612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA QUIMICO

7. Novo metodo para a determinação da trigonelina

POR

C. H. SLOTTA & C. NEISSER

Em nosso trabalho anterior (1), descrevemos para a determinação do acido clorogenico no café crú e torrado um novo metodo, cuja grande exatidão nos permite partir de apenas 2 gs. de café em pó, ou então 10 ccs. de bebida. É claro que envidámos esforços afim de abranger, o quanto possivel, nessa diminuta quantidade de substancia, ainda outros produtos para os quais até então ainda não existia metodo de determinação analitica. Em primeiro logar, focalizamos nosso interesse sobre a trigonelina, a qual, depois da cafeina, representa o alcaloide mais importante do café.

A presença da trigonelina no café é conhecida de ha muito (2), embora sua absoluta identificação com a trigonelina preparada sinteticamente tivesse sido possivel apenas alguns anos atrás (3). As analises realizadas por Nottbohm & Mayer (4,5) foram as que em primeiro logar nos indicaram a quantidade da trigonelina contida no café, mas seu metodo não é completamente satisfatorio. Para os fins a que nos propunhamos, esse metodo já não era o apropriado, visto que ele partia de quantidades de 20 gs. de café. Além disso, requeria uma autoclava que certamente não existe em todos os laboratorios; e de analises em serie, que desde o principio visavamos fazer, nem poderiamos cogitar, pois era êle muito demorado e exigia simultaneamente exames comparativos com trigonelina pura.

Segundo as analises de Nottbohm & Mayer (5), existiriam 0,4% de trigonelina no café crú. Em nossa amostra de 2 gs., portanto, deviamos contar com 8 mgs. de trigonelina. Nesse caso, mais que no do acido clorogenico, seria necessario encontrar um metodo microanalitico, que fosse capaz de determinar uma quantidade tão diminuta de trigonelina. Felizmente verificamos que a *trigone-*

lina em soluto alcalino pode ser titulada com exatamente 10 atomos de iodo. Esse novo metodo ultrapassa bastante as nossas exigencias quanto à exatidão: permite o doseamento, com a necessaria exatidão, de quantidades apenas de 2 mgs. (Experiencia No. 1). Baseados nisso, foi-nos possivel determinar, no decurso de nossas analises, a trigonelina mediante o emprego da mais exata e mais simples de todas as titulações, a titulação pelo iodo.

Faltava agora apenas resolver o problema de obter a trigonelina do café em solutos bem puros e livres de substancias secundarias. Tambem isto foi solucionado. Na precipitação do acido clorogenico com acetato de chumbo, a trigonelina permanece no soluto. O soluto depois de retirado o chumbo mediante o emprego de hidrogenio sulfurado, é quasi incolor no café crú, e ligeiramente amarelado no café torrado e na bebida. Pode-se agora proceder à titulação do iodo numa parte aliquota de soluto, e depois, em uma outra parte de soluto, determinar a glicose redutora segundo Bertrand e calcular o teor de trigonelina pela diferença (Experiencia No. 2). Já que esse metodo, como todos os baseados no calculo por diferenças, está sujeito a naturais inexatidões, achamos conveniente procurar um outro metodo para a separação direta da trigonelina.

Tambem este problema teve solução feliz. Verificámos que a determinação da trigonelina pode ser realizada por precipitação pelo acido fosfo-tungstico. Isto se consegue facilmente, mesmo em solutos muito diluidos, como os que obtemos em nossas analises, uma vez que se tome em consideração o seguinte: 1. A precipitação dá-se unicamente em meio acido; 2. o precipitado somente se torna filtravel, si se adiciona ao soluto, a frio, acido fosfo-tungstico, aquecendo até solução clara e deixando esfriar *muito lentamente;* 3. o composto de trigonelina e acido fosfo-tungstico, tampouco, não é completamente insoluvel em soluto acido; em volume de 110 ccs. permanecia dissolvida uma quantidade do composto, que correspondia a 1,0 mgs. de trigonelina (Experiencia No. 3). Esse fator empirico deve ser acrescentado à quantidade de trigonelina achada.

