

EL ÁCIDO CLOROGÉNICO Y SU DETERMINACIÓN FOTOMÉTRICA

POR

RAMÓN SAN MARTÍN CASAMADA

Leído en la sesión del día 16 de diciembre de 1935

Aunque alguna vez (1) me he ocupado de este ácido orgánico pero estudiado únicamente bajo un punto de vista particular, en el análisis del café, vuelvo a ocuparme nuevamente como consecuencia de la importancia grande que a este ácido se ha concedido y prologando así el estudio que de él veníamos haciendo, pudiendo dar a conocer como resultado algunos datos nuevos. Datos, que principalmente interesan a aquéllos que se ocupen de la química y fisiología vegetales según podemos ver por los estudios que de él se han hecho.

Empezaremos el trabajo presente haciendo un bosquejo histórico primero, y estudiando sus propiedades químicas después, para de esta manera conocer de ello cuanto nos pueda interesar.

El ácido clorogénico, fué aislado primeramente en el café, habiéndose descrito después en numerosos vegetales. Donde primitivamente interesó su estudio, fué en dicho material debiéndose su descubrimiento a Payen (2) sobre la mitad del siglo pasado y lo encontró bajo la forma de sal doble de cafeína y de potasio. Aunque como a primera vista pudiera indicar que por su nombre fuera algún compuesto de cloro, no es así. Su nombre, clorogénico, se lo dió su descubridor por que la solución amoniacal del ácido era coloreada en verde por la acción del aire. Pasados unos cincuenta años de su descubrimiento Griebel y Gorter (3 y 4) lo estudiaron más detenidamente y realizaron algunas experiencias encaminadas a conocer su verdadera constitución química, que hasta entonces era totalmente desconocida. Solamente se conocía una sustancia tánica en el café, que fué llamada Gerbersaure o ácido tánico de los alemanes.

Gorter, reconoció que este ácido tánico no era tal ácido, sino una

(1) R. San-Martín. Tesis Doctoral. Junio 1934

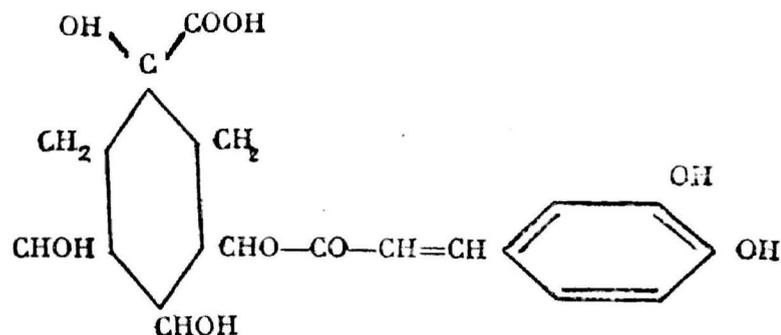
(2) Payen.—Arch. de Chemich. et Phys. (3) 26 (1848)

(3) Griebel.—Dissert München (1903)

(4) Gorter.—Arm. 358, 327 (1908); Arch. Pharm. 247, 184 (1909)

mezcla de distintas sustancias en las que el componente principal era el ácido clorogénico. Prosiguiendo sus estudios, encontró una segunda sustancia que presentaba también naturaleza tánica cristalizabile, llamada ácido cofálico. Finalmente, el que pudo dar a conocer su constitución química fué Freundenberg ayudado por Fischer e incluyeron al ácido que nos ocupa, entre las sustancias denominadas por este último dépsidos, de la palabra griega que significa tanino.

Según Freundenberg, el dépsido ácido clorogénico, está formado por los ácidos caféico y quinaico uniéndose un grupo carboxílico de aquél a un grupo oxidrilo de éste. La fórmula de constitución asignada es la siguiente:



Hemos señalado hace un momento, que el ácido clorogénico presentaba gran importancia particularmente en fisiología vegetal. Así es en efecto.

