

Tesis de Posgrado

Estudio de los ácidos clorogénicos y sustancias relacionadas de la yerba mate

Badin, Pedro Antonio

1961

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Badin, Pedro Antonio. (1961). Estudio de los ácidos clorogénicos y sustancias relacionadas de la yerba mate. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1085_Badin.pdf

Cita tipo Chicago:

Badin, Pedro Antonio. "Estudio de los ácidos clorogénicos y sustancias relacionadas de la yerba mate". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1961. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1085_Badin.pdf

FOYBA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

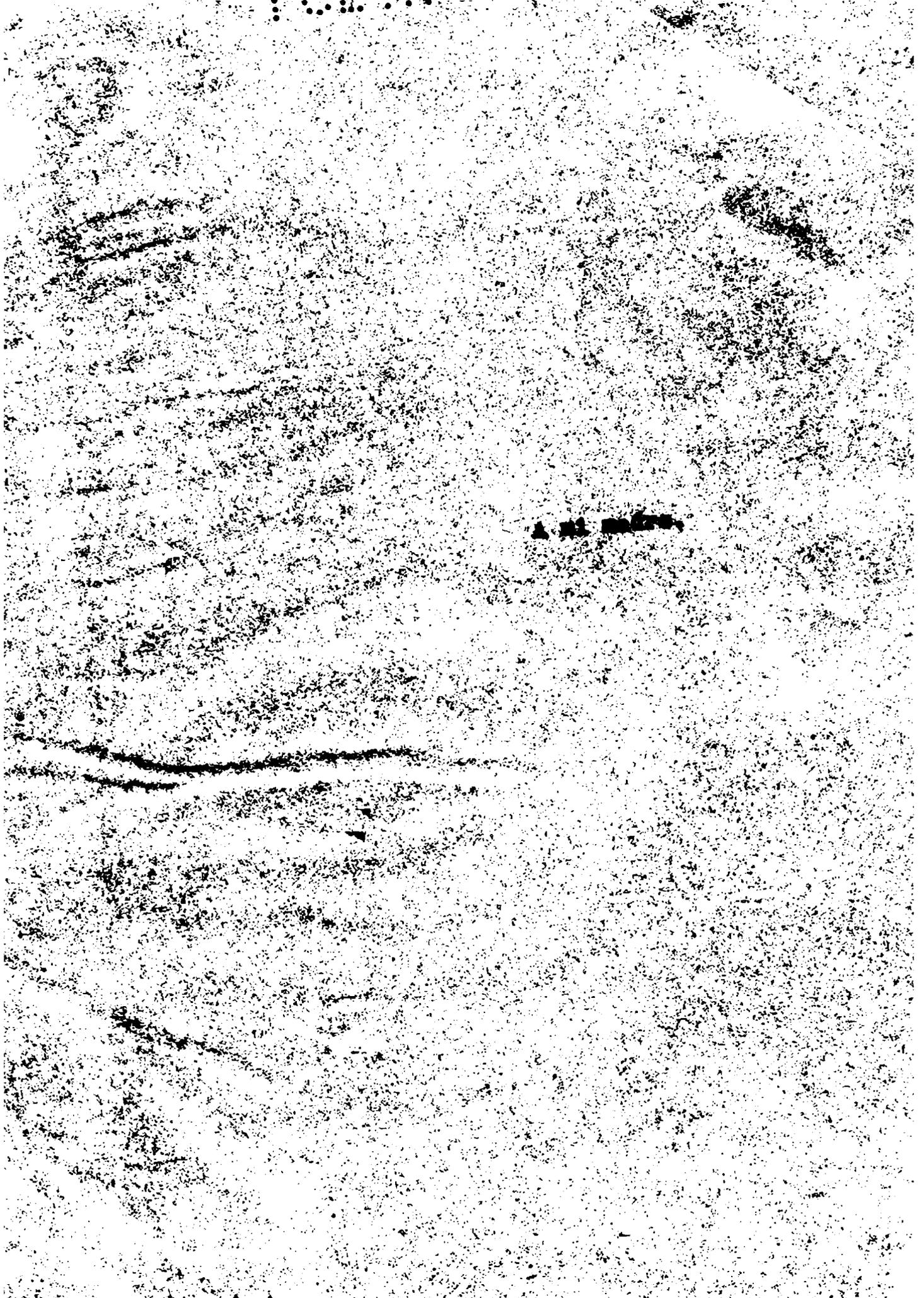
**Estudio de los ácidos clorogénicos
y sustancias relacionadas
de la yerba mate.**

Pedro Antonio Badin

TESIS! 1097

**Tesis presentada para optar al
Título de Doctor en Química.**

Año 1961



AGRADECIMIENTO.

Al Dr. Venancio Deulofeu, a cuya dirección y constante estímulo se debe este trabajo, presento aquí el testimonio de mi mayor agradecimiento.

Deseo también expresar mi reconocimiento al Dr. Oscar Galmarini quien con su consejo y experiencia facilitó la terminación de este trabajo en los Laboratorios de Investigación de E. R. Squibb & Sons Argentina S.A.

Asimismo cumplo con el grato deber de mencionar la útil colaboración de mi esposa, especialmente en las últimas etapas de este trabajo.

INTRODUCCION

El grupo de los ácidos clorogénicos está formado por los isómeros que resultan de esterificar un hidróxilo del ácido quínico con el ácido cafeico.

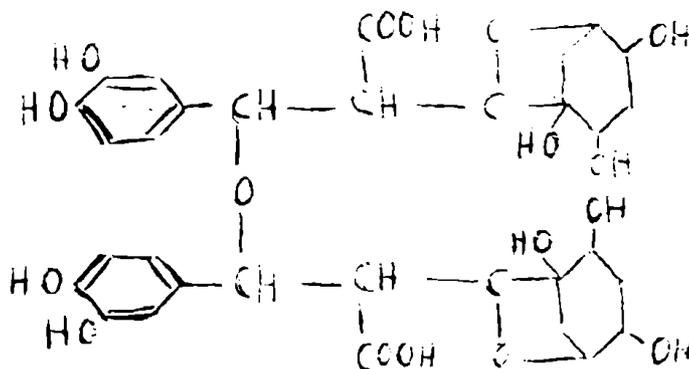
De los cuatro isómeros posibles, el mejor estudiado y el único que hasta ahora ha sido sintetizado es el ácido clorogénico ó 3-cafeil-quínico. De los otros isómeros se ha estudiado con detalle la estructura del ácido isoclorogénico, encontrando que se trata del 5-cafeil-quínico, mientras que el ácido neoclorogénico probablemente sea el isómero con el sustituyente en 4. También se encuentra descrito en la literatura un ácido pseudoclorogénico, pero sin detallarse ninguna experiencia que aclare su estructura.

Un compuesto relacionado con los anteriores es la cinarina, la cual es el ácido 1,4-dicafeil-quínico, la que además ha sido sintetizada de tal manera que pudo confirmarse su estructura.

ACIDO CLOROGENICO

El ácido clorogénico fué descubierto en 1849 por Payen, quien encontró que en el café había un ácido que formaba sales fácilmente cristalizables con cafeína y potasio. Lo llamó ácido clorogénico porque sus soluciones amoniacales se coloreaban de verde en el aire.

Recién los trabajos de Gorter (1908-1911) dieron una idea más clara de la estructura molecular de este ácido. Este autor encontró que las soluciones de hidrato de potasio al 30% le descomponían en ácido cafeico y ácido quínico. Con ácidos minerales diluidos, en caliente, obtuvo ácido quínico, ácido cafeico, anhídrido carbónico y un producto aceitoso que no pudo cristalizarse. En base a sus experiencias, Gorter propuso la siguiente estructura para el ácido clorogénico:



La misma, correspondiente a la fórmula $C_{32}H_{38}O_{19}$, resultaba de la unión de dos fracciones de ácido "hemiclorogénico" por un puente oxigenado. Si bien los datos experimentales de Gorter podrían haberle conducido a la fórmula correcta, este autor no le dió importancia

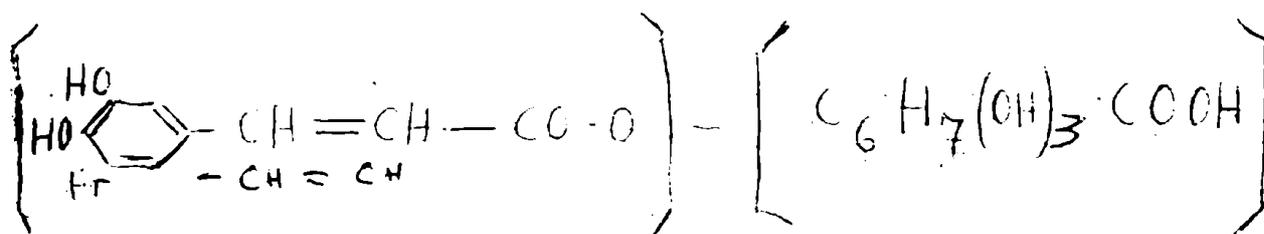
al hecho experimental que el ácido cleregénico podía hidrolizarse por medio de enzimas hidrolíticas.

