612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA QUIMICO

6. Novo metodo para a determinação do acido clorogenico no café

POR

C. H. SLOTTA; C. NEISSER & A. CARDEAL

Em nosso primeiro artigo sobre a determinação do acido clorogenico contido no café (1), mostrámos a ineficiencia dos metodos descritos na literatura e passámos a descrever os estudos que fizemos, afim de descobrir um novo processo, afastando as dificuldades que se nos apresentavam. O primeiro obice consiste na extração completa do acido clorogenico do café; o segundo, no preparo, partindo dos extratos assim obtidos, de solutos finais puros, que sejam aproveitaveis para a determinação analitica; o terceiro, na inexistencia de meio satisfatorio de determinação do acido clorogenico.

Neste artigo podemos, felizmente, indicar como conseguimos solucionar completamente essas dificuldades, embora agindo, em quasi todos os casos, de modo diverso do que a principio supúnhamos.

A primeira das dificuldades apontadas, i. é., a extração completa do acido clorogenico, é facilmente afastada uma vez que se disponha de um metodo bastante sensivel para a determinação do acido clorogenico. Então, já não se necessitam mais de amostras de 10 gs. de café; 2 gs. são suficientes, o que naturalmente torna a extração mais rapida. Para êsse fim, utilizam-se saquinhos de linho, que se enchem com café, extraindo-se com agua, durante uma hora, num aparelho de Soxhlet. Como recipiente emprega-se um balão bem grande, visto que os solutos em forte ebulição formam muita espuma. Reconhece-se o final da extração pelo resultado negativo da reação de Hoepfner (2). No caso de não se dispor de um aparelho de Soxhlet, pode-se proceder à extração mediante repetidas fervuras do saco de linho com agua, em uma vasilha aberta.

A segunda dificuldade que consiste em preparar, desses extratos, solutos proprios para a determinação e com todo o acido clorogenico, mas livre, quanto

possivel, de outras substancias, foi removida do seguinte modo: precipita-se o extrato com acetato de chumbo, segundo o metodo anteriormente descrito; centrifuga-se e lava-se o precipitado. Reunem-se, então, o soluto e as aguas de lavagem, aproveitando-se para a determinação da trigonelina, sobre a qual ainda trataremos em um proximo trabalho. O percipitado de chumbo é desdobrado em suspensão aquosa com hidrogenio sulfurado, passando-se em seguida o soluto, conjuntamente com o sulfureto de chumbo, quantitativamente para um balão volumetrico; completa-se até a marca e filtra-se. No caso de café crú, o soluto é ligeiramente amarelo, e pardacento no de café torrado. Outros acidos, especialmente acido cafeico e acido acetico e provavelmente tambem acido citrico, estão contidos nesse soluto, como já tivemos ensejo de mostrar em nosso primeiro trabalho. No entanto, não é possivel determinar volumetricamente, nem mesmo mediante titulação potenciometrica, o acido clorogenico em um tal soluto muito diluido de pelo menos tres acidos organicos. Todas essas experiencias, nas quais em nosso trabalho anterior (1) tinhamos depositado grandes esperanças, e que nos custaram muito tempo e trabalho, infelizmente não tiveram resultados satisfatorios.

Neste caso surgiu em nosso auxilio um processo analitico, fundamentalmente novo, que permite determinar com exatidão, tanto o acido clorogenico, como o acido cafeico, sem a interferencia dos demais acidos organicos. Tivemos, pois, a surpresa de verificar *que o acido clorogenico e o acido cafeico em soluto alcalino podem ser titulados exatamente com 10 atomos de iodo.* Trata-se neste caso de um desdobramento oxidativo da molecula pelo hipo-iodeto. Observa-se, trabalhando com soluto devidamente concentrado, depois de um certo tempo, o aparecimento de um precipitado cristalino e amarelo, que pudemos identificar como iodoformio. Pelo hipo-iodeto provoca-se uma destruição profunda da molecula de acido clorogenico. Em vista de tambem o acido cafeico reagir com iodo na mesma proporção de 1:10, deduz-se que a destruição da molecula provavelmente se dá na parte aromatica, que é comum aos dois acidos. Estamos fazendo estudos sobre o mecanismo desta reação, os quais relataremos mais tarde.