A Oparin, (5) se le deben los primeros estudios sobre el mecanismo que juega el clorogénico en la fisiología vegetal. Se le consideró de gran importancia en el ciclo de la respiración de las células vegetales, como portador de oxígeno para llevarlo a los aminoácidos procurando su combustión. Así mismo, se ha considerado como un cromógeno respiratorio ya que con el oxígeno molecular produce una materia colorante oxidada de color verde (pigmento respiratorio), a la vez que este oxígeno es transformado de nuevo en clorogénico, habiéndose comprobado además, que cuantitativamente, el clorogénico no variaba deduciéndose de esto, por consiguiente, que actuaba como catalizador. En la oxidación por el oxígeno del clorogénico, tiene importancia la concentración del hidroxiliones así como también, la

(5) Oparin.— *Biochem. Ztsch.* 182. 155 (1927)

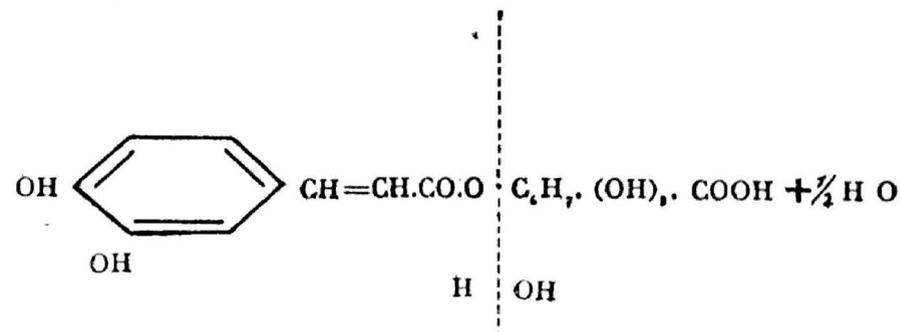
presencia en los vegetales de feno-oxidasa y reductasa. El Sistema formado por las oxidasas ácido clorogénico y reductasas, es según Oparin, el modelo natural de la respiración de las plantas.

Esto es lo más característico de su función fisio-vegetal y aunque se ha trabajado muchísimo sobre ello, no vamos aquí a detenernos hacer un profundo estudio sobre tan importantes cuestiones, pasando a hacerlo de sus más importantes propiedades químicas, algunas de las cuales sirven para distinguirlo y determinarlo cuantitativamente.

Cristaliza el ácido clorogénico del agua en laminitas anhidras. P. F. 206-207°. Sabor astringente débilmente ácido y poco soluble en agua. Más soluble en alcohol etílico, isobutílico y acetona; débilmente soluble en éter acético y en el cloroformo, insoluble en el sulfuro de carbono. Desvía el plano de la luz polarizada y el valor encontrado por Gorter para su poder rotatorio es de 33°. Es más fuerte que el acético, pudiéndose valorar con legía de sosa sin emplear indicadores ya que el punto neutro se acusa por el color amarillo que toma la solución.

Por el *Mucor mucedo* y el *Penicillium*, se transforma en ácido caféico.

Freundenberg, indicó que por las levaduras se forman tannasas y que el ácido clorogénico, no era según Gorter un compuesto carbonado, sino una combinación estérea producida por los ácidos caféico y quinaico. El desdoblamiento en éstos,



se produce por los álcalis. Por la acción de los ácidos se descompone.

Se encuentra, generalmente, bajo la forma de sal doble de cafeína y de potasio y está muy repartido en el mundo vegetal.

Después de conocer su constitución y saber que está contenido en muchos materiales que contienen bases xánticas, fuimos a investigar en aquellos que por su composición química (valga la frase) se asemejaban al café ya estudiado, advirtiendo, desde luego, que no tomamos esto como una razón poderosa y que no sacamos de ello ninguna consecuencia.

Así pues, se pensó, primeramente, en el material *Camellia theifera* o *Thea sinensis* (thé de la China), puesto que contiene como el café, además de cafeína, teofilina, etc., ácido cafeico, que ya sabemos es constituyente del clorogénico. Después se pensó en el *Ilex paraguayensis* o hierba mate de los americanos, que también contiene cafeína y llegamos al mismo resultado. Existen, por último, otros materiales vegetales en los cuales tampoco se había investigado el clorogénico y que también tienen bases xánticas como la urea y que son la *Lens esculenta* o lenteja y *Phaseolus* o judías. Se indica solo el género *Phaseolus* porque no todas las especies que hemos examinado contienen el ácido. En efecto, el *Phaseolus vulgaris* o judía blanca corriente, carece de él o si lo tiene es en tan escasisima proporción, que escapa a nuestras pruebas posibles. Lo hemos encontrado, sin embargo, en la especie *Phaseolus multiflorus* conocida vulgarmente con el nombre de judía pinta.