Freudenberg (1920) estudió críticamente esta fórmula y demostró que debía ser un éster del ácido cafeico con el ácido quínico, porque consiguió aislar estos ácidos tratando el ácido cleregénico con una enzima aislada del Aspergillus niger. Estos hongos producen enzimas que pudieron aislarse (Freudenberg - 1920) y aplicarse a la hidrólisis de taninos bajo el nombre de tanasas. La importancia práctica de las tanasas aisladas de Aspergillus y Penicillium residía en que permitía dar el grado de hidrólisis de los taninos gálicos (Nichelsen, Rhind - 1924) y en este caso fué utilizada también para producir la hidrólisis de un éster. De acuerdo a los resultados de Freudenberg, el ácido cleregénico debía ser considerado como un éster de los ácidos cafeico y quínico.—

Es un hecho conocido que con soluciones de cloruro férrico los taninos derivados del ácido gálico dan coloración azul o negra, mientras que los taninos derivados del ácido protocatequico dan coloración verde. Tanto el ácido cleregénico como el ácido cafeico daban coloración verde con soluciones de cloruro férrico, aunque no fuesen verdaderos taninos, como se verá más adelante. Esto indicaba que ambos tenían libres un par de hidroxilos fenólicos en posición orto, como los que posee el ácido protocatequico, y esto solamente podía ocurrir si el áci-

de clorogénico tenía una estructura en la cual los hidroxilos orto de la porción ácido cafeico estaban libres. De otra manera no tendría explicación fácil la reacción tan fuertemente positiva con el cloruro férrico.

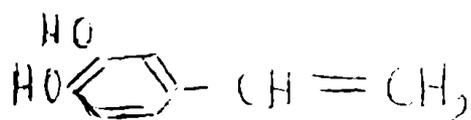
La fórmula del ácido clorogénico podría esquematizarse entonces en la siguiente forma, sin que fuese en ese momento posible establecer cuál de los hidroxilos del ácido quínico estaba esterificado por el ácido cafeico:



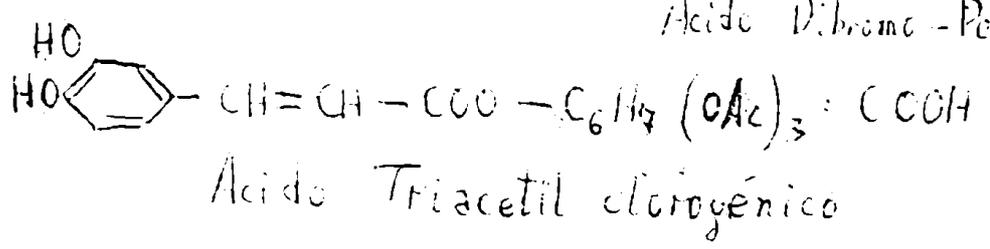
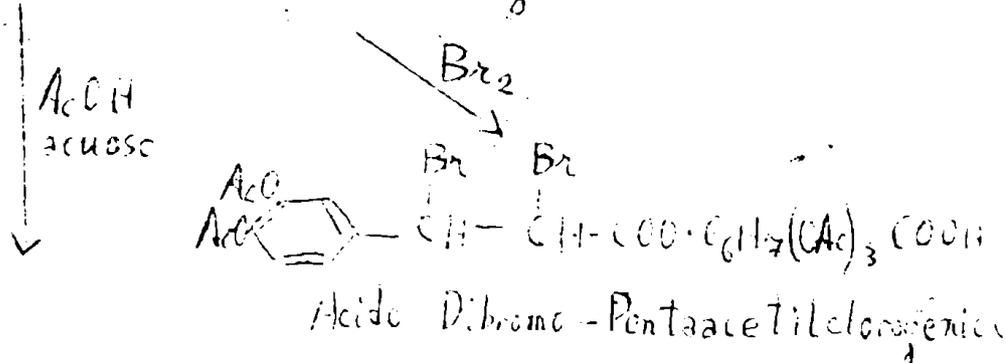
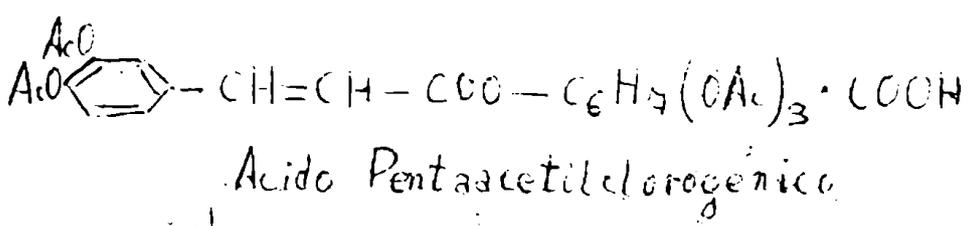
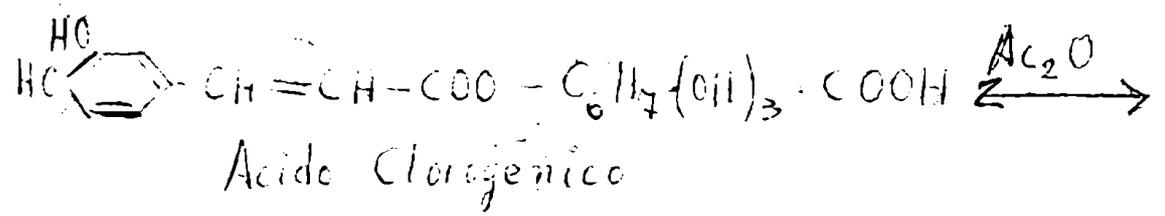
Acido Cafeico

Acido Quínico

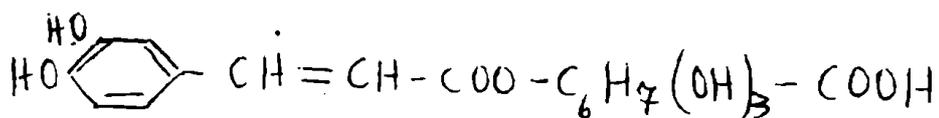
El desprendimiento de anhídrido carbónico que observó Gorter se debía a una descarboxilación del ácido cafeico, pues este último al ser calentado con ácidos minerales diluidos se descompone produciendo también ese gas. Según Freudenberg (1920) el producto amarillo que Gorter no pudo aislar, era el 3,4-dihidroxiestireno.



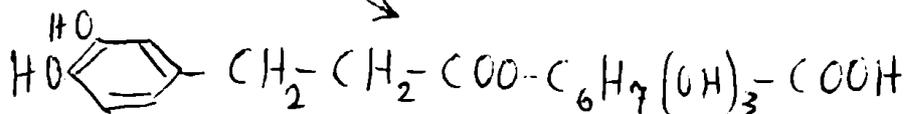
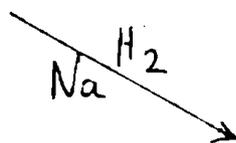
Gerter (1908) había ya preparado un derivado cristalino pentaacetilado del ácido clorogénico, lo que indicaba la presencia de cinco grupos hidroxilo libres. Este ácido no daba, por supuesto, ninguna reacción con el cloruro férrico, pero en cambio seguía combinándose con una molécula de brome en solución cloroférrica. Desde los restos acetilos mencionados eran relativamente lábiles a la hidrólisis en solución acuosa catalizada por ácidos. La acción del ácido acético al 20% permitió obtener un producto cristalizado que resultó ser el ácido triacetil-clorogénico, el cual daba reacción verde intensa con el cloruro férrico. Este hecho era una demostración más que el ácido clorogénico era el producto formado por la condensación (esterificación) del ácido cafeico con un hidroxilo del ácido quínico.



Como el ácido clorogénico contiene una doble ligadura que además está activada por estar conjugada con el núcleo bencénico y con el carbonilo, resultaba explicable no solamente su reactividad con bromo que debe considerarse normal sino también su fácil reducción por el hidrógeno para formar el dihidro-derivado correspondiente. El ácido clorogénico tratado con amalgama de sodio da lugar a la formación de un dihidro-derivado $C_{16}H_{20}O_9$, el cual por hidrólisis ácida o alcalina se transforma en los ácidos dihidrocafeico y quínico más fácilmente que a partir del ácido clorogénico original. Los rendimientos en ácido quínico son muy buenos y puede aplicarse como método de preparación del ácido quínico muy puro a partir de ácido clorogénico (Watanabe - 1936).



Acido Clorogénico



Acido Dihidroclorogénico

Mientras que la estructura del ácido cafeico ya era conocida desde 1866 (Hlasivetz), la estructura del ácido quínico y especialmente los aspectos estereoquímicos del mismo recién pudieron ser aclarados por los trabajos de Fischer y Dangschat (1932).

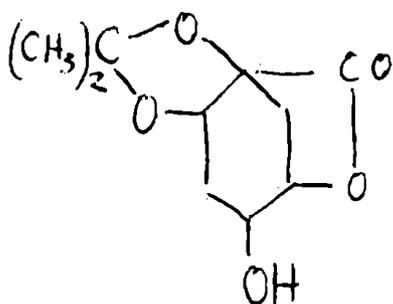
Estos autores aclararon la estructura del ácido

quinico de la siguiente manera:

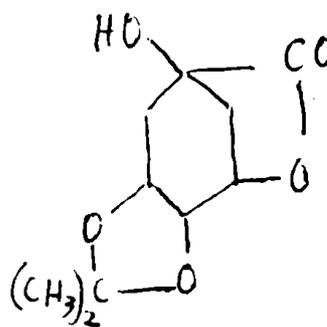
La existencia de dos hidroxilos en posición 4 y 5 ó 3 y 4 ya se conocía porque el ácido quinico daba ácido pretecatéquico por tratamiento con agua de bromo. También el hidroxilo en posición 1 era conocido porque el ácido quinico calentado con ácido sulfúrico concentrado desprendía óxido de carbono, o sea que era un ácido α -alcohólico.



Hirviendo ácido quinico con acetona en presencia de cloruro de cinc se obtuvo un acetón-derivado de la lactona del ácido quinico, para el cual eran posibles dos estructuras:



I



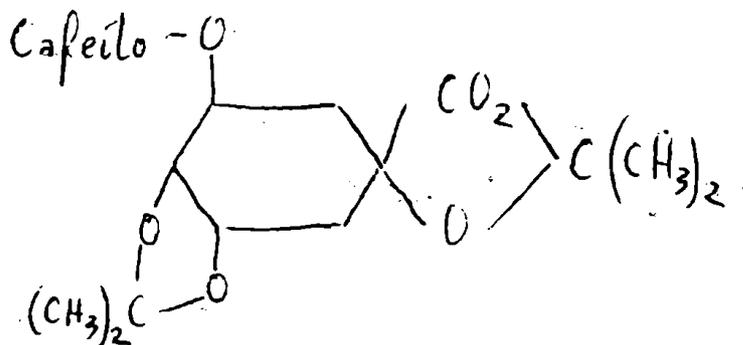
II

La segunda estructura permitía explicar sus reacciones, lo que no ocurría con la primera. Por tratamiento con hidrazina y ácido nítrico el anillo lactónico presente en la estructura (II) se abre y se forma la azida

to aceténico.