Com o emprego da precipitação com acido fosfo-tungstico o nosso processo para a determinação da trigonelina no café se torna extremamente simples e exato. O soluto livre de chumbo é acidulado e precipitado com acido fosfo-tungstico do modo descrito. O precipitado é filtrado e dissolvido no filtro com soda caustica diluida. Adiciona-se a êsse soluto alcalino uma quantidade medida de soluto de iodo, deixa-se repousar uma hora, acidula-se em seguida, titulando o excesso de iodo com tiosulfato. Convencemo-nos de que a presença do acido fosfo-tungstico no soluto não influi sobre a titulação da trigonelina pelo iodo.

Desde a elaboração do metodo, já realizamos dezenas de analises, que, sem exceção, coincidiram, dentro do limite estrito, com a prova de controlo (Experiencia No. 4). Com o emprego desse metodo tão extremamente simples, que está ao alcance de qualquer auxiliar de laboratorio pouco pratico, cuja realização

não leva mais que um dia, tornou possivel analisar inumeras amostras de café quanto ao seu verdadeiro teor de trigonelina.

Faremos em breve uma comunicação sobre os resultados. De antemão queremos adiantar que o teor de trigonelina no café crú é muito mais elevado, do que até então se supusera: em media 1%! Na torragem, grande parte da trigonelina é destruida, de modo que o café torrado contem apenas uma media de 0,5% de trigonelina. Nossas analises revelaram, além disso, que o conceito expresso por Nottbohm & Mayer (7) sobre o "indice de alcaloides", i. é., relação da cafeina para a trigonelina, requer uma revisão meticulosa, visto que este indice está baseado sobre uma determinação incorreta da trigonelina.

Tecnica para determinação da trigonelina

(*O café crú, café torrado e bebida*)

Os liquidos reunidos, decantados da precipitação de chumbo combinado com o acido clorogenico (Vide tecnica para doseamento do acido clorogenico, Mem. Inst. Butantan *12*. 1938), são aquecidos num copo sobre a chama até a ebulição, fazendo-se passar, ao mesmo tempo, uma corrente de hidrogenio sulfurado durante meia hora. Convém reparar que, no final desta operação, o volume do liquido seja mais ou menos de 150 ccs.. Após a passagem do hidrogenio sulfurado, deixa-se ainda ferver durante algum tempo, afim de expulsar os residuos do hidrogenio sulfurado. Filtra-se, ainda quente, em um balão volumetrico de 200 ccs.. Lava-se varias vezes o filtro, completando o balão volumetrico até a marca, depois de esfriado. Retiram-se então 100 ccs., despejando-os em um balão de Erlenmeyer de boca larga de 200 ccs.. Adiciona-se 10 ccs. de acido sulfurico (2 N) e 40 gotas de um soluto a 10% de acido fosfo-tungstico. O soluto turvo é aquecido até o ponto de ebulição, com o que o soluto fica completamente claro. Deixa-se então esfriar *lentamente*, pondo-o finalmente na geladeira. Num funil analitico prepara-se um filtro em otimo estado de funcionamento, humedece-se com acido sulfurico N/2 e filtra-se o soluto esfriado. Convém ter o devido cuidado para evitar que a menor quantidade possivel do precipitado seja levada ao filtro. Lava-se então duas vezes com 5 ccs. de acido sulfurico N/12, tomando-se novamente o cuidado de levar a menor quantidade possivel do precipitado ao filtro. Então coloca-se o funil sobre o vasilhame, no qual se acha a maior quantidade do precipitado. Deitam-se então no fitro 10 ccs. de soda caustica 1/N divididos em duas porções, com que se dissolve o precipitado do filtro. Lava-se varias vezes o filtro com agua fria, procedendo-se então à determinação da trigonelina no soluto assim obtido por meio da titulação de iodo.

Para êsse fim, acrescentam-se ao soluto 20 ccs. de soluto de iodo N/20, cobre-se o copo com um vidro de relogio e deixa-se repousar no escuro du-

rante uma hora. Acidula-se então com 7 ccs. de acido sulfurico 2/N e titula-se o excesso com um soluto de tiosulfato N/20, adicionando-se, finalmente, amido. Calculo: O numero de ccs. consumidos de soluto N/20 de iodo obtém-se do modo usual. Multiplicando-se este numero por 0,69, obtém-se o numero de mgs., contidos nos 100 ccs. de soluto (=1,00 g. de café). Adiciona-se, então, a esse numero 1,00 mg., pois esta quantidade permanece nos liquidos empregados e foge, portanto, à titulação. Divide-se então por 10, para obter o teor porcentual da trigonelina. Calcula-se então o valor de referencia ao café sêco, dividindo-se por (100—% de humidade).