É claro que estudamos minuciosamente as condições da reação de acido clorogenico purissimo com iodo em excesso em soluto alcalino. A reação não se dá imediatamente, terminando, porém, depois de mais ou menos meia hora (Experiencia No. 1). Depois de adicionados iodo e alcali, é aconselhavel esperar cerca de uma hora antes de se acidular e de se titular o excesso de iodo com tiosulfato. Recomenda-se deixar o soluto durante êsse tempo no escuro; como é em geral aconselhavel para as reações com hipo-iodeto. Depois da acidulação, convem, afim de evitar perda de iodo, proceder imediatamente à titulação, cujo ponto final é facilmente visivel, como em geral ocorre depois da adição de amido. Para nós foi de capital importancia o fato de ser tão nitido o final da titulação, tanto nos solutos finais fortemente coloridos de café torrado,

como nos solutos preparados de café crú ou de acido clorogenico puro. Desde que o excesso de iodo ou de hipo-iodeto, por maior que seja, não influi na precisão da determinação (Experiencia No. 2), deve-se evitar o emprego de excessos pequenos demais de solutos de iodo. Além dos acidos clorogenico e cafeico, tambem o sal complexo de clorogenato de potassio e cafeina reage com iodo numa proporção de 1:10; por isso, executámos nossas experiencias em parte com essa substancia, que é mais accessivel (Experiencia No. 1b).

Essa nova titulação dos acidos clorogenico e cafeico é muito exata, o que se explica pelo fato de 1 molecula de acido consumir 10 atomos de iodo e de a titulação de iodo com tiosulfato pertencer aos metodos analiticos mais precisos. Portanto, é possivel com o emprego de solutos de titulação N/20 analisar ainda quantidades de apenas 10 mgs. de acido clorogenico com a maior exatidão (Experiencia No. 3b). Mais favoravel é, naturalmente, titular uns 20 a 30 mgs. de acido clorogenico, contidos em 0,5g. de um café medio. Em nossas analises partimos, com maior vantagem, de uma quantidade quatro vezes maior, afim de não termos que esperar pela filtração quantitativa, tanto mais quanto, como mais tarde se verá, executamos duas dessas titulações.

E' claro que a principio obtemos aquela quantidade de iodo, consumida pelos acidos clorogenico e cafeico contido no café. Como desses dois acidos apenas o acido cafeico é soluvel em eter, pode-se êste facilmente afastar de uma parte aliquota da mistura e em seguida titular o acido clorogenico sosinho na camada aquosa. Da diferença de ambas as titulações calcula-se, de um modo muito simples, o teor do acido cafeico contido no café. A unica precaução que deve ser observada, é que o eter empregado esteja completamente livre de peroxidos, pois, extraindo-se agua pura com eter comum e expulsando-se então completamente o eter da agua, ao titular-se esta agua com iodo em soluto alcalino, verifica-se que o consumo de iodo está bem além do limite de erro (Experiencia No. 4).

Desde que a titulação dos acidos clorogenico e cafeico pelo nosso processo possúi um limite de erro muito pequeno (Experiencia No. 3a), é natural que a separação desses dois acidos, mesmo com eter purissimo, não seja tão exata (Experiencia No. 5). Os valores para o acido clorogenico estão um pouco altos. Essa diferença do verdadeiro valor para os estudos comparativos seriados, por nós propostos, de diferentes tipos de cafés é insignificante, visto que em todas as analises ela aparece em igual proporção.