Conociendo la fórmula estructural del ácido quínico, la hipótesis más plausible sobre la estructura del ácido cleregénico era aceptar que la unión cafeico-quínico se realizaba por medio del hidroxilo secocado en el carbono-3. De otra manera la posición favorable del carboxilo libre y del hidroxilo-3 habrían permitido la formación de una lactona del ácido cleregénico, lo que nunca se pudo observar, incluso cuando se le sometió a un tratamiento a condiciones de anhidrización que habitualmente conducen a la formación de lactonas. Ni aun la acción del anhídrido acético determinó su formación sino que se obtuvo el ácido penta-acetil-cleregénico, con el carboxilo libre.

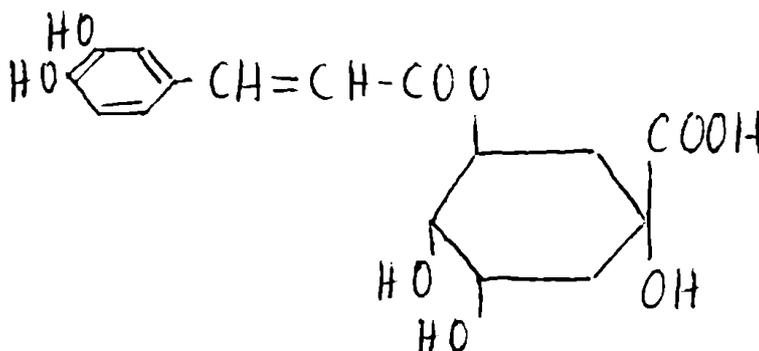
Esta estructura fué confirmada por el estudio de los productos de condensación de la acetona con el ácido cleregénico, por acción del cloruro de cinc. Se obtuvo un diacetón-derivado que era insoluble en solución de bicarbonato de potasio



Fischer y Dangschat (1932) interpretaron este hecho admitiendo que uno de los grupos aceténicos se condensa-

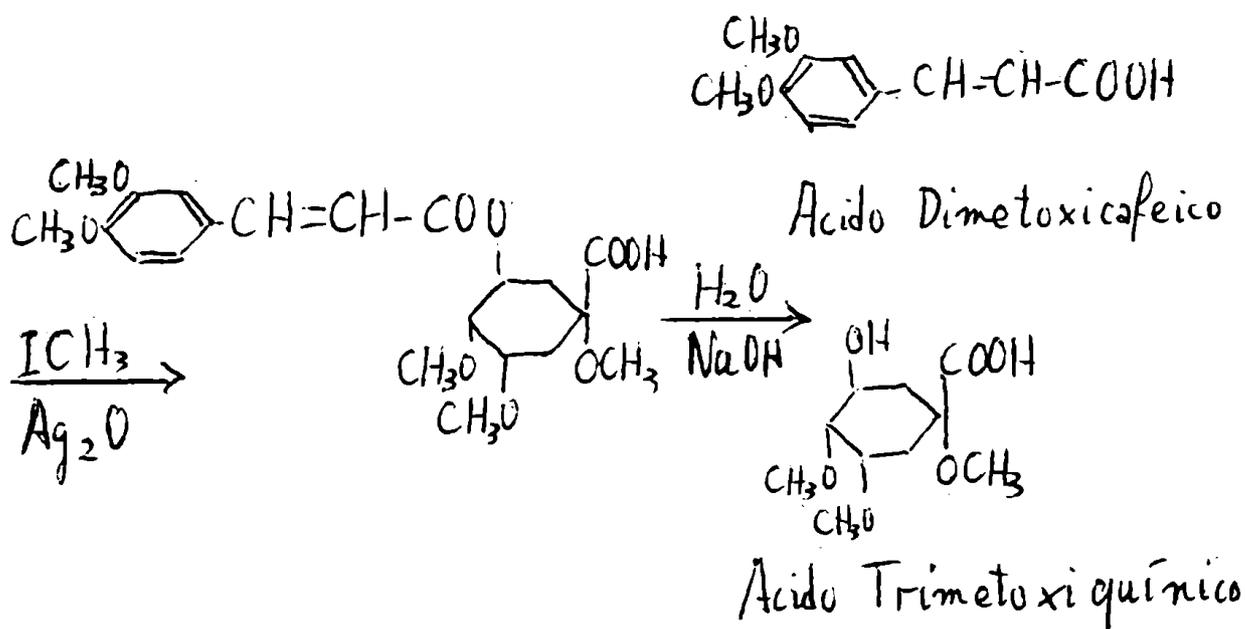
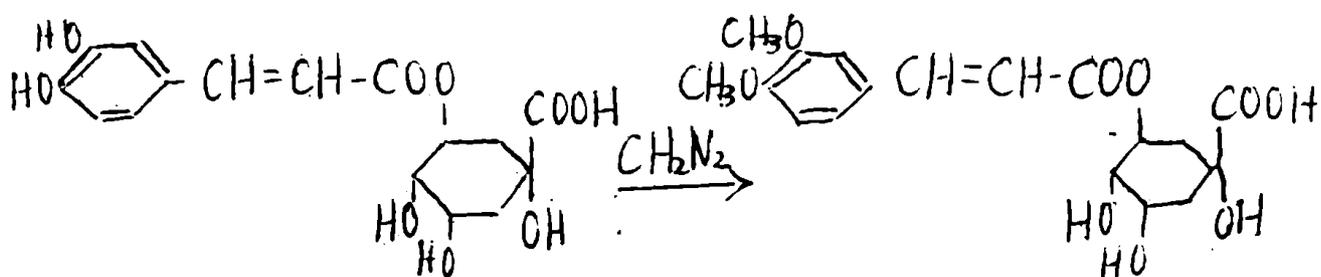
ba con el hidroxilo en posición 1 y el carboxilo libre simultáneamente, propiedad que habían encontrado ya en el ácido tartárico (Fischer y Taube - 1927). La condensación del segundo grupo acetónico debía realizarse con los hidroxilos presentes en los carbonos 4 y 5, hecho coincidente con lo encontrado en el ácido quínico, donde sólo podían dar complejo acetónico el par 4 - 5 por estar en posición cis y no el par 3 - 4 que está en posición trans.

Por lo tanto, el ácido cleregénico sólo podía ser un metadépsido, como lo indica la fórmula siguiente:



Esta estructura fué confirmada convirtiendo al ácido cleregénico en un pentametilderivado, tratándole primero con diazometano que metiló los dos hidroxilos fenólicos del ácido cafeico, luego con yoduro de metilo y óxido de plata, que metiló los tres hidroxilos alcohólicos restantes. Se obtuvo un aceite destilable, el cual por hidrólisis en medio alcalino produjo ácido dimetoxicafeico y ácido 1,4,5-trimetoxiquínico. En este último, que tenía el hidroxilo del carbono-3 libre, se pudo comprobar una vez más la posibilidad de formarse

una lactona.



Per último cabe recordar que en el ácido clorogénico son posibles dos isómeros geométricos debidos al doble enlace de la fracción ácido cafeico. Si bien no ha sido posible aislar al estado puro ningún isómero cis o trans de dicho ácido, por cromatografía en papel suelen detectarse a veces dos manchas cercanas que corresponden a un mismo ácido clorogénico y que se atribuyen corrientemente a los isómeros cis y trans del compuesto (Reberte - 1956).

PROPIEDADES DEL ACIDO CLOGENICO

Propiedades físicas.

El ácido clorogénico cristaliza en agujas con 0,5 mol de agua, tiene gusto débilmente ácido y astringente. El agua de cristalización se elimina por secado al vacío a 110°. Es fácilmente soluble en alcohol y acetona, poco en acetato de etilo e acetato de butilo e insoluble en cloroforme, éter etílico y sulfuro de carbono. Poco soluble en agua fría, es fácilmente soluble en agua caliente. A temperatura ambiente, da soluciones acuosas de aproximadamente 4 gramos/litro.

El punto de fusión es 207-208° y los valores del poder rotatorio más fidedignos que se han publicado son de $[\alpha]_D^{25} = -33,5^\circ$ (agua; c=1) $[\alpha]_D = -38,0$ (alcohol-agua 1:1).

La constante de disociación electrolítica $K=2,2 \times 10^{-3}$ a 27°, corresponde a la de un ácido débil.

La absorción ultravioleta presenta las siguientes características: mínimo a 265 m μ , máximos a 240, a 327 m μ ($E_{1\%} = 532$; $\epsilon = 18600$) con una inflexión a 295 m μ . Este espectro es muy similar al del ácido cafeico. El valor del máximo se mantiene constante entre los pH 2,4 y 5,9 (Meeres, Dermott, Weed) pero a pH más altos sufre desplazamientos hacia las mayores longitudes de onda. Estos desplazamientos se han aprovechado (Calzolari y Donda - 1957) para dar ácido clorogénico en presencia

de ácido cafeico pues éste presenta a pH 9, máximos diferentes de los del ácido clorogénico.

Propiedades químicas.

El ácido clorogénico reduce las soluciones de nitrato de plata en caliente. Hirviéndolo con dióxido de manganeso y solución diluida de ácido sulfhídrico se forma para-quinona. Por reducción con amalgama de sodio y ácido sulfúrico diluido se produce el ácido dihidroclorogénico, como se ha indicado más arriba.