Es curioso que, siendo dos especies del mismo género, difieran en no tener una de las dos el clorogénico. Nosotros deducimos de esto, que pueda tener alguna relación con la presencia o no del color externo y natural del material cosa que no parece nada absurda, después de cuanto hemos expuesto anteriormente respecto a la función del ácido como cromógeno respiratorio. Pero es que, además, hemos podido observar dos hechos que vienen a apoyar nuestra suposición y son los siguientes. En primer lugar, se ha ensayado también el material *Cicer arietinus* o garbanzo que, como sabemos, es exteriormente también casi incoloro y con él hemos obtenido el mismo resultado que con el *Phaseolus vulgaris*, es decir, que no hemos encontrado clorogénico. Por otra parte, de la investigación del *Lens esculenta*, hemos podido ver, que el ácido clorogénico estaba contenido en la cutícula o corteza exterior y no, o al menos escasisimamente, en la parte interior. De esta forma podemos apoyar aún con más decidido empeño cuanto hemos dicho antes.

Manera de proceder.—Primeramente se ha estudiado su extrac-

ción, empleando para ello diversos medios. Se ha probado su solubilidad en agua y alcohol frío y calientes, haciendo pruebas cualitativas, para comprobar el agotamiento total del material y, aunque las proporciones del ácido varían de unos materiales a otros, se llega, sin embargo, rápidamente a él, con pocas extracciones, sean con alcohol o sean con agua. Es muy práctico el método que ya empleamos cuando lo estudiamos en el café, consistente en tener el material primeramente en maceración algunas horas, con un volumen determinado de una disolución concentrada de sal común.

Reacciones de identificación.—En primer lugar, tenemos la reacción de W. Hoepfener (6) que, aparte de ser reacción característica del clorogénico, es la que nos sirve para su determinación fotométrica. Es la que sigue: el ácido o sus sales en disolución ácida tratados por los nitritos alcalinos toma una coloración intensa que en presencia de sosa pasa a carmín o rojo.

Con el acetato de plomo, forma un precipitado amarillo, característico de clorogenato de plomo.

Con el amoníaco, toman sus soluciones una coloración verde. Recuerdese a qué es debido el nombre que tiene el ácido.

Entre otras reacciones, no tan características, tenemos: con el cloruro férrico toma unas coloraciones que varían entre verdes, azules y violetas. Con la sal de urano coloración o precipitado rojo, según la proporción.

Ensayadas estas reacciones todas, con nuestros materiales, hemos tenido resultados positivos con ellos y, pudiendo juzgar a priori, que el material que parece que contiene más ácido clorogénico, es el mate. Con respecto a éste, diremos, además, que ha habido autores que han señalado que las hojas de mate, tratadas por el amoníaco, coloreaban a éste de un verde intenso, pero sin atribuir la causa a ninguna razón concreta, y creo podemos asegurar nosotros ya a cual es debida.

Determinación cuantitativa.—Entre los métodos de determinación cuantitativa, debemos señalar el de Griebel, (7) que está fundado en el desdoblamiento del a. clorogénico, para valorar volumétricamente el caféico que queda libre.

(6) Hoepfener.—Chem. Ztg. 591 (1932)

(7) Griebel.—Z.an. Chem. 93. 230 (1934)

Los de W. Plücker y W. Keilholz (8), que han estudiado detenidamente la determinación en el café y que son los siguientes: Preparan primeramente unos líquidos extractivos, en los cuales hacen la determinación por los métodos llamados por ellos A, B, C₁, C₂, C₃ y C₄. El A, está fundado en la precipitación con el acetato de plomo, siendo método gravimétrico. El B, por el sulfato de plomo, igualmente. Con el C₁, hacen una valoración electrométrica, en C₂ determinan el residuo seco, en el C₃ pesan el ácido caféico aislado y en el C₄ titulan éste volumétricamente.