Exemplo: Adicionaram-se 20 ccs. de um soluto de iodo de um fator f=1.020; isto corresponde a 20,40 ccs. de um soluto N/20 de iodo. O consumo em tiosulfato foi 9,58 ccs.. O consumo em iodo do soluto foi, portanto, de 10,82 ccs.. Isto multiplicado por 0,69 dá 7,46 mgs. de trigonelina. Adiciona-se então 1,00 mg.; obtendo-se como resultado 8,46 mgs. ou seja de 0,85%. O café empregado continha 10,0% de humidade; o teor em trigonelina no café sêco é, portanto, de 0,94%.

Descrição das experiencias

Experiencia No. 1 — Doseamento de hidrocloreto de trigonelina puro com iodo em soluto alcalino. Os valores obtidos são calculados sobre a base de um gasto de 10 atomos de iodo para molecula de trigonelina

No.	mg. hidrocloreto de trigonelina	
	dados	achados
1	10,7	10,0
2	10,7	10,4
3	10,7	10.3
4	10,7	10,4
5	10.7	10,5
6	4,27	4,17
7	4.27	4,09
8	11,4	10,8
9	4,05	4.02
10	2.14	2,08
11	2,14	2,09

Experiencia No. 2 — Doseamento indireto da trigonelina em presença de glicose. A glicose foi titulada segundo Bertrand. A titulação da mistura com iodo em soluto alcalino deu o valor para a soma: gasto de iodo da

glicose (2 atomos de iodo por molecula) + gasto de iodo da trigonelina (10 atomos de iodo por molecula, calculando-se então os teores da trigonelina.

	mg. hidrocloreto de trigonelina		mg. glicose	
	dados	achados	dados	achados
mistura sintetica	6,98	6,66	5,40	5,57
	6,98	7.02	5,40	5.38
extrato dum café crú		1,21%		1,00%
		1,18%		1,00%
		1,20%		1,09%
		1,13%		1,08%

Experiencia No. 3 — Doseamento de hidrocloreto de trigonelina por precipitação com acido fosfo-tungstico e titulação com iodo.

A quantidade de hidrocloreto de trigonelina exatamente pesada foi dissolvida em 100 ccs. de agua e depois tratada segundo a tecnica acima descrita.

mg. hidrocloreto de trigonelina		diferença
dados	achados	mg.
7,8	6,55	1,25
10,1	8,5	1,6
20,4	19,2	1,3
15,0	13,9	1,1
9,8	8,53	1,27
		Media 1,30

Portanto, ficam dissolvidos na media de 1,30 mgs. de hodrocloreto de trigonelina ou seja 1,00 mg. de trigonelina, que escapa à titulação e tem que ser acrescentado no calculo.

Para controlo, foram analisadas duas amostras do mesmo café, a uma das quais foram adicionados 2,27 mgs. de hidrocloreto de trigonelina, ou seja 1,80

mgs. de trigonelina. A analise deu 8,97 e 10,67 mgs. de trigonelina, respectivamente. A diferença de 1,70 mgs. concorda bem com a quantidade adicionada.

Experiencia No. 4 — Exemplos de resultados, obtidos pelo novo metodo de doseamento da trigonelina.

	Analises			
Tipo de café	1	2	3	4
Brasil crú	1.00	1.01	1,02	1,04
Franca crú	1,26	1,21	1,20	1,25
Franca torrado	0.62	0,63	0,62	
Costa Rica crú	1,06	1.06	1,05	
Java torrado	0.36	0.35	0,36	

RESUMO

A trigonelina em soluto alcalino consome exatamente 10 atomos de iodo, com o que se obtém um metodo quantitativo simples.

No decorrer do metodo de analise elaborado conseguiu-se a trigonelina, açucares redutores, como substancias consumidoras de iodo. O açucar pode ser determinado por um dos metodos correntes (p. ex., o de Bertrand), e a trigonelina pode então ser calculada pela diferença entre a titulação iodometrica e a determinação do açucar; melhor ainda é a precipitação da trigonelina em meio acido com acido fosfo-tungstico, o que a separa deste modo do açucar. Depois de dissolvido o precipitado do acido fosfo-tungstico em soluto de soda caustica, titula-se com iodo.