Os resultados que até agora colhemos com uma serie de cafés e que serão relatados, em pormenor, mais tarde, provam quão necessario era o descobrimento de um novo metodo, que, na determinação de acido clorogenico, merecesse verdadeira confiança e que fosse de facil manejo. Êsses resultados provam que todos os metodos até então conhecidos para a determinação de acido clorogenico no café crú e especialmente no café torrado davam resultados erroneos. Me-

diante o novo metodo nos é possivel, não só analisar um grande numero de cafés diferentes em estado crú e torrado, como tambem determinar o teor de acido clorogenico nas bebidas de café e fazer estudos sobre a influencia da torrefação sobre o teor de acido clorogenico. Êsses estudos, completados especialmente pelas pesquisas feitas na Secção de Fisio-patologia do Instituto, tornam-se cada vez mais interessantes.

Normas para a determinação do acido clorogenico no café crú (A), no torrado (B) e na bebida (C).

1. A e B. Determina-se a *humidade* numa amostra de 10 gs..

2. A. Extraem-se, primeiramente com eter de petroleo e em seguida com cloroformio, 10 gs. de café muito bem moido; o café assim *desengordurado e isento de cafeina,* é pesado depois de seco.

3. A. Pesa-se a quinta parte do café desengordurado, o que corresponde a 2,0 gs. de café crú, dentro de um saquinho de linho.

B. Pesam-se exatamente 2 gs. de café torrado em um saquinho de linho.

A e B. Deita-se o saquinho num aparelho de Soxhlet, cujo recipiente tenha pelo menos uma capacidade de 500 ccs. e no qual já estejam 100 ccs. de agua. Procede-se então a uma energica extração durante uma hora. Retira-se em seguida o saquinho do aparelho, expreme-se o liquido porventura ainda nele contido dentro de um tubo de ensaio e prova-se então com a reação de Hœpfner.

(**Reação de Hoepfner:** Acidula-se fracamente o soluto com acido acetico; em seguida, adicionam-se algumas gotas de um soluto de nitrito de sodio ajuntando imediatamente algumas gotas de soda caustica para alcalinizar: uma coloração vermelha indica a presença de acido clorogenico).

Si a extração foi perfeita, a reação de côr é completamente negativa. No caso contrario, tem-se que continuar a extração.

Depois de resfriar, transfere-se o soluto para um copo de centrifugador e precipita-se, misturando bem com 2 ccs. de um soluto saturado de acetato de chumbo. Agora, centrifuga-se até que o precipitado se haja depositado, deixando-se o soluto claro, o que em geral dura 10 minutos. Retira-se e guarda-se o soluto. O precipitado é misturado bem com um pouco de agua e novamente centrifugado; a agua de lavagem é ajuntada ao primeiro soluto. Repete-se mais duas vezes estas lavagens, reunindo todas as aguas de lavagem ao soluto original. Depois da primeira centrifugação, é conveniente certificar-se, pela adição de um pouco de acetato de chumbo, si no soluto claro não ha mais formação

de precipitado. Os liquidos decantados reunidos serão usados para *a determinação da trigonelina.*

Em seguida o precipitado é transferido quantitativamente para um copo de Becher com o menos possivel de agua, aquecido à ebulição, fazendo-se passar durante meia hora uma corrente não muito lenta de hidrogenio sulfurado. Durante todo o tempo, o soluto deve estar fervendo, sendo conveniente amassar as particulas mais grosseiras do precipitado com um bastão de vidro, durante a passagem do gas. No caso do café crú, já depois de no maximo 10 minutos, desaparece a ultima particula amarela; mesmo assim, deve-se continuar a passar gas, fervendo e misturando bem o soluto durante mais 20 minutos. Desliga-se então a corrente de gas e ferve-se durante alguns minutos, afim de expulsar o hidrogenio sulfurado em excesso.