También éstos han estudiado la determinación polarimétrica ya efectuada por H. Junary (9).

Por último, existe el método fotométrico, que es el que hemos aplicado y estudiado, método que creemos muy cómodo y preciso. Además, hemos empleado este método, para poder comparar fácilmente los resultados obtenidos, operando en igualdad de condiciones con todos nuestros materiales y ya veréis como llegamos, con cierta precisión al fin que nos proponemos, pues determinamos no sólo la proporción cuantitativa del clorogénico en cada uno de los materiales, sino que también, como tiene por fundamento una colorimetría, podemos efectuar a la vez las colorimetrías relativas o examen de color de los líquidos coloreados, comparando unas soluciones con otras, indicándonos, a la vez, datos muy precisos sobre las condiciones en que se opera, como cantidad de sustancia, filtros de color, tamaño de cubetas, etc.

Aunque todos conocéis la fotometría y su fundamento, me permitiréis, sin embargo, que haga algunas aclaraciones para mejor poder daros cuenta de lo que significa cuanto se ha hecho y que pasamos a exponer.

Se ha empleado el llamado fotómetro gradual de Pulfrich, basado, como sabéis, en poder realizar colorimetrías sin necesidad de tener presente para efectuar las determinaciones el líquido coloreado patrón. Es decir, que se funda en la absorción de la luz al atravesar ésta las sustancias coloreadas, siendo, como es natural, mayor o menor la absorción que experimenta la luz, según sea la concentración de la

sustancia y teniendo, por consiguiente, que, a mayor concentración mayor absorción.

Bunsen y Roscoe, que estudiaron detenidamente la absorción de la luz, fueron los que idearon lo que se conoce por *Coefficiente de Extinción*, entendiéndose por tal, el valor recíproco del espesor de una capa trasparente de una sustancia que es necesario para que la intensidad de la luz que atraviesa quede reducida a 1/10.

Para deducir esto y determinarlo prácticamente, se han deducido fórmulas que no voy a exponer, pues las conocéis, recordando si, únicamente, que como resultado de ellas, para determinar el coeficiente de extinción de cualquier sustancia hay que hacer pasar la luz por una capa de 1 centímetro de espesor, medir su intensidad, buscar su logaritmo y darle a éste un signo contrario. Resulta que a mayor absorción corresponde un menor coeficiente de extinción.

En la práctica, esto no se hace así, pues se han ideado unas tablas en las que para cada valor de absorción de la luz por ciento, se encuentra su respectivo coeficiente de extinción. O bien, en lugar de ellas, se construyen las llamadas curvas de reducción.

Conociendo el coeficiente de extinción, podemos determinar la concentración del ácido clorogénico, aplicando la ley de Beer, que dice: Las concentraciones de las disoluciones de un mismo cuerpo son proporcionales a sus coeficientes de extinción. Si os fijáis bien en ella, fácilmente se comprende que, además de determinar la concentración partiendo de los coeficientes, podemos y debemos para una concentración y coeficientes tipos, determinar la de varias disoluciones distintas y comparar, además, éstas entre sí.

Por otra parte, como empleamos el fotómetro espectral, formados estos, como sabéis, por la combinación de un fotómetro con un aparato espectral, sustituida en el nuestro con el empleo de los llamados filtros de luz, que representan los colores del espectro, correspondiendo, por consiguiente, a cada uno de ellos una determinada longitud de onda, es imprescindible se efectúen las determinaciones, en primer lugar, con el filtro de luz más adecuado y en segundo lugar que todas las determinaciones para una misma sustancia se hagan con el mismo filtro, con más razón aún, si queremos comparar colorimétricamente las disoluciones, pues fácilmente se comprende que la absorción de la luz y, por consiguiente el coeficiente de extinción, han de variar notablemente para cada filtro.

(8) W. Plücker y W. Keilholz Z. an. Chem. 96, 231 (1934)

(9) Z. an. Chem. 96 249 (1934)

Estos filtros de la serie espectral, llamados filtros S; 43, 47, 50, 53, 57, 61, 72 y 75, abarcan la gama de colores del espectro y tienen sus respectivas longitudes de onda de 435, 462, 494, 530, 572, 617, 728, 750.