O novo metodo distingue-se pela execução rapida e pela alta precisão, mesmo em diminutas quantidades de trigonelina. Sua aplicação a uma grande variedade de tipos de café revelou o fato surpreendente de conter o café crú em media 1% e o café torrado 0,5% de trigonelina.

SUSAMMENFASSUNG

Es wird gezeigt, dass Trigonellin in alkalischer Lösung genau 10 Atome Jod verbraucht, womit eine einfache quantitative Bestimmungsmethode gegeben ist.

In dem ausgearbeiteten Analysengange wird das Trigonellin in sehr reinen Lösungen erhalten, die an jod-verbrauchenden Substanzen nur noch reduzierenden Zucker enthalten. Man kann nun entweder diesen Zucker nach einer der üblichen Methoden (z. B. Bertrand) bestimmen und dann das Trigonellin aus der Differenz der Jodtitration und der Zuckerbestimmung errechnen. Oder besser aber kann man das Trigonellin in saurer Lösung mit Phosphorwolframsäure fällen und auf diese Weise vom Zucker trennen. Nach Auflösung des Phosphorwolframsäure-Niederschlages in Natronlauge wird das Trigonellin mit Jod titriert.

Die neue Methode zeichnet sich durch schnelle Ausführbarkeit und hohe Genauigkeit selbst bei geringen Mengen Trigonellin aus. Ihre Anwendung auf eine grosse Zahl von Kaffeesorten führte zu dem überraschenden Resultat, dass im Rohkaffee durchschnittlich 1%, im Röstkaffee 0,5% Trigonellin enthalten sind.

BIBLIOGRAFIA

1. *Slotta, C. H.; Neisser, C. & Cardeal, A.* — Mem. Inst. Butantan **12**: 1938.
2. *Palladino, P.* — Atti R. Acad. dei Lincei Roma **3**(1):399. 1894.
   Graf, E. — Zschr. f. oeffentl. Chem. **10**:279.
   Polstorff, K. — Wallach-Festschrift :569. 1909.
   Gorter, K. — Liebigs Ann. Chem. **372**:239. 1910.
3. *Heiduschka, A. & Brüchner, R.* — J. prakt. Chem. **130**(2):11. 1931.
4. *Nottbohm, F. E. & Mayer, F.* — Zschr. Unters. Lebensm. **61**:202. 1931.
5. *Nottbohm, F. E. & Mayer, F.* — Zschr. Unters Lebensm. **63**:47. 1932.
6. *Nottbohm, F. E. & Mayer, F.* — Zschr. Unters. Lebensm. **63**:176. 1932.
7. *Nottbohm, F. E. & Mayer, F.* — Zschr. Unters. Lebensm. **61**:429. 1931.

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

612.31412:615.94:598.122

ESTUDOS QUIMICOS SOBRE OS VENENOS OFIDICOS

4. Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel

POR

C. H. SLOTTA & H. L. FRAENKEL-CONRAT

Quando iniciámos as experiencias sôbre o enriquecimento do veneno da serpente Cascavel (*Crotalus t. terrificus*), utilizamos da coleção do Instituto preparados já antigos, secados a uma temperatura de 37° e com um teor de toxicidade (1) de 1200 a 1700. Mediante varios metodos de coagulação e precipitação, conseguimos, com relativa facilidade, libertar esse veneno, levemente amarelado, das substancias não ativas que o acompanham, e obter um produto incolor com u TT (teor de toxicidade) de 2500 a 3000, o qual não conseguimos mais enriquecer. Quando tivemos oportunidade de obter maiores quantidades de secreção venenosa, bem fresca, fizemo-las secar por meio de congelação no alto vacuo, e assim conseguimos 20% de veneno seco e branco com um TT de 2000.

