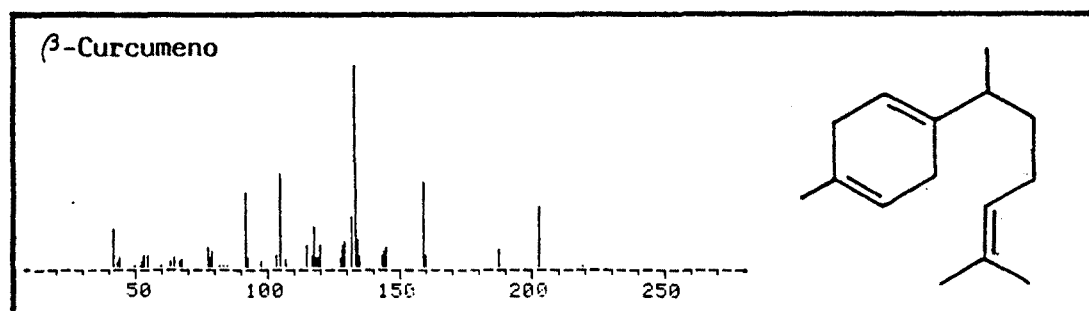
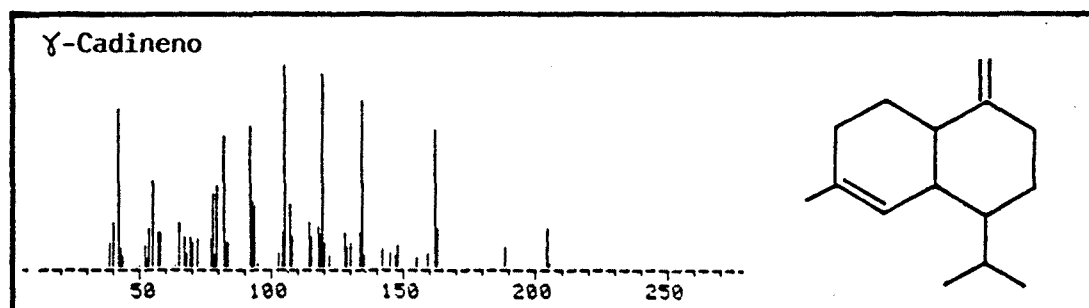
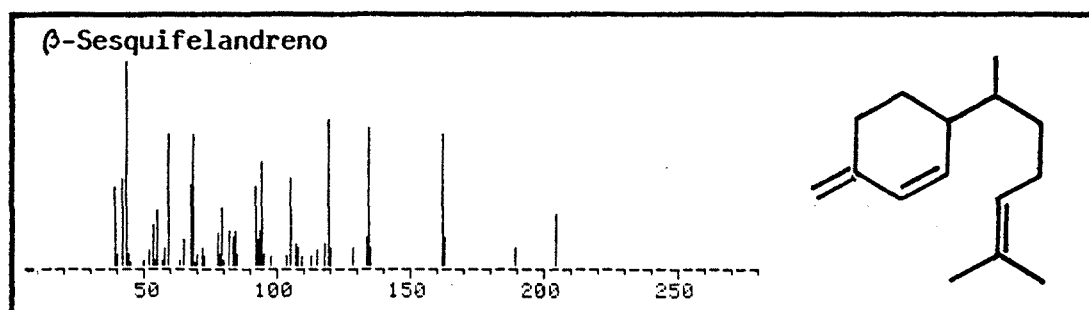
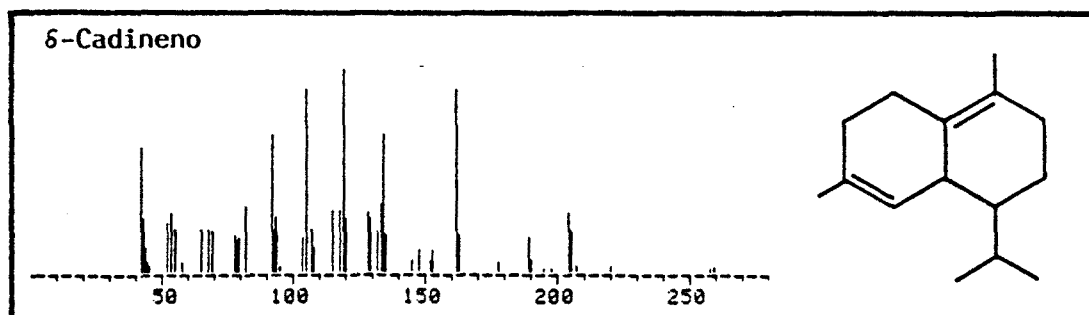