El primer cuidado que habrá que tener para la determinación colorimétrica, será la elección del filtro de luz más conveniente. Para esto basta tener en cuenta que lo será, aquél que tenga propiedades más absorbentes de la disolución o, dicho de otra manera, el que conduzca a la menor transparencia. Para nuestro caso, ácido clorogénico, reacción coloreada de Hoepfener, ya fué determinado por los Thiel (10) así como también el coeficiente de extinción para una determinada cantidad de sustancia pura.

Con los datos que poseemos, tenemos lo suficiente para practicar nuestras determinaciones cuantitativas fotométricas.

Debo advertir, que éstas han sido practicadas, no con todos los materiales que hemos estudiado, pues lo han sido sólo con el mate, café (mezcla de Moka y Puerto Rico) the, belladona y, por último, despreciando los otros dos indicados, por no tener tanta importancia para nosotros, hemos incluido la hoja de *Nicotiana tabacum* o Tabaco, ya que habiéndose señalado como indicios en ella el clorogénico, no ha sido indicada la proporción.

Condiciones en que se ha operado. En todos los materiales de igual manera. En primer lugar, el método de extracción, ha sido el mismo y ya descrito antes, llevando los líquidos extractivos a un volumen fijo de 250 c. c. Aunque podíamos haber variado las condiciones, dada la distinta riqueza de clorogénico en los diversos materiales, se ha hecho así para facilitar e igualar los cálculos y poder comparar los resultados obtenidos posteriormente.

Después de haber extraído el clorogénico y llevado al volumen fijo de 250 c. c. se tomó una parte del líquido, agitando con tierra de infusorios y se filtró. En el líquido filtrado se hizo la fotometría de la manera siguiente: 5 c. c. del líquido, con 0'5 c. c. de una disolución saturada de nitrito sódico, 7 grs. de urea, 0'5 c. c. de ácido acético concentrado, agitando, dejando depositar unos segundos y añadiendo de golpe 5 c. c. de sosa al 33%, coloración roja más o menos in-

lensa según proporción de clorogénico. Completar a 100 c. c. y llevar el líquido coloreado al fotómetro.

Antes de hacer las medidas y después los cálculos, hay que tener en cuenta que según la definición de Coeficiente de Extinción, hay que observar o hacer la relación del líquido coloreado a 1 cm. de espesor. Claro está, que se puede usar un espesor cualquiera según la intensidad de color del líquido.

Finalmente, con los datos obtenidos podemos verificar las cuantitativas.

En primer lugar tenemos, Coeficiente de extinción para la sustancia pura, 0,78 para 0,05 grs. de ácido clorogénico.

Designando a estos por las letras C y E y C' y E', a las concentraciones que se buscan y sus respectivos coeficientes de extinción, tendremos aplicando la ley de Beer.

$$C' = \frac{C}{E} \cdot E'$$

pero teniendo en cuenta, que como hemos observado el líquido coloreado de 100 c.c. y el valor de $E=0'78$ es para un litro de disolución, nosotros lo tenemos que hacer igual a 78.

O sea que para buscar nuestras concentraciones nos bastará multiplicar el coeficiente de extinción hallado y referido a 1 cm; por el coeficiente 0'0064.

Los coeficientes de extinción hallados y por lo tanto las concentraciones de ácido clorogénico en nuestros materiales son:

MATE: 0'24 y 7 %. CAFE (mezcla): 0'143 y 4'50 % (crudo) y 0,081 y 2'50 % (tost°.)

THE: 0'09 y 2'50%. BELLADONA: 0'076 y 1'81%. TABACO: 0'032 y 0'54%.

MATERIAL: 1 gr. Filtro S 47 y cubeta 1 cm.

Observando las gráficas representativas de los coeficientes de extinción, se aprecian claramente las diferencias de color de los líquidos y la variación de los coeficientes según los filtros.