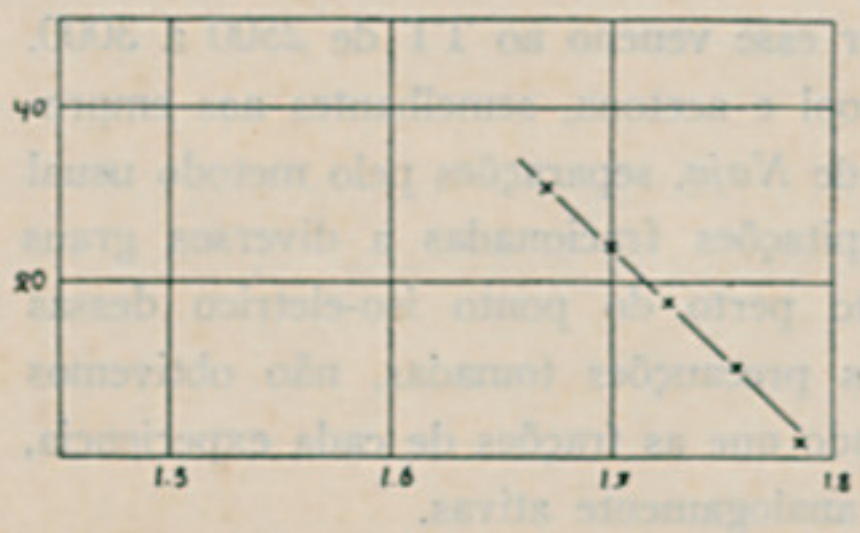
Com o emprego dos metodos que provaram ser os melhores para os preparados velhos, apenas pudemos enriquecer esse veneno ao TT de 2500 a 3000. Fizemos tambem: fracionamentos com alcool e acetona, semelhantes aos empregados por H. Wieland (2) com o veneno de *Naja*, separações pelo metodo usual com sulfato de amonio, bem como precipitações fracionadas a diversos graus de acidês, entre pH=4 até 6, por tanto perto do ponto iso-eletrico dessas proteinas venenosas. Apesar de todas as precauções tomadas, não obtivemos preparados com um TT além de 3000, sendo que as frações de cada experiencia, estudadas separadamente, eram, entre si, analogamente ativas.

Tomando como base essa experiencia, poude-se facilmente concluir que o veneno da cascavel consiste, naturalmente, de mais ou menos dois terços de uma proteina toxica, uniforme. Para remover a proteina que acompanha o principio ativo do veneno crotalico, achamos dois processos adequados:

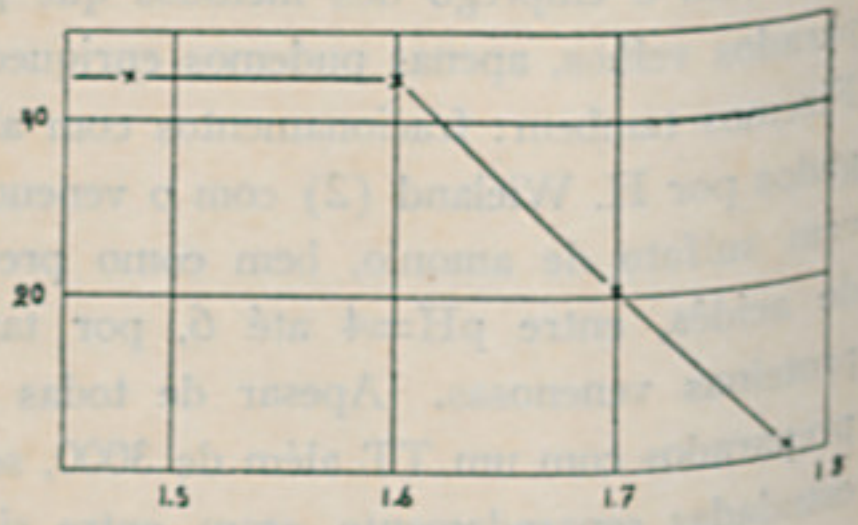
A secreção crúa ou o veneno crú, cuidadosamente concentrado como acima foi descrito, é aquecido durante 10 minutos em soluto de pH=4,1 até 70°, pelo que sómente as proteinas neurotoxicamente inativas coagulam. Leva-se o soluto a um pH=4,6 até 5000 pelo que 40% a 50% do peso do veneno sêco se precipitam com proteina ativa. Pela adição de alcool, o rendimento póde ser melhorado; assim, consegue-se separar a atividade neurotoxica quasi que quantitativamente, em forma de uma molecula uniforme, como logo veremos. Consegue-se praticamente o mesmo, diluindo-se um soluto da mencionada materia prima com soro fisiologico e levando-se com sulfato de amonio a um grau de saturação de 0,45, o que precipita as substancias anexas e sómente muito pouco da toxina. Em seguida leva-se o soluto a um grau de saturação de 0,62, por adicionamento de mais sulfato de amonio; dissolve-se em seguida o precipitado forme. Empregámos, para esse fim, o metodo de E. J. Cohn (3), recentemente aplicado à componente proteinica da "enzima amarela" (4):