O soluto ainda quente, juntamente com o precipitado de sulfureto de chumbo, é transferido quantitativamente para um balão graduado de 100 ccs., em seguida lavando bem o copo e juntando as aguas de lavagens ao liquido no balão. Depois de bem resfriado, completa-se o volume do balão até a marca (caso se haja formado espuma no gargalo do balão, pode-se destruir esta por meio de apenas uma gota de alcool); em seguida agita-se bem o conteudo e filtra-se por um filtro de dobras, devendo o filtrado aparecer perfeitamente claro. Certifica-se da ausencia de chumbo no filtrado, provando uma pequena amostra em um tubo de ensaio com hidrogenio sulfurado. No caso de se tornar turvo o soluto ou houver até precipitado, lava-se bem o precipitado de sulfureto de chumbo sobre o filtro, no minimo 10 vezes, com agua quente, e trata-se todo o filtrado, junto com as aguas de lavagem, novamente com hidrogenio sulfurado em um copo, como acima ficou indicado. Do soluto assim obtido retiram-se exatamente 25 ccs. para a *"Titulação do acido clorogenico + acido cafeico"*.

Esta titulação faz-se do seguinte modo: tratando-se de café crú, adicionam-se ao liquido 30 ccs. de soluto de iodo N/20 e, tratando-se de café torrado, apenas 25 ccs. de soluto; em seguida agitando-se bem, cerca de 30 gotas de soda caustica 2 N. Cobre-se com um vidro de relogio e deixa-se repousar durante 50 minutos no escuro. Depois, acidula-se com cerca de 2,5 ccs. de acido sulfurico 2 N e titula-se, agitando bem com soluto N/20 de tiosulfato, adicionando, finalmente, algumas gotas de um soluto de amido a 1%.

Calculo: Multiplica-se o fator do soluto de iodo por 30 e 25, respectivamente, subtraindo-se deste valor o numero de centimetros cubicos de soluto de tiosulfato exatamente N/20 e anota-se este resultado, que corresponde ao gasto de soluto de iodo N/20 para acido clorogenico + acido cafeico.

Outros 50 ccs. do filtrado são extraidos num extrator para liquidos durante 4 horas com eter destilado, livre de peroxidos. Depois, coloca-se a camada aquosa junto com as aguas de lavagem num Kitasato, introduz-se um capilar e expele-se o eter no vacuo, sendo conveniente mergulhar finalmente o Kitasato,

por poucos momentos, num banho-maria fervente. Deixa-se resfriar e transferem-se o soluto e as aguas de lavagem para um balão volumetrico de 100 ccs. e completa-se até a marca. Desse soluto empregam-se 50 ccs. para a *titulação do acido clorogenico*:

Procede-se à titulação como acima ficou descrito, empregando, porém, só 25 ou 20 ccs., respectivamente, do soluto de iodo N/20. Por um calculo analogo obtem-se o numero de ccs. de soluto N/20 de iodo, gastos pelo acido clorogenico contido no soluto. Multiplicando-se este numero por 1,77 obtem-se a quantidade de acido clorogenico em miligramas. Como esta quantidade corresponde a 0,5 gs. de café, tem-se que multiplicar por 0,2 para saber a porcentagem de acido clorogenico no café. Finalmente, para referir o resultado ao café seco, é mister dividí-lo por (100-% de humidade).

Exemplo: Foram adicionados 25 ccs. de soluto de iodo com fator f=1.015; isto corresponde a 25,37 ccs. de soluto de iodo exatamente N/20; o gasto em soluto de tiosulfato exatamente N/20 era de 9,32 ccs.; portanto, o acido clorogenico consumiu 25,37 — 9,32 = 16,05 ccs.. Multiplicando-se 16,05 por 1,77, obtem-se o valor de 28,4 mgs. para acido clorogenico contido em 0,5 gs de café. Isto corresponde a 5,68%.

Si o café continha 11,2% de humidade, deve-se ainda dividir por 100—11,2=88,8, obtendo-se assim: 6,40% de acido clorogenico no café seco.