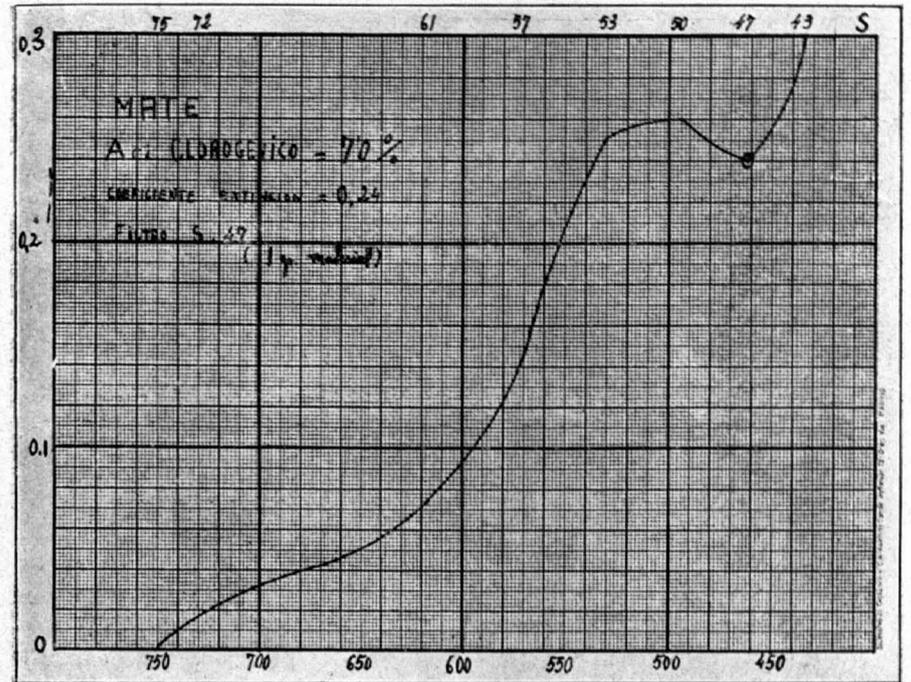


Figura 1.^a

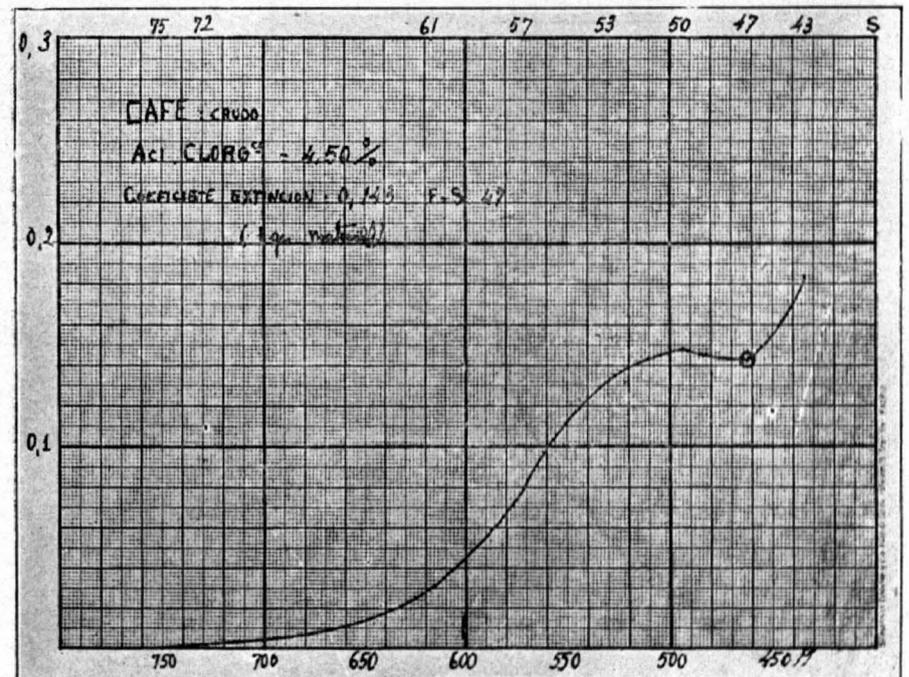


Figura 2.^a