Faltava ainda verificar si o preparado obtido por estes dois metodos, com o teor de toxicidade de 2500 até 3000, representava de fato uma proteina uniforme. Empregámos, para esse fim, o metodo de E. J. John (3), recentemente aplicado à componente proteinica da "enzyma amarela" (4):

A proteina a ser examinada era precipitada com sulfato de amonio em graus de saturação crescentes e as quantidades de proteina remanescentes em solução eram determinadas para os diversos graus de saturação. Traçando-se um gráfico, no qual uma das ordenadas represente as quantidades remanescentes e a outra os logaritmos das concentrações de sulfato de amonio, resultava uma reta, no caso de se tratar de uma proteina uniforme. Aplicando esse metodo à toxina obtida pelos dois processos diferentes, acima descritos, verificamos tratar-se de uma proteina uniforme. A determinação da pureza absoluta da Crotoxina foi tambem aprovada na Suecia por Nils Gralén e The Svedberg (5) com metodos totalmente diferentes.



Curva 1
(Vide parte experimental II, 1)



Curva 2
(Vide parte experimental II, 2)

Ordenadas: mgs. de «Crotoxina» em soluto.
Abcissas: 10gs. dos graus de saturação de sulfato de amonio, cf. % da saturação completa.

Denominamos de *Crotoxina* a esta proteina, apresentada pela primeira vez em estado puro, e que representa a *toxina* insulada do *veneno crotalico.* Este nome é mais curto e suficientemente diferente de "Crotalotoxina", estipulado por Faust. Este autor deu tal nome a um produto livre de azoto ,encontrado no veneno crotalico, e que não foi possivel a nós nem a outros obter novamente.

A *Crotoxina* é uma proteina tipica, incolor, cujo teor de enxofre, de 4,0 %, é bem mais elevado que o do veneno crotalico crú. Possúi um TT (teor de toxicidade) médio de 2800 e um TL (teor de lecitinase) (1) de 170. Nem a nós nem a outros foi possivel, até hoje retirar um preparado do veneno de *Crotalus t. terrificus* com maior poder toxico. E' interessante observar que tanto o teor de enxofre como os TT e TL da Crotoxina se elevaram proporcionalmente cerca de 20% a 25% sobre os do veneno crú.

Após varios ensaios preliminares, conseguimos cristalizar a Crotoxina. Para isso, dissolvemo-la em acido acetico diluido, sob aquecimento moderado, levando com piridina o soluto ao pH=4,4. Refrigerando o soluto bem vagarosamente, a Crotoxina depositava-se nas paredes sob a forma de drusas de cristais macroscopicos. Esses consistem em laminas quadradas muito finas, que geralmente se acham agrupadas, conforme mostra o desenho anexo. Vistas de lado, mostram polarização (Figs. 1 e 2).

Cristalizando-se a Crotoxina, como foi dito, de um soluto de Crotoxina amorfa a 10%, recupera-se cerca de 80% de cristais como primeira porção. Nas seguintes recristalizações (até 5 vezes) perde-se de cada vez, cerca de 10% a 15%. A Crotoxina cristalizada tem o mesmo TT e TL que a Crotoxina amorfa (TT 2800 até 2000; TL 170 a 200) e o seu teor de enxofre é o mesmo (S=4,0%). Esses teores não se elevam com as varias recristalizações; pelo contrario, pudemos verificar que a toxicidade do preparado aquecido muitas vezes para novas recristalizações à temperatura de 55° é prejudicado embora insignificantemente.

O adicionamento de sais de zinco não é necessario para a cristalização da Crotoxina. Ao contrario dos dados de outros autores, não nos foi possivel encontrar zinco no veneno fresco, nem tambem, naturalmente, na Crotoxina cristalizada, a qual na combustão não deixa vestigios de cinzas susceptiveis de posagem.

Outrora, tinhamos a impressão que os diferentes componentes fisiologicamente ativos dos venenos de cobra se concentrassem acumulados em um comum complexo. Depois de termos conseguido, pela primeira vez, insular uma molecula uniforme e cristalizada, altamente toxica, do veneno da cascavel, surgiu-nos a duvida sobre que proporções *todos* os efeitos fisiologicos do veneno dela seriam dependentes.

Já dissemos que as atividades neurotoxica e lecitinasica, isto é, os principios ativos preponderentes do veneno da cobra Cascavel, se acham totalmente