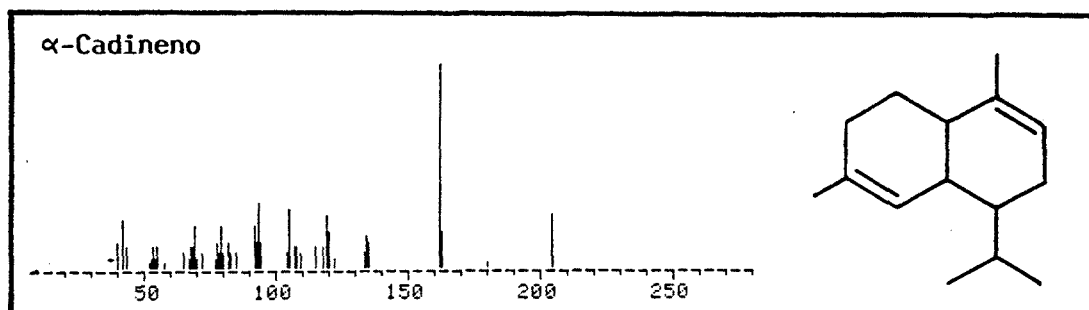


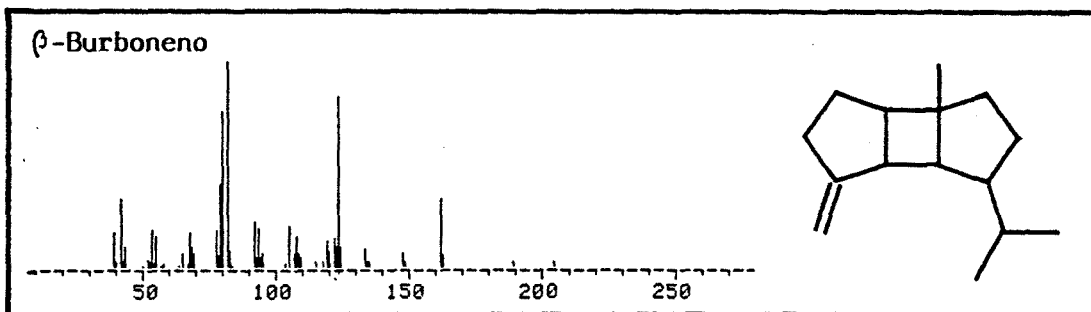


C) Hidrocarburos sesquiterpénicos.

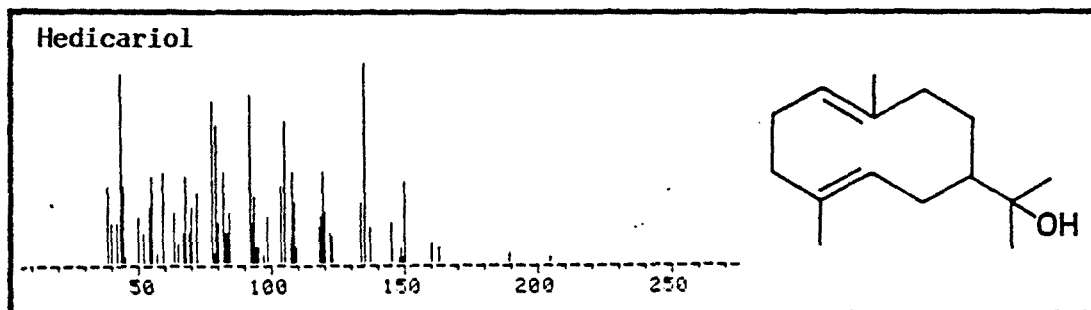