Calentando ácido clorogénico con ácidos diluidos como los ácidos oxálico, clorhídrico e sulfúrico, se descompone en forma relativamente fácil formándose anhídrido carbónico, ácido cafeico, ácido quínico y otros productos. Con solución de hidróxido de potasio diluido se aíslan en cambio solamente los productos de hidrólisis, los ácidos cafeico y quínico.

El ácido clorogénico da muchas reacciones coloradas de las cuales las más importantes son las siguientes:

Con soluciones de cloruro férrico se forma una coloración verde que se vuelve azul o rojo violáceo al agregar hidróxido de sodio. Esta reacción es característica de los ortodifenoles y en el caso de los ácidos clorogénicos se deben al complejo que forman con el hierro los dos hidroxilos orto de la fracción cafeilo de la molécula. Esta reacción puede aplicarse para rece-

necer los ácidos clorogénicos en los cromatogramas.

En soluciones acuosas de ácido acético o fosfórico el ácido clorogénico da una coloración amarilla al agregarle nitrito de sodio. Este color se vuelve carmín al alcalinizar con exceso de hidrato de sodio y según Hoepfner (1932) permite reconocer el ácido clorogénico hasta diluciones de 1 en 100.000 por el color carmín brillante que desarrolla. En iguales condiciones, el ácido cafeico da color naranja. Esta reacción ha caído en desuso como método de ensaje, sobre todo después que González y San Martín (1942) demostraron que es poco específica. Sigue utilizándose en cambio para revelar cromatografías en papel.

Por agregado de acetato de potasio y de cafeína a soluciones hidrealcohólicas calientes de ácido clorogénico se forma la sal compleja fácilmente recristalizable por ser poco soluble en frío.

El ácido clorogénico no precipita con soluciones de gelatina si no se saturan las mismas con cloruro de sodio y luego se calienta. Tampoco puede ser extraído de sus soluciones por el tripán de buey o "goldbeater's skin". Estas reacciones distinguen al ácido clorogénico y sus isómeros de los verdaderos taninos, pues si bien algunas de sus reacciones coloradas son comunes con los mismos, en este caso la diferencia es evidente. Los taninos se definen como sustancias cristalinas e

amorfos que presentan una serie de propiedades que empiezan con las solubilidades en varios solventes, las reacciones aceleradas más comunes y las reacciones de precipitación (Nierenstein - 1948). Las solubilidades del ácido clorogénico en solventes orgánicos y sus reacciones aceleradas que se indican más arriba probarían que le corresponde ser incluido en el grupo de los taninos, pero es en las reacciones de fijación a proteínas donde se pueden encontrar diferencias. La reacción de la gelatina no es totalmente específica para los taninos, pues se encuentran algunas excepciones como las soluciones de goma arábiga, almidón, inulina y galato de metilo que también precipitan. Pero el ácido clorogénico tampoco da reacción positiva con el llamado tripán de bucy y es por esta razón que los ácidos clorogénicos no son considerados como verdaderos taninos, pues ésta es la reacción que representa con más exactitud la capacidad de un producto de curtir pieles.

ACIDO ISOCLOROGEMICO

Barnes, Feldman y White (1950) encontraron en los extractos de café verde una sustancia isómera del ácido clorogénico que llamaron ácido isoclorigénico. El ácido isoclorigénico se ha encontrado más tarde en muchos extractos vegetales por medio de la cromatografía en papel. En el café se calculó que representa el 15% de todos los ácidos clorogénicos reunidos.

No ha sido posible obtener el ácido isoclorigénico al estado cristalino y por eso resultó difícil el estudio de su estructura. Tampoco se pudieron obtener derivados cristalinos a pesar de haberse probado un buen número de reacciones como la metilación exhaustiva, acetilación, formación de derivados acetónicos, complejos con alcaloides y con metales.

Su separación de los demás ácidos clorogénicos se basaba en la propiedad de no formar complejos cristalinos con cafeína y potasio y en su mayor solubilidad en acetato de butilo. Como se ha mencionado anteriormente, el ácido clorogénico forma un complejo poco soluble con cafeína y potasio y es prácticamente insoluble en acetato de butilo.

Mediante una partición entre acetato de butilo y buffer pH 4,7 se pudo obtener un producto amargo que los autores consideraron lo suficientemente puro como para determinar algunas de sus constantes y propiedades.

En la tabla I se indican las mismas comparadas con el ácido cleregénico.

Tabla I. Propiedades del ácido Isocleregénico.

	<u>Ac. Isocleregénico</u>	<u>Ac. Cleregénico</u>
Punto de fusión	amorfo	207-208°
Poder rotatorio	-230°	-38°
Peso molecular (crioscopia en dioxano)	345	354
Extinción molecular (a 322,5 mμ)	18.900	18.600
Equivalente de neutralización alrededor	580	354-359
Equivalente de saponificación	163-185	176-183

El poder rotatorio fué determinado en alcohol-agua (50:50) y el dato tabulado corresponde al producto aparentemente más puro que obtuvieron los autores. En la literatura se encontraron descritos también valores más bajos como en la publicación de Uritani y Miyano (1955) que le asignan $[\alpha]_D = -196^\circ$, pero en este caso el solvente era alcohol puro. El espectro ultravioleta era idéntico al del ácido cleregénico, con los mismos puntos que se indicaron en la sección correspondiente. También los espectros infrarrojos son similares.

El equivalente de neutralización oscilaba alrededor de 580, según el método de preparación del producto. Este valor estaba muy alejado del correspondiente al ácido cleregénico a pesar de la similitud de pesos moleculares

que se encontró por el método oriescópico, de manera que sólo cabía la explicación de suponer que no se trataba de una sustancia homogénea.

El resultado del equivalente de saponificación oscilaba alrededor de 180 en ambos ácidos, lo que estaba de acuerdo con los pesos moleculares de los ácidos cafeico y quínico.

Los análisis elementales dieron los valores siguientes: C 56,12%; H 5,18%, que son bastante cercanos a los que corresponderían a una lactona derivada de un ácido clerogénico cuyos valores calculados son: C 57,1%; H 4,8%. El ácido libre debería dar los valores C 54,2%; H 5,1%.

Ese preparado también era similar al ácido clerogénico en las siguientes reacciones químicas: reducía las sales de plata y mercurio, daba coloración verde con soluciones de cloruro férrico y daba reacción de Heepfner positiva. El acetato de plomo precipitó ambos ácidos cuantitativamente y estos ácidos eran también igualmente solubles en alcohol y en acetona.

La diferencia más significativa estaba en la variabilidad del equivalente de neutralización del ácido isoclerogénico, según el método de preparación seguido, como se ha indicado más arriba. Esto se explica por la existencia de un equilibrio entre el ácido isoclerogénico libre y su lactona, como se indica en

las fórmulas al final del capítulo, donde se ve que esta lactona sólo puede formarse entre el carboxilo 1 y el hidroxilo 3 de la porción ácida quínica de la molécula. El ácido cleregénico, en cambio, no podía formar lactonas, como ya se ha mencionado, porque tiene el carbono 3 sustituido por el resto acetilo.

Calentando ácido cleregénico a 140° sobre pentóxido de fósforo, no se observaron cambios en sus propiedades. Con el ácido isocleregénico y pentóxido de fósforo ocurren alteraciones en el valor inicial de algunas constantes que solamente se explican con la formación de una lactona. Así se observó que el equivalente de neutralización aumentó en un 47% del valor inicial, el poder rotatorio sufrió un desplazamiento y se volvió más levógiro, mientras que la extinción molecular no sufría casi alteración, todo lo cual era de esperar en una lactona.

Por hidrogenación catalítica con paladio según el método de Watanabe (1936) se obtuvo ácido dihidroisocleregénico el cual producía por hidrólisis ácido quínico parcialmente lactonizado. Se obtuvo una constante de neutralización adecuada de este ácido quínico parcialmente lactonizado, por una saponificación inicial que abrió el ciclo de la lactona y liberó la función ácida.

Quedaba por aclarar a cual de los restantes hidroxilos 1, 4 ó 5 estaba unido el resto cafeilo.

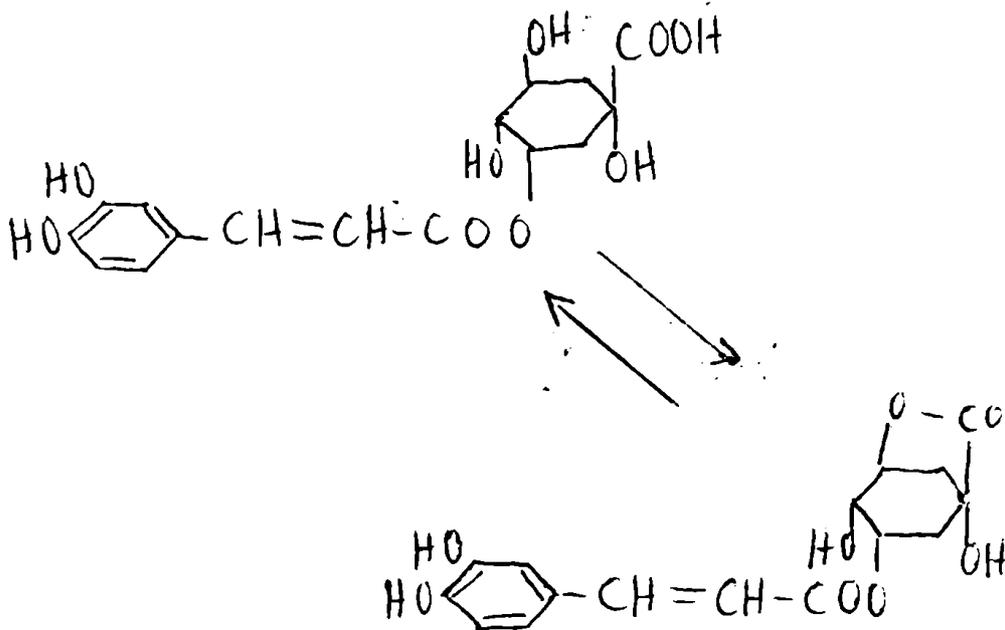
Tanto las soluciones de ácido cleregénico como de ácido isocleregénico aumentan su conductividad al agregar ácido bórico a las mismas. Este indicaba que en ambos casos debía haber dos hidroxilos adyacentes libres para poder formar ésteres cíclicos del ácido bórico y lo cual sólo podía ocurrir si en ambos ácidos el hidroxilo 4 no estaba sustituido.