C. *Na bebida* — A determinação é feita de tal modo, que se precipita um volume exatamente medido com acetato de chumbo, continuando-se depois como foi indicado acima para o café crú e torrado. A quantidade de bebida necessaria para a determinação depende, naturalmente, da quantidade de acido clorogenico que se espera obter, portanto, da concentração da bebida. No café, preparado à moda brasileira, a quantidade mais favoravel é de 10 ccs., que, em media, contêm cerca de 100 mgs. de acido clorogenico; no soluto final deve-se titular 25 mgs., o que corresponde a um consumo de cerca de 14 ccs. de solução de iodo N/20. — *Nota*: Não é necessaria a retirada das gorduras e da cafeina antes da determinação.

4. *Calculo do acido cafeico.*

(No café crú, torrado e na bebida).

Na determinação do acido clorogenico obtem-se primeiro o gasto de iodo para acido clorogenico + acido cafeico, e, na determinação seguinte, o gasto só para o acido clorogenico. A diferença multiplicada por 0,9 fornece o teor de acido cafeico em miligramas, que precisa ser multiplicado por 0,2, para dar o teor percentual de acido cafeico. Êste, por sua vez, pode ser referido ao teor no café seco, tomando-se em consideração o respectivo teor em humidade.

Exemplo: O gasto em iodo, para acido clorogenico + acido cafeico, foi de 20,54 ccs. e para acido clorogenico só (depois da extração com eter)

de 16,48. A diferença=4,06 é multiplicada por 0,9, dando 3,65 mgs. de acido cafeico ou sejam 0,73%. Si o café continha 11,2% de humidade então deve-se dividir por 88,8. O resultado é: 0,82% de acido cafeico no café seco.

Descrição das experiencias

Experiencia No. 1 — Dependencia entre consumo de iodo e tempo.

a) Em cada experiencia: 10,75 mgs. de acido cafeico, 20 ccs. de soluto de iodo N/20 com f=0,771 e 1 cc. de alcali; depois de varios periodos, acidulação com acido sulfurico diluido e titulação com soluto de tiosulfato exatamente N/20.

Tempo em minutos	Consumo de iodo em atomos por mol. de acido cafeico
3	7,90
6	8,55
10	9,25
15	9,30
30	9,50

O acido cafeico empregado não estava completamente puro; porisso, o teor teorico de 10,0 atomos de iodo, mesmo depois de 30 minutos, não foi inteiramente alcançado.

b) Em cada experiencia: 40,0 mgs. de clorogenato de potassio mais cafeina, 20 ccs. de soluto de iodo N/20 de f=1,015, e 1 cc. de alcali; acidulação e titulação depois de diversos periodo de tempo.

Tempo em minutos	Consumo de iodo em atomos por mol. de potassio e cafeina
10	8,92
20	9,64
30	9,65
45	10,08
60	9,82

c) Em cada experiencia: 21,3 mgs. de acido clorogenico, em 20 ccs. de um soluto de iodo N/20 de f=0,771 e 1 cc. de alcali. Acidulação e titulação depois de diversos periodos de tempo.

Tempo em minutos	Consumo de iodo em atomos por mol. de acido clorogenico
0	6,60
5	8,90
10	9,20
20	9,50

Experiencia No. 2 — Independencia entre consumo de iodo e excesso de iodo.

Em cada experiencia, 21,3 mgs. de acido clorogenico foram tratados com quantidades crescentes de iodo e alcali, sendo acidulados e titulados depois de 20 minutos.

Quantidade de iodo em cc.	Consumo de iodo em atomos por mol. de acido clorogenico
20 cc	9,50
30 cc.	9,50
40 cc.	10,15

Experiencia No. 3 —

a) Analises de acido clorogenico puro, sendo quantidades desconhecidas ao analista.

Dados	Encontrados
31,2 mgs.	29,9 mgs.
10,7 mgs.	12,1 mgs.
15,4 mgs.	15,0 mgs.

b) Analise de uma quantidade reduzida de acido clorogenico.