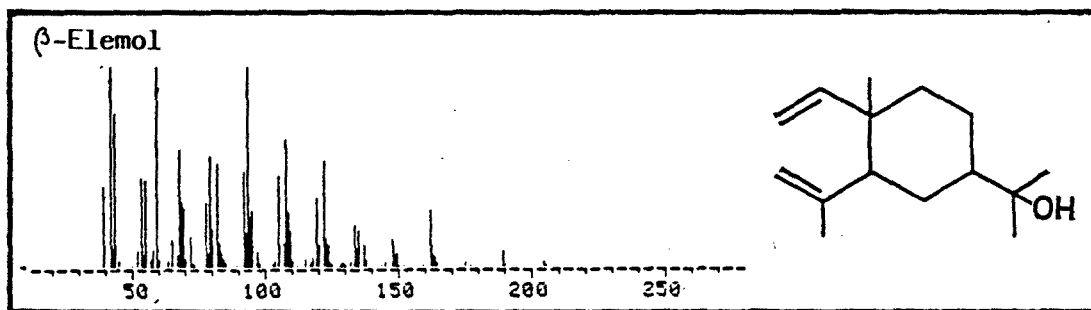
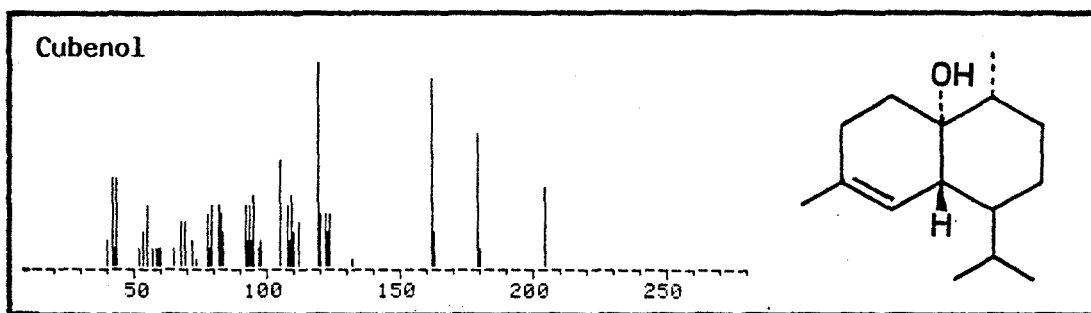


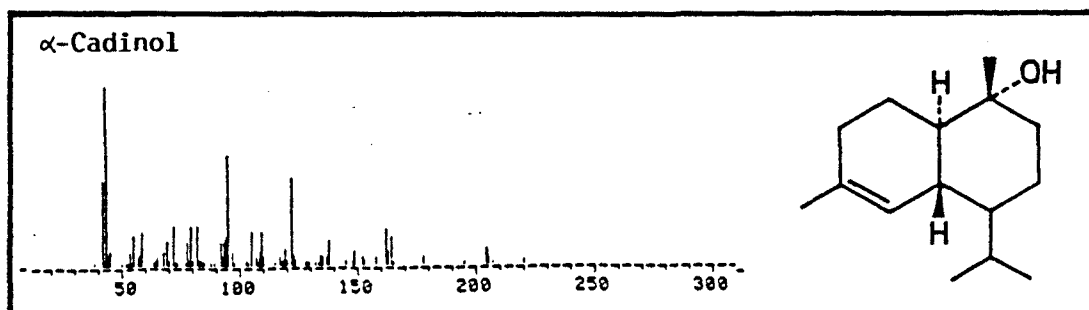
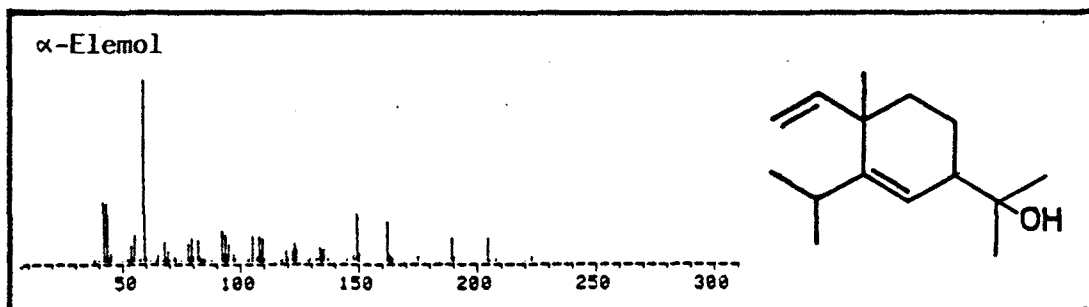