La decisión entre los carbonos 1 y 5 como punto de fijación del ácido cafeico se efectuó considerando las velocidades de oxidación con ácido periódico de los ácidos cleregénico, isocleregénico y quínico. El consumo de ácido periódico de los ácidos cleregénico e isocleregénico aumentó en forma similar y terminó gastando 1,2 mol por mol de sustancia después de 15 horas, mientras que el ácido quínico gastaba dos moles en iguales condiciones. La posibilidad de que el ácido isocleregénico contenga el sustituyente en el hidroxilo del carbono 1 no puede aceptarse porque entonces el consumo de ácido periódico sería más cercano al del ácido quínico, que tiene los hidroxilos 3, 4 y 5 sin sustituyentes.

El ácido isocleregénico se oxidaba un poco más lentamente que el cleregénico, lo que se explicó porque la velocidad de apertura del anillo lactónico li-

mitaba la velocidad de oxidación del mismo. Otro factor que influye en este caso era la configuración de los dos hidroxilos adyacentes que se oxidan. En el ácido isocleregénico los hidroxilos libres están en posición trans, mientras que en el ácido cleregénico los hidroxilos 4 y 5 están en posición cis.

Los autores consideraron que la fórmula más probable del ácido isocleregénico era la de un ácido 5-cafeil-quinico, parcialmente lactenizado, formando una mezcla en equilibrio.



ACIDO PSEUDOCLOGROGENICO

En un estudio sobre las funciones respiratorias de la batata (*Ipomea batatas*), Rudkin y Nelson (1947) estudiaron los ácidos fenólicos de esta planta. Lograron aislar e identificar ácido clorogénico, pero quedó en suspenso la aclaración de las estructuras de los componentes reunidos bajo el nombre de "fracción A", los cuales producían ácido cafeico por hidrólisis alcalina.

Uritani y Miyano (1955) siguieron este estudio con el fraccionamiento de estos ácidos fenólicos de batatas atacadas de "podredumbre negra" (*Ceratostomella fimbriata*). Aplicando una partición en contracorriente de 44 etapas con acetato de etilo y buffer de fosfatos a pH 5,8, los autores aislaron tres fracciones distintas que daban ácido cafeico y ácido quínico por hidrólisis. La fracción A, con coeficiente de partición 0,48 y poder rotatorio $[\alpha]_D^{13} = -155^\circ$, era distinta de todos los ácidos clorogénicos descritos hasta entonces y fue llamada ácido pseudoclorogénico. La fracción B resultó ser ácido isoclorogénico, como lo confirmaron al compararla con una muestra aislada del café. Tanto el ácido pseudoclorogénico como el isoclorogénico dieron equivalentes de neutralización altos (586 y 563 respectivamente), lo que indicaría que se estaba en presencia de lactonas. La fracción C, con un poder rotatorio $[\alpha]_D^{13} = -94^\circ$, fue considerada

como una mezcla de polímeros. Ninguna de estas sustancias pudo obtenerse al estado cristalino y posteriormente no se han realizado estudios sobre el fenómeno pseudoclorogénico.

ACIDO NEOCLOGENICO

En 1953 Corse aisló un nuevo ácido que por hidrólisis daba los ácidos cafeico y quínico, al cual denominó ácido neoclorogénico. Era después del ácido clorogénico y del ácido isoclorogénico el tercer ácido de este tipo encontrado en la naturaleza.

Corse lo aisló de pulpa de duraznos que una vez secada por liofilización, se extrajo con butanol saturado de agua. El extracto butanólico se transformó en un extracto acuoso y el nuevo extracto así obtenido fué sometido a una distribución en contracorriente de 100 tubos, empleando el par de solventes acetato de etilo/buffer de fosfatos 2M a pH 3,0.

Efectuando 100 transferencias pudo detectar cuatro bandas que contenían sustancias fenólicas. La primera con $k = 0,05$, es decir muy poco soluble en acetato de etilo, contenía varias sustancias, algunas al parecer productos de polimerización y además autocianas. La tercera banda con $k = 1,40$ correspondía al ácido clorogénico, el cual pudo cristalizarse fácilmente y la cuarta banda con $k = 10$ contenía ácido isoclorogénico y otras sustancias desconocidas.

Había además una segunda banda de $k = 0,39$ de la cual se aisló el nuevo ácido cuyas constantes se indican a continuación, en forma de tabla, para compararlas

mejor con los otros ácidos.

Tabla II. Propiedades del Ácido Neoclorogénico.

	<u>Ac. Neocloro- génico</u>	<u>Ac. Isocloro- génico</u>	<u>Ac. Cloro- génico</u>
Punto de fusión	177-179°(desc)	--	207-208°
Poder rotatorio (alcohol 50%)	-5,4°	-230°	-38°
Equivalente de neutralización	367	580	354
Análisis elemental:	C 54,2%		54,2% (calculado)
	H 5,44%		5,12% "

Los datos del análisis elemental y del equivalente de neutralización coincidían exactamente con un isómero del ácido clorogénico, y por lo tanto tendría la fórmula $C_{16}H_{18}O_9$.

El espectro ultravioleta del ácido neoclorogénico coincidía con el de los otros ácidos clorogénicos, es decir, en alcohol-agua 50% daba máximos a 240 m μ y a 325 m μ , un mínimo a 265 m μ y una inflexión a 295 m μ .

La saponificación del ácido neoclorogénico con hidróxido de sodio dió un rendimiento del 91% en ácido cafeico. También se pudo aislar ácido quínico, pero con un rendimiento mucho menor. Consideramos que posiblemente la menor cantidad de ácido quínico aislada se debía no solamente a las mayores dificultades

que siempre presentó el aislamiento de este ácido, sino que como se discutirá más adelante, una parte del ácido neoclorogénico pudo transformarse en medio alcalino en otro producto al cual hemos llamado "sustancia T 19-20" y en la cual no hemos podido caracterizar ácido quínico, sino una sustancia ácida de naturaleza diferente.

Corse no señaló el lugar en que podía estar condensado el resto cafeilo con el ácido quínico. Es evidente, sin embargo, que si se acepta que en el ácido isoclorogénico, como sostiene Barnes, Feldman y White (1950) está sustituido el hidroxilo 5 y en el clorogénico el 3, como ya está perfectamente demostrado, sólo quedarán como lugares de sustitución posibles los hidroxilos 1 y 4.

CINARINA

En 1954 Panizzi y Scarpati aislaron de extractos de alcauciles (Cynara scolymus) una nueva sustancia formada por condensación de ácido cafeico con ácido quínico a la cual llamaron cinarina. La consideraron una de las principales sustancias coleréticas presentes en esas plantas.

La cinarina se encuentra en la proporción de 0,1 a 0,2% en las hojas frescas de alcaucil. Para su extracción los autores maceraron hojas frescas groseramente, con agua a 100°, durante 6 a 8 horas. Después de filtrar la solución, agregaron solución de acetato de plomo hasta precipitación total. Las sales de plomo filtradas se redisolviéron en ácido acético 20% caliente, se eliminó la mayor parte del plomo como sulfato de plomo y las últimas trazas de este metal con ácido sulfhídrico. La solución acuosa se concentró al vacío y por enfriamiento se formaron cristales de cinarina cruda. Por re cristalización en ácido acético al 20% se obtuvo un producto prácticamente puro.

Su punto de fusión era 226-227° y poder rotatorio de $[\alpha]_D^{25} = -59$ (metanol; c=4).

El valor de la constante de neutralización y los

resultados del análisis correspondían a un dicafeil-derivado del ácido quínico. Los mismos autores concluyen del estudio de la cinarina que su estructura correspondía a un ácido 1,4-dicafeil-quínico.

Los autores encontraron que la constante de neutralización era 506 en vez de 534 y la cantidad de acetilos del hexaacetilderivado era algo inferior a la calculada. De estos datos se concluye que la cinarina está parcialmente lactonizada, como se había encontrado en el ácido isoclorogénico.

LOS ACIDOS CLOROGENICOS
ENCONTRADOS EN LA YERBA MATE.

Es un hecho conocido que los extractos de yerba mate dan la reacción verde del cloruro férrico característica de los ortodifenoles. Esta reacción se consideró en cierta época como demostrando la presencia en la misma de un tanino.

Los primeros que comunicaron haber aislado un tanino de la yerba mate fueron Rochleder y Hlasiwetz (1848). Precipitaron en forma fraccionada con acetato de plomo las soluciones alcohólicas de yerba mate y en la segunda fracción encontraron una sustancia que consideraron idéntica a otra que habían aislado previamente del café.

La cuestión de si la yerba mate contenía o no verdaderos taninos fué motivo de discusiones que continuaron por muchos años. Recién se aclararon totalmente con el trabajo exhaustivo de Woodward y Cowland (1935), quienes demostraron que en los extractos de yerba mate no existían verdaderas sustancias tánicas. El café y el té, en cambio, contenían taninos en cantidades variables, como lo verificaron los mismos autores. Al tratar de aislar de la yerba mate las sustancias responsables de algunas reacciones comunes con los taninos, sólo lograron aislar dos fracciones fenólicas, la

primera indudablemente era ácido clorogénico o uno de sus isómeros y la segunda suponían que era una flavona.