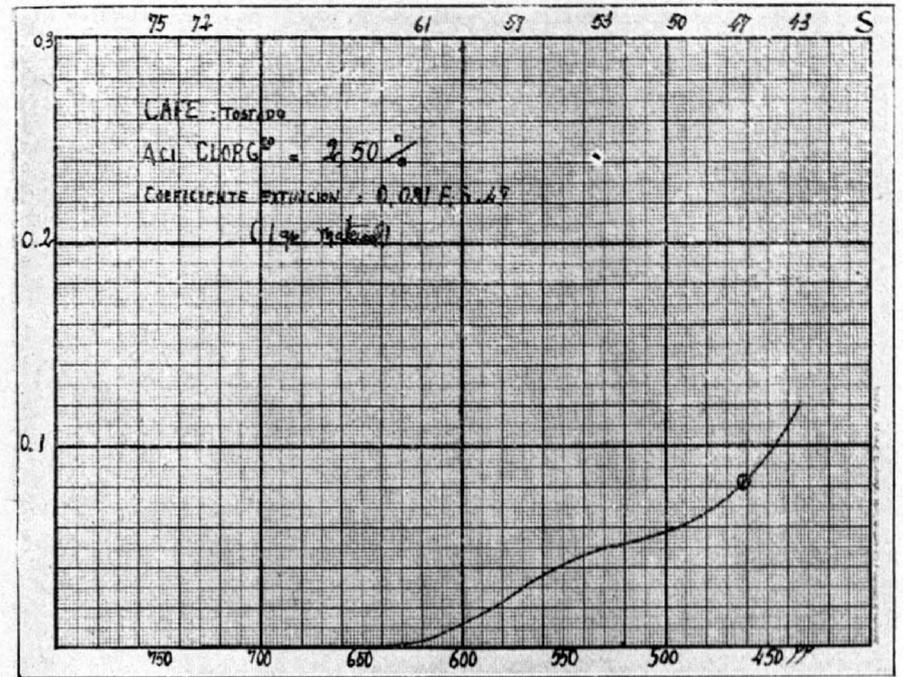


Figura 3.^a

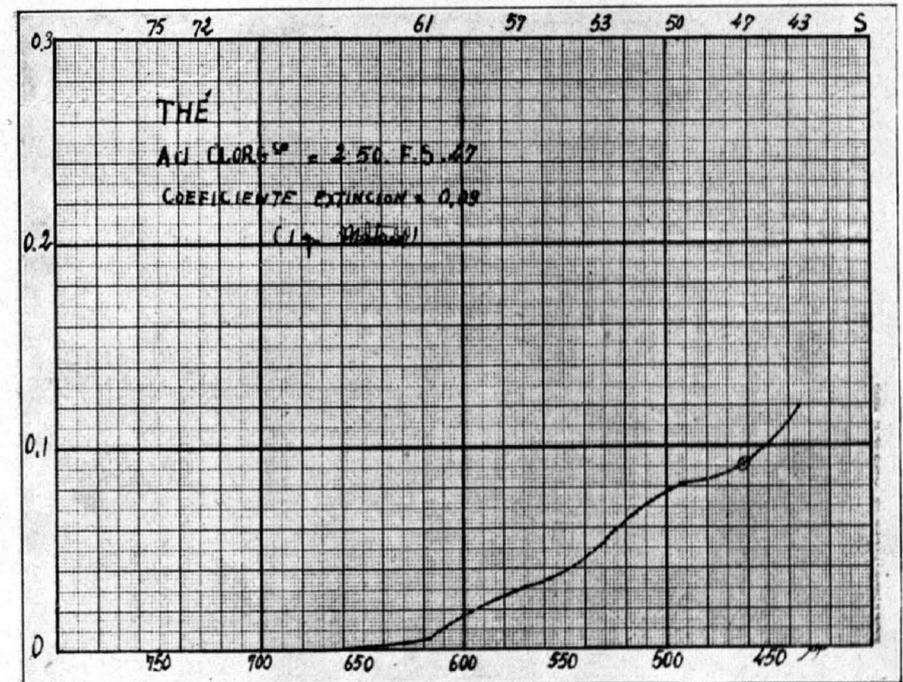


Figura 4.^a