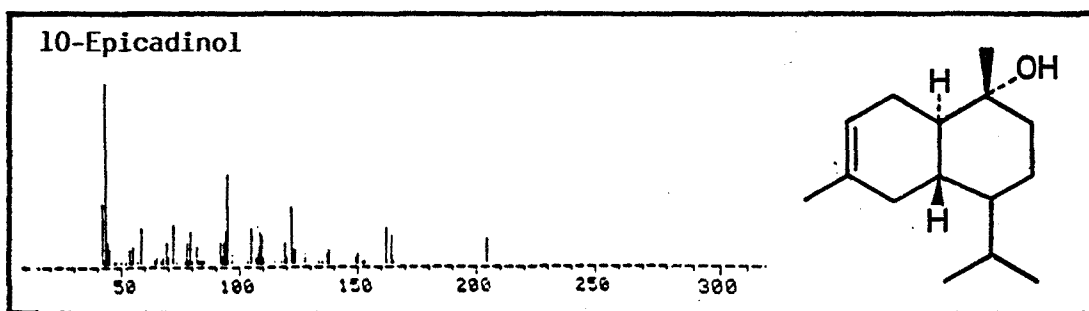
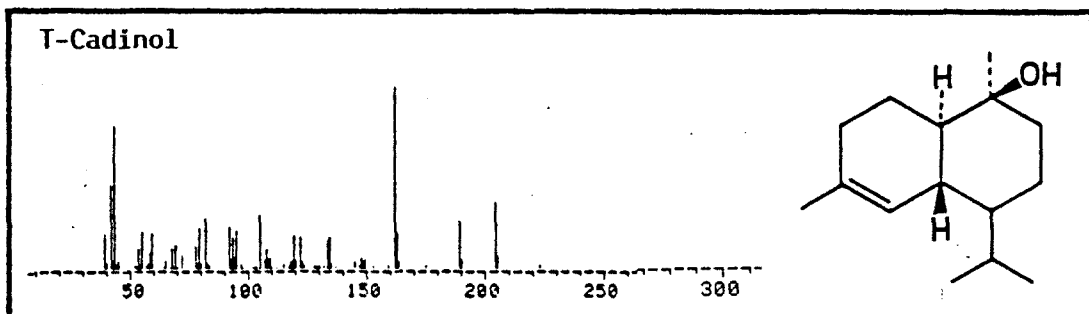
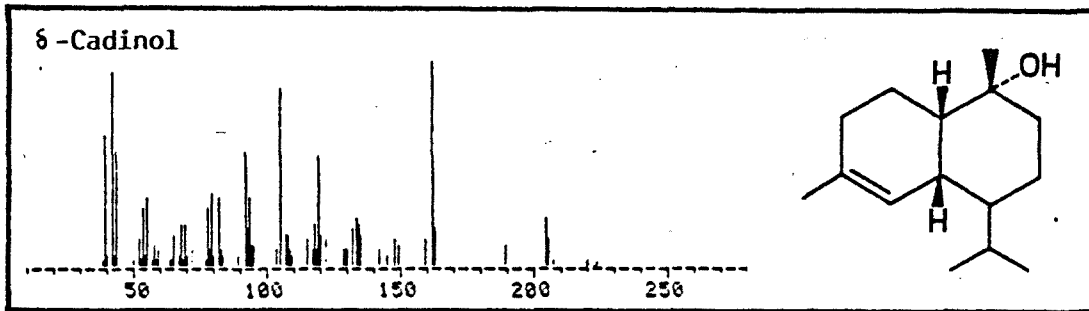


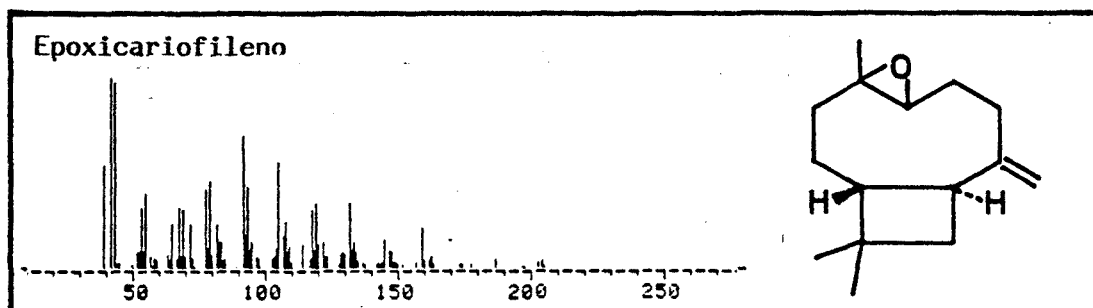