Simultáneamente Hauschild (1935) aisló de los extractos de yerba mate dos fracciones cuyas propiedades frente a diferentes reactivos eran muy similares a las del ácido clorogénico. De estas fracciones el autor consiguió cristalizar la segunda y encontró que tenía un punto de fusión 235-236° y poder rotatorio ligeramente dextrógiro que no es específica. Por sus propiedades físicas esta sustancia no podría ser ácido clorogénico pues éste tiene un punto de fusión más bajo y su poder rotatorio es levógiro y medible. Tampoco el análisis elemental correspondía al ácido clorogénico, sino con el de un ácido clorogénico que ha sufrido la pérdida de una molécula de agua.

Repitiendo esas experiencias, Deulofeu, Díaz, Fondovilla y Mendive (1943) aislaron nuevamente esta sustancia cristalina y demostraron que por hidrólisis alcalina producía ácido cafeico. También encontraron que había gran similitud en los espectros ultravioletas del ácido cafeico, la sustancia tánica y una infusión de yerba mate.

Posteriormente no han aparecido trabajos químicos referentes a los ácidos clorogénicos de la yerba mate hasta la publicación de Garofa Paula (1953) en

la cual describía el reconocimiento en extractos de yerba mate, de ácido clorogénico y una sustancia amorfa que llamó tanoide. Este autor extrajo las hojas de yerba mate con agua hirviendo hasta reacción negativa con cloruro férrico. Los extractos combinados se filtraron, se precipitaron los ácidos fenólicos con acetato de plomo y se los regeneró por tratamiento con ácido sulfhídrico y filtración en caliente. Tratando de esta manera una partida de yerba mate comercial y otra de hojas de yerba mate fermentadas enzimáticamente, se encontró una diferencia, pues en el segundo caso, al enfriar la solución precipitó un producto pardo-amarillento que el autor consideró un producto de la oxidación enzimática del ácido clorogénico. Por desgracia, el autor no estudió la composición de los extractos originales ni las aguas madres del tanoide para poder aclarar si éstos también contienen otros ácidos clorogénicos.

En otro trabajo del mismo autor y referente al mismo tema (García Paula - 1953), se menciona nuevamente el resinotanol al encontrar que éste también existe en el café. En una postdata se menciona el reciente descubrimiento del ácido isoclorogénico y el autor supone que el pseudotanino es idéntico con el ácido isoclorogénico descubierto por Barnes, Feldman y White (1950). Efectivamente, si uno estudia los

Rf de las cromatografías en papel realizadas por García Paula, se encuentra que este resinotanol o tanoide, como lo llama indistintamente, se desplazó con más velocidad que el ácido clorogénico en el sistema de solventes Butanol-Acido acético-Agua. Otros autores y nosotros mismos hemos obtenido en esa zona manchas con Rf que corresponden al ácido isoclorogénico. Es difícil decir si esta mancha con Rf .90 de García Paula corresponde a nuestra mancha con Rf .74 del ácido isoclorogénico porque los autores no han hecho las cromatografías con los testigos de ácido isoclorogénico y los Rf pueden variar mucho de un laboratorio a otro. Lo que puede afirmarse con seguridad es que el resinotanol o tanoide de García Paula no es ácido neoclorogénico porque los Rf de éste son inferiores a los del ácido clorogénico.

Tabla III. Rf con el sistema Butanol-Acido acético-Agua.

<u>Sustancia</u>	<u>Rf de la literatura</u>		<u>Nuestros</u> <u>Valores</u>
	<u>Roberts</u> <u>(1956)</u>	<u>García Paula</u> <u>(1953)</u>	
Acido clorogénico	√.64	√.70	√.63
Tanoide (resinotanol)	--	.90	<u>1.00</u>
Ac. isoclorogénico	.76	--	.74
Ac. neoclorogénico	.55	--	.45

Las experiencias posteriores de Roberts (1956), quien estudió la presencia de polifenoles en los extractos acuosos de yerba mate y de té con mucho más detalle, son coincidentes en algunos aspectos con los de Garofa Paula, como se dijo más arriba. Este autor encontró que en la yerba mate estaban presentes los tres ácidos clorogénico, isoclorigénico y neoclorigénico, los cuales daban la reacción con cloruro férrico y sus manchas daban también la fluorescencia típica de estos ácidos. Detectó una cuarta mancha fluorescente que no correspondía a ninguno de estos ácidos y supuso que sería rutina, aunque en su publicación no aclaró qué Rf obtuvo en los cromatogramas para esta supuesta rutina.

En resumen, de acuerdo con los trabajos efectuados hasta ahora, se han identificado los tres ácidos clorogénicos isómeros en los extractos de yerba mate. Vale la pena señalar que todos estos hallazgos están basados en caracterizaciones por cromatografía en papel y la única sustancia aislada al estado cristalino por Hauschild (1935) no corresponde a ninguno de los ácidos clorogénicos conocidos.

Por otra parte, es conveniente anotar que nunca hemos encontrado ácido cafeico en los extractos de yerba mate hechos en frío. Aparentemente este ácido no se encuentra libre en la yerba mate comercial. El hallazgo

de ácido cafeico en los extractos utilizados para extraer ácidos clorogénicos que se hacían con agua ligeramente ácida, debe atribuirse a un principio de hidrólisis de alguno de estos últimos.

Nosotros tampoco hemos podido encontrar en las cromatografías en papel de extractos de yerba mate, tanto en los obtenidos en frío, como en los obtenidos por ebullición con agua acidulada, la sustancia cristizable aislada por Hauschild y por Deulofeu, Días, Fondovilla y Mendive. El disponer de esta sustancia nos ha permitido estudiar con cuidado los sistemas cromatográficos en papel más apropiados y podemos afirmar que aun en pequeñas concentraciones hubiera sido posible detectar su presencia. Ninguno de los autores mencionados ha señalado tampoco la presencia de una sustancia que pueda ser identificada con la sustancia técnica de Hauschild (STH). Todos los hechos son favorables a la opinión que la sustancia técnica de Hauschild es realmente un artefacto que se produce en condiciones determinadas de preparación. Como veremos más adelante, esta sustancia tiene las características de una lactona y entre los productos de hidrólisis alcalina suave se encuentra el ácido neoclorogénico. Parecería formarse pues por pérdida de agua (lactonización?) de este último ácido, pero curiosamente no ha sido posible establecer las condiciones

exactas de anhidrización y la forma de preparación de esta sustancia no ha podido ser repetida experimentalmente.

Como se puede ver en la parte experimental correspondiente, nuestros ensayos efectuados sobre cuatro muestras de yerba mate distintas confirman los trabajos de los autores anteriores en el sentido que, al igual que ellos, encontramos los tres ácidos clorogénico, isoclorogénico y neoclorogénico. Pero deseamos señalar que en nuestras cromatografías en papel se ha encontrado la presencia de una sustancia que es comparable con la "sustancia tubos 19-20". Su caracterización será descrita más adelante y es un producto del tratamiento alcalino suave del ácido neoclorogénico. Es difícil decidir si la sustancia con estas características que hemos encontrado repetidamente en los extractos de yerba mate existe ya en la planta o si es un producto de alguna de las etapas de elaboración de la yerba mate comercial con las cuales se procede en los lugares de cosecha. Lógicamente sólo trabajando en el lugar de explotación se podría aprovechar la yerba mate recién recolectada, pues en las condiciones en que hemos trabajado se han utilizado yerbas zapecadas y canchadas, es decir, sometidas al proceso de destrucción de enzimas y de secado. Sin embargo, siempre se cuidó de utilizar

partidas de cosechas recientes, con las hojas enteras y antes de ser sometidas al proceso de molienda.

SEPARACION CROMATOGRAFICA PREPARATIVA

DE ACIDOS CLOROGENICOS.

En el deseo de confirmar la presencia de los tres ácidos clorogénicos (clorogénico, isoclorogénico y neoclorogénico) en la yerba mate, se realizó una cromatografía preparativa de los mismos aprovechando las técnicas que fueron desarrolladas por Bulen, Varner y Burrell (1952) para separar ácidos orgánicos de tejidos vegetales y aplicadas por Sondheimer (1958) en la aislación y valoración de los ácidos clorogénicos.

El método desarrollado por Bulen, Varner y Burrell para estudiar los ácidos orgánicos de importancia biológica en vegetales, se basaba en una cromatografía en columna, donde la fase fija era sílicagel embebida en ácido sulfúrico 0,5 N y la fase móvil cloroformo con cantidades crecientes de butanol. Los ácidos se reconocían por cromatografía en papel o por métodos colorimétricos. Para obtener datos comparativos los autores fijaron exactamente las condiciones de trabajo de una columna con 8 gramos de sílicagel y la llamaron "columna de control Standard". Sondheimer introdujo pequeñas modificaciones en la columna standard para aplicarla al caso específico de los ácidos clorogénicos. Así trabajó con 16 gramos de sílicagel y utilizó las mezclas cloroformo-butanol más apropiadas. Los ácidos

clorogénicos obtenidos se determinaban por titulación y por espectrofotometría y Sondheimer aplicó este método en frutas y hojas de varias plantas, incluso el café verde.

Los resultados obtenidos por nosotros en la yerba mate no son diferentes en su aspecto general con los de Sondheimer. Empleando como solvente de elución sucesivamente las mezclas de cloroformo con 5, 15, 25, 35 y 50% de butanol, fueron eluidos primero el ácido isoclorogénico y luego el clorogénico y el neoclorogénico. La identidad de estos ácidos fue comprobada por cromatografía en papel y se realizó un dosaje cuantitativo por espectrofotometría a 325 m μ y por titulación con hidróxido de sodio 0,02 N, dentro de las indicaciones de los mismos autores.