Dado: 8,5 mgs. Achado: 8,0 mgs.

Experiencia No. 4 — Influencia do eter empregado na extração sobre o consumo de iodo na camada aquosa.

Agitou-se agua com eter comum, separou-se-a e o eter foi completamente expulsado da agua pela devida aeração. Na titulação subsequente com iodo, em soluto alcalino, consumiram-se mais ou menos 2 ccs. de soluto de iodo N/20.

O ensaio foi novamente feito com eter livre de peroxidos e cuidadosamente destilado.

Consumo: 0,37 cc. de soluto de iodo N/20.

Experiencia No. 5 — Separação dos acidos clorogenico e cafeico.

19,2 mgs. de acido clorogenico e 7.0 mgs. de acido cafeico em soluto aquoso foram extraídos durante 4 horas num aparelho com eter livre de peroxidos. A titulação na camada aquosa acusou 21,5 mgs. de acido clorogenico.

Em um ensaio analogo, em vez dos 20,0 mgs. de acido clorogenico obtiveram-se 22,2 mgs.. O teor para o acido cafeico calculado da diferença da titulação antes e depois da extração com eter era de 5,8 mgs., enquanto que a quantidade original era de 6,0 mgs..

RESUMO

Afim de elaborar um metodo suficientemente exato e ao mesmo tempo adaptavel a doseamentos em serie, havia tres problemas a resolver:

1. Extração completa do acido clorogenico do café. Foi conseguida com o emprego de quantidades bastante pequenas (2 gs.), por extração com agua, durante 1 hora, num aparelho Soxhlet.

2. Preparo de solutos finais os mais puros possiveis. Por precipitação do extrato com acetato de chumbo, decomposição do precipitado com hidrogenio sulfurado e extração do filtrado com eter, obtiveram-se solutos finais quasi incolores no caso do café crú e levemente pardos no caso do café torrado. O grau de pureza era bem o suficiente para a determinação subsequente.

3. A possibilidade de doseamento de quantidades, mesmo pequenas, de acido clorogenico. Verificou-se que o acido clorogenico em soluto alcalino reage exatamente com 10 atomos de iodo, o que representava um metodo de doseamento do acido clorogenico extremamente simples e muito exato. Esse metodo é descrito minuciosamente no texto.

ZUSAMMENFASSUNG

Um eine genügend genaue, zu Reihenanalysen geeignete Bestimmungs-methode für Chlorogensäre auszuarbeiten, waren 3 Probleme zu lösen:

1. Die vollständige Extraktion der Chlorogensäure aus dem Kaffee. Sie gelingt bei Anwendung genügend kleiner Mengen (2g) durch 1-stündige Extraktion im Soxhletapparat mit Wasser.

2. Die Herstellung möglichst reiner Endlösungen. Durch Fällung des Extraktes mit Blei-acetat, Zerlegung des Niederschlages mit Schwefelwasserstoff und Aether-Extraktion des Filtrates erhält man bei Rohkaffee fast farblose, bei Röstkaffee hell braun-gelbe Endlösungen, deren Reinheit für die folgende Bestimmung voll ausreichend ist.

3. Die quantitative Erfassung selbst kleiner Mengen Chlorogensäure. Es wurde die Tatsche gefunden, dass Chlorogensäure in alkalischer Lösung mit genau 10 Atomen Jod reagiert, womit eine überaus einfache und sehr genaue Bestimmungsmethode für Chlorogensäure gegeben ist. Die ausführliche Arbeitsvorschrift wird veröffentlicht.

BIBLIOGRAFIA

1. *Slotta, C. H.; Neisser, C. & Cardeal A.* — Rev. Inst. Café — 12:2006. 1937.
2. *Hoepfner, W.* — Chem. Ztg. 56:991. 1932.

(Trabalho da Secção de Quimica e Farmacologia Experimentais do Instituto Butantan, recebido para publicação em maio de 1938. Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).