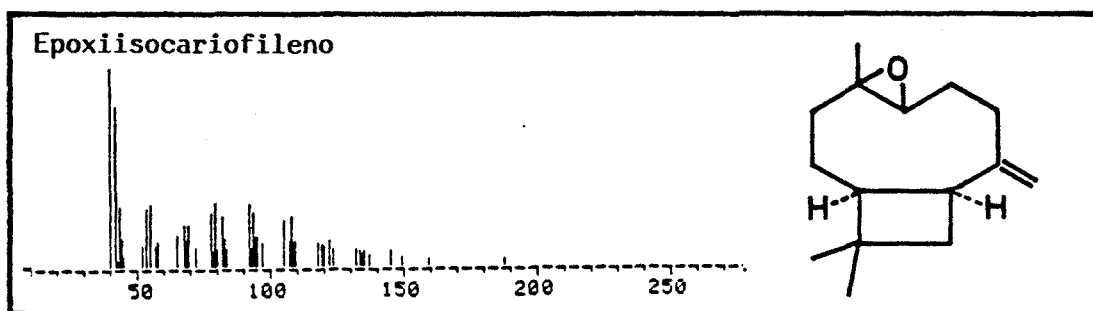
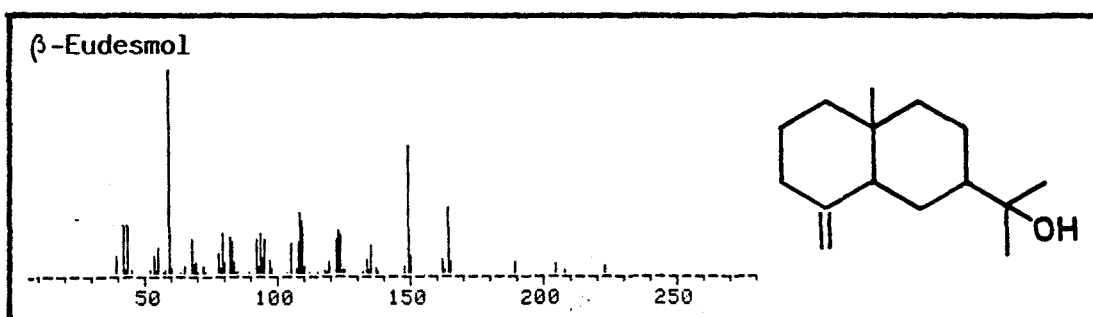
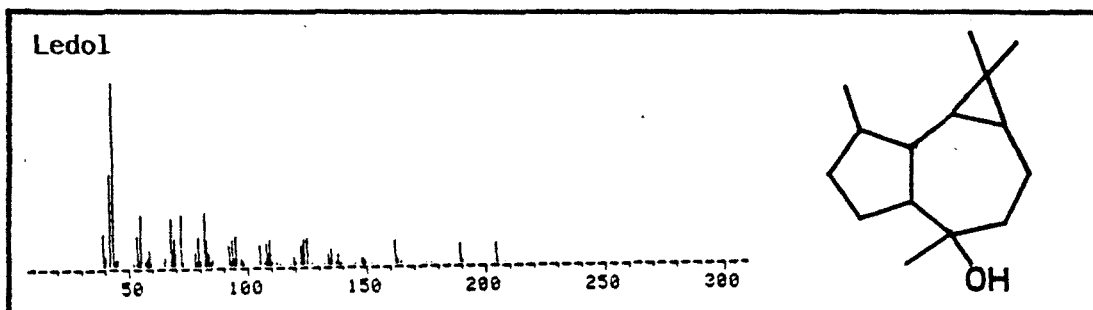




D) Sesquiterpenos oxigenados.







E) Otros.