Lo mismo que encontrara Sondheimer en su estudio del café verde, al pasar por la columna el solvente con 25% de butanol apareció, entre los ácidos clorogénico y neoclorogénico, el producto que aquel autor llamó "banda 510". Esta sustancia presentaba un máximo a 325 m μ y aparentemente está relacionada con el grupo de los ácidos clorogénicos. La sustancia presente en esta banda se caracteriza porque por hidrólisis produce ácido cafeico, pero no se pudo identificar ácido quínico, como se hizo fácilmente con el cafeico.

No hemos tenido oportunidad de estudiar en detalle el comportamiento de la banda 510 de la yerba mate, pero sus Rf en cromatografía con los sistemas No. 1 y No. 2 (ver parte experimental) y el no poder encontrar ácido quínico en su hidrólisis, nos hacen recordar la sustancia "tubos 19-20" que se producía por tratamiento alcalino suave del ácido neoclorogénico y que se menciona más adelante en la parte experimental.

El total de ácidos clorogénicos encontrados, inclusive la "banda 510" era de 86,2 mg para una muestra de yerba mate de 3,3 gr. Este valor representaba el 2,6% del peso original.

CROMATOGRAFIA DE LOS ACIDOS CLOROGENICOS

a) Papeles.

Las cromatografías se hicieron preferentemente en papel Whatman No. 1. También se utilizó papel Schleicher & Schüll 2043a, el cual se distinguía del anterior por su grano más uniforme y una muy baja fluorescencia de fondo. Esto le daba la ventaja de producir frentes de solvente rectos, lo que facilitaba la comparación de los Rf. La fluorescencia baja permitía distinguir mejor pequeñas cantidades de sustancias. También se encontró una partida de papel Whatman No. 1 la cual presentaba poca fluorescencia de fondo. Los Rf eran prácticamente los mismos con las dos clases de papel. Cuando se observó una diferencia entre ambos, la misma se mencionará en el lugar adecuado. En el caso de no indicarse específicamente otro, el papel que se utilizó preferentemente en el curso del trabajo fué el Whatman No. 1.

b) Detección de las sustancias conteniendo ácido cafeico.

Los reveladores químicos ensayados demostraron ser poco sensibles para los ácidos clorogénicos, requiriendo trabajar con una cantidad de sustancia superior a la habitual en las cromatografías. Pulverizando las tiras de papel con cloruro férrico 0,1% apa-

recían manchas verdes, propias de los ácidos fenólicos (Roberts, Wood - 1951).

También se pudo realizar la reacción de Hoepfner sobre papel, pulverizando con nitrito de sodio en ácido acético y luego con solución de hidrato de sodio (Weurman, Rooij - 1958). Aparecían manchas amarillas que luego se volvían rojas.

El método más adecuado para detectar estos ácidos en el papel consistió en observar la fluorescencia que producían bajo la acción de la luz ultravioleta. Los ácidos clorogénicos aparecían como zonas azules, las cuales bajo la acción de los vapores de amoníaco tomaban una fluorescencia verde brillante. Este fue el método más empleado por nosotros en el curso del trabajo y cuando no se haga otra indicación, la detección de las sustancias fue hecha por su fluorescencia.

c) Cantidades empleadas.

Habitualmente se utilizaron alrededor de 5 mg de sustancia cuando el reconocimiento se hacía por medio de la luz ultravioleta. Con sustancias puras eran suficientes 2 mg para obtener zonas bien visibles, mientras que para mezclas se necesitaban colocar hasta 10mg.

Los métodos de detección químicos no se aplicaron con frecuencia, pero en estos casos debían colocarse

30 a 40 mg de sustancia para obtener zonas bien visibles.

d) Sistemas empleados.

Los sistemas de solventes empleados son modificaciones de los publicados en la literatura, de acuerdo a las indicaciones expuestas más abajo. En todos los casos en que fué posible hacerlo se emplearon testigos de las sustancias que se investigaban, lo cual eliminaba el error debido a la no conservación de la temperatura, pues es conocido que ésta tiene una influencia grande en los Rf. En este capítulo los Rf indicados como ejemplos se refieren a cromatografías típicas y desarrolladas en condiciones óptimas en cuanto a la estabilidad de la temperatura.

1) Acido Acético 0,333 N. Fué empleado en cromatografía ascendente, sin equilibrar (Roberts - 1956). Se preparaba el solvente diluyendo al 2% ácido acético glacial. Los Rf de los productos estudiados se indican más abajo. Cuando se intentó aumentar la concentración del ácido, aumentó el valor de los Rf y se dificultó mucho la posibilidad de distinguir los ácidos clorogénicos entre sí. También se pueden utilizar soluciones de ácido clorhídrico, pero debe ser muy diluido para obtener resultados similares.

El frente del solvente avanzaba unos 25 cm, en

forma algo irregular, en dos o tres horas. Se aplicó este sistema principalmente para:

- a) Identificar en forma rápida alguno de los productos en estudio paralelamente a una sustancia patrón.
- b) Identificar con seguridad ácido isoclorogénico y ácido cafeico, porque ambos tenían un Rf bien diferenciado de los restantes ácidos clorogénicos. Además el ácido cafeico daba fluorescencia azul cuando se somete el papel a la acción de vapores de amoníaco; lo que no ocurría con los ácidos clorogénicos.

Tabla IV. Rf observados con el sistema No. 1.

<u>Sustancia</u>	<u>Rf en Whatman 1</u>	<u>Rf en S & S 2043a</u>
Acido cafeico	.26	.21
S.T.H.	.35 con cola	.36 con cola
Ac. Clorogénico	.50	.54
Ac. isoclorogénico	.15 con cola hasta .00	.13 con cola hasta .00
Ac. neoclorogénico	.67	--

2) Butanol - Acido acético - Agua. (4:1:5). Se empleó la fase superior. Inicialmente se empleó una proporción distinta para los componentes de este sistema (4:1,25:1,25), de acuerdo a Roberts (1956), pero se encontró que los Rf estaban demasiado cerca del frente, por lo cual debió modificarse de acuerdo a Clark (1957) quien empleaba la relación (4:1:5). Las cromatogramas

tografías se desarrollaron en forma descendente aunque ocasionalmente se empleó también la cromatografía ascendente. Se equilibró el tanque con las dos fases de solvente durante una hora, antes de agregar la fase superior al recipiente para comenzar el desarrollo. Se comprobó que manteniendo constante el tiempo necesario para el equilibrio se obtenían resultados más reproducibles (Clayton - 1956). El frente tarda 16 horas en avanzar unos 25 cm. Se utilizó como segundo sistema de identificación cromatográfica. Se obtuvieron mejores resultados empleando papel Schleicher & Schüll 2043a, en vez de Whatman 1.

Tabla V. Rf observados con el sistema No. 2.

<u>Sustancia</u>	<u>Rf con Whatman 1</u>	<u>Rf con S & S 2043a</u>
Acido cafeico	.79	--
S.T.H.	.79	.78
Ac. clorogénico	.63	.65
Ac. isoclorogénico	.74	.73
Ac. neoclorogénico	.45	--

3) Acetato de butilo - Acido acético - Agua (4:1:5)

Se empleó la fase superior para desarrollar el cromatograma. Este sistema es una modificación del utilizado por Dawson y Wada (1957). La cromatografía se desarrollaba en forma descendente, previa saturación del papel y la cámara cromatográfica con las dos capas de solven-

te durante unas 20 horas. El frente del solvente recorría unos 25 cm en 3 horas, pero debido a los Rf bajas de algunos ácidos, era conveniente dejar gotear el líquido durante 8 horas. Resultó importante en este sistema que la temperatura se mantuviese estable durante todo el tiempo de saturación previa y de desarrollo.

El acetato de butilo debía ser de buena pureza y se le redestiló per columna, recogiendo la fracción de punto de ebullición de 125°- 126°. La separación de las fases debió hacerse cuidadosamente y en particular evitar que la fase inferior no retenga fase superior pues de otra manera resultaba muy largo el proceso de equilibramiento. Hemos encontrado que es conveniente añadir un poco de agua a la fase inferior para asegurar la solubilidad total del acetato de butilo.

Tabla VI. Rf observados con el sistema No. 3.

<u>Sustancia</u>	<u>Rf en Whatman 1</u>
Acido cafeico	.68
S. T. H.	.48 alargada
Ac. clorogénico	.12
Ac. isoclorogénico	.48 alargada
Ac. neoclorogénico	.04

4) Fenol saturado de agua. Se empleó en cromatografía descendente usando papel Schleicher & Schüll 2043a previa saturación de la atmósfera con las dos fases de solventes durante dos horas. En los pocos ensayos que se realizaron, no se encontró ventaja sobre el sistema anterior, con el cual era más fácil trabajar porque se evitaba el peligro que comporta el uso de fenol. Los Rf observados fueron los siguientes:

Tabla VII. Rf observados con el sistema No. 4.

<u>Sustancia</u>	<u>Rf observados</u>
Acido cafeico	.55 alargada
S.T.H.	.80
Ac. clorogénico	.49
Ac. isoclorogénico	.56
Ac. neoclorogénico	.33

DETERMINACION DEL EQUIVALENTE

DEL ACIDO LACTOGENICO

Se utilizó un potenciómetro Beckman modelo M con microelectrodos de vidrio/calomel. Durante la experiencia el líquido se agitó con una corriente de nitrógeno de manera que simultáneamente se obtuviera una atmósfera inerte, de acuerdo a la técnica de Albert (1958).

El método se ensayó primero con soluciones hidroalcohólicas de ácidos conocidos, obteniéndose en estos casos curvas con puntos de inflexión bien claros.

Titulación de la S.T.H.

17,5 mg de la S.T.H. se disolvieron en 5 ml de alcohol-agua (40:60) neutro en un vaso de 10 ml y se le sumergieron los electrodos del potenciómetro. Se produjo una atmósfera inerte agitando con una corriente de nitrógeno lavada con solución de hidrato de potasio y filtrada por algodón. Con una microbureta de 2 ml de capacidad graduada al centésimo se añadió hidrato de sodio 0,1 normal. El añadido de 0,05 ml dió un pH 7,45 lo que indicaba que la sustancia no poseía grupos carboxilo titulables.