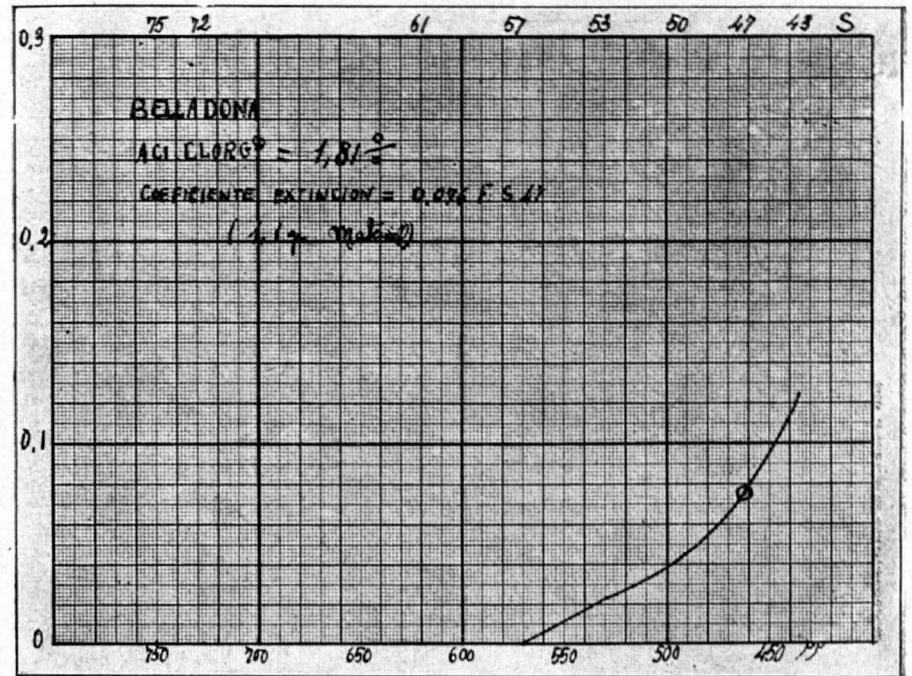


Figura 5.^a

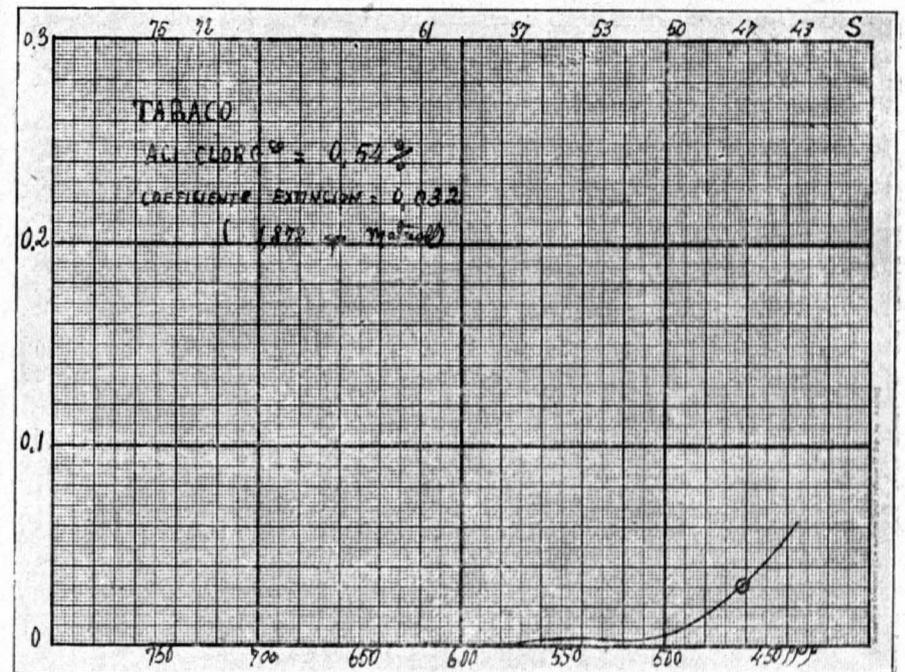


Figura 6.^a