Titulación del producto de hidrólisis.

44,4 mg de lactona se disolvieron en 4 ml de etanol-agua (40:60). Se añadieron 2,20 ml de hidrato de

sodio 0,1 normal y se dejó una hora en baño de agua a 60° con atmósfera inerte de nitrógeno como en la experiencia anterior. Se tituló luego esta solución con ácido clorhídrico 0,1 normal, obteniéndose esta vez un punto de inflexión a pH 7 después de haber agregado 0,92 ml de ácido. Vale decir que la cantidad de álcali consumido era de 1,28 ml de hidrato de sodio 0,1 normal. Con estos datos el equivalente de neutralización encontrado fué de 347 (calculado para la lactona de un ácido clorogénico: 336).

LOS ACIDOS CLOROGENICOS Y SUSTANCIAS
RELACIONADAS PRESENTES EN LA YERBA MATE.

Se efectuaron cuatro extracciones empleando cada vez 500 g de yerba mate de los siguientes orígenes:

- 1) Cosechador desconocido; Oberá, Misiones.
- 2) Guillermo Petri; Leandro N. Alem, Misiones.
- 3) Barbaquá SRL; Gob. López, Misiones.
- 4) Casimiro Zielinski; Eldorado, Misiones.

Método para las muestras 1 y 2.

La yerba se cubrió con 1,7 litros de agua conteniendo 30 ml de ácido clorhídrico concentrado, lo que daba aproximadamente una concentración de 2% de ácido y se llevó a ebullición, para lo cual tardaba aproximadamente una hora. Se filtró por gasa y la operación se repitió tres veces en total. Los extractos turbios reunidos, de color verdoso, se trataron con solución al 20% de acetato de plomo hasta que no dieron más precipitado (habitualmente son necesarios unos 1500 ml). El precipitado se separó por centrifugación en una centrífuga de canasto, usando superoel como ayuda filtrante. El sólido obtenido se suspendió en 3 litros de agua y se hizo burbujear ácido sulfhídrico hasta eliminación total del plomo. Se filtró y se obtuvo un filtrado límpido, amarillento, que se concentró a unos 250 ml. El concentrado se extrajo en un extractor con-

tinuo con éter etílico (65 horas) y con acetato de etilo (120 horas).

Método para las muestras 3 y 4.

En este caso, antes de añadir el acetato de plomo se añadió hidrato de sodio (unos 150 ml de solución al 20%) a los extractos, llevándolos hasta pH 5. Se emplearon solamente 500 ml de solución de acetato de plomo al 20% debido al medio menos ácido.

La cromatografía de las diversas fracciones obtenidas en las extracciones anteriores dieron resultados idénticos en todos los casos. Se dan los obtenidos con la muestra 1, que son típicos. Se empleó el sistema de solventes número 3:

Tabla VIII. Cromatografía en el sistema No. 3 de las fracciones de yerba mate.

<u>Muestra</u>	<u>Rf de las manchas observadas</u>					
Extracto original	.04p	.08p	.12		.48al	.68p
Sal de Pb redisuelta y elim. el Pb	.04	.08	.12		.48al	.68
Extracto etéreo					.48al	.68g
Fase acuosa del extracto etéreo	.04	.08	.12			
Extracto de acetato de etilo	.04	.08	.12	.36p	.48dif	.68
<u>Testigos</u>						
Acido cafeico						.68
Sustancia tánica (S.T.H.)					.48al	
Acido elorogénico			.12			
Ac. isoclorogénico					.48al	
Ac. neoclorogénico	.04					
Sustancia T 19-20 aislada		.08				

p: pequeña; al: alargada; dif: difusa; g: grande

De los resultados anteriores se dedujo lo siguiente: Las manchas de Rf .04 eran evidentemente del ácido neoclorogénico, como lo muestra el testigo y las cromatografías posteriores en otros sistemas. La mancha de Rf .08, como veremos más adelante, era indicativa de la presencia de una sustancia cuya estructura química no está claramente establecida, pero que con-

tiene ácido cafeico y que se forma por hidrólisis suave de la sustancia tánica (S.T.H.) que se estudia en este trabajo. Corresponde a la "sustancia T 19-20" que se describirá más adelante.

Las manchas de Rf .12 pertenecían al ácido clorogénico y la de Rf .68 al ácido cafeico. La pequeña mancha de Rf .36 que se encontró solamente en el extracto de acetato de etilo y no en los extractos originales, podría ser un artefacto formado durante el proceso de extracción. La sustancia de Rf .48 era bien claro que en este sistema podía corresponder tanto a la sustancia tánica como al ácido isoclorogénico y, por lo tanto, para decidir sobre su significado era necesario emplear otros sistemas donde esas sustancias se separan mejor.

Empleando el sistema No.1 fué posible aclarar este punto y los resultados que se obtuvieron fueron los que se indican a continuación:

Tabla IX. Cromatografía en el sistema No.1 de las fracciones de yerba mate.

<u>Muestra (Whatman 1)</u>	<u>Rf de las manchas observadas</u>		
Extracto original	.13 cola	.23 azul	.43 hasta.51
Sal de Pb redisuelta	.13 cola	.23 azul	.43 hasta.51
Extracto etéreo	.15 cola	.25 azul	.48 sal difuso
Fase acuosa del extracto etéreo			.43 hasta.53
Extracto de acetato de etilo	.10 dif	.25 azul	.42 hasta.52
<u>Testigos</u>			
Acido cafeico		.26 azul	
Sustancia tánica (S.T.H.)			.35 al cola
Acido clorogénico			.50
Ac. isoclorogénico	.13 cola		
Ac. neoclorogénico (experiencia de otro día)			.56
Sustancia tubos 19-20 (experiencia de otro día)			.45

En estas experiencias, la mancha .23 correspondía al ácido cafeico, pero como no se ha encontrado este ácido en extractos de yerba mate preparados en frío, se deducía que éste debía haberse formado durante el proceso de extracción en caliente con ácido clorhídrico diluido. En cuanto a las manchas de Rf .42 hasta .51, que formaban una zona fluorescente alargada conjunta, era evidente que estaba formada por la mezcla de ácidos clorogénicos, con excepción del ácido iso-

clorogénico cuyo bajo Rf permitía su diferenciación de los anteriores con facilidad. La sustancia tánica, cuyo Rf era .35 con cola hasta el origen, no fué caracterizada en ninguno de los extractos.

En resumen, puede decirse que los extractos de yerba mate contenían las siguientes sustancias del grupo de los ácidos clorogénicos: ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, ácido neoclorogénico, ácido cafeico y la sustancia "tubos 19-20" que es un producto que se obtiene por tratamiento del ácido neoclorogénico o de la S.T.H. Aunque no podía dudarse de su presencia en los extractos ácidos de la yerba mate, era muy difícil de afirmar si ya existía en ella o era un artefacto formado durante el proceso de extracción.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Roberts (1956) quien encontró en los extractos de hojas de yerba mate los ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y una cuarta mancha que consideró ser el glucósido flavonoide, rutina, aunque no empleó testigos ni mencionó qué Rf obtuvo.

Nosotros hemos obtenido siempre cuatro manchas y la cuarta, con Rf .45 y .08 en los sistemas No.1 y 3 respectivamente, ha correspondido en todas las oportunidades a la "sustancia T 19-20".

SEPARACION CROMATOGRAFICA PREPARATIVA

DE ACIDOS CLOROGENICOS

3,3 gr de hojas de yerba mate elegidas de una muestra de 6,5 gr de yerba mate comercial (de la Cooperativa Agrícola Eldorado; cosecha 1959), se extrajeron tres veces con 50 ml de isopropanol al 70% a temperatura ambiente y con agitación mecánica. Cada extracción duró dos horas; se reunieron los extractos filtrados y se concentraron al vacío hasta casi sequedad. Se terminó de secar el extracto colocándolo en un desecador con ácido sulfúrico e hidróxido de potasio.

El extracto seco se disolvió en 3,3 ml de agua y se acidificó con ácido sulfúrico 0,2 N, formándose un precipitado pardo-verdoso. Este extracto daba en cromatografía en papel con el sistema No.1 cuatro manchas con los siguientes Rf: .15 cola y una mancha grande entre Rf .50 y .60 que correspondía a la zona en que se encuentran los ácidos isoclorogénico, neoclorogénico y clorogénico. La separación en la columna permitió confirmar su presencia.

1 ml de esta suspensión anterior se colocó en la parte superior de una columna de 16 gr de sílicagel, preparada de acuerdo a la técnica de Bulen, Varner y Burrell (1952) con las modificaciones introducidas por

Sondheimer (1958), aunque no se emplearon exactamente las mismas condiciones de elución. La muestra se mezcló previamente con 2 gr de sílicagel en un vaso de precipitados y se arrastró con cloroformo para pasarla a la columna. Los solventes utilizados eran mezclas de cloroformo con cantidades crecientes de butanol. En esta columna se utilizaron sucesivamente:

Tabla X. Solventes utilizados en la elución de la columna.

<u>Fracciones de 10 ml</u>	<u>Solvente de elución</u>
1 - 18	Butanol - cloroformo 5:95
19 - 42	Butanol - cloroformo 15:85
43 - 60	Butanol - cloroformo 25:75
61 - 77	Butanol - cloroformo 35:65
78 - 85	Butanol - cloroformo 50:50

Cada fracción fué investigada por cromatografía en papel, según indican los resultados de la tabla XI. Las fracciones que daban manchas fluorescentes fueron trabajadas y se interrumpía el pasaje de un solvente, para pasar al siguiente, cuando la disminución de la fluorescencia indicaba que ya habían pasado los componentes más solubles en dicho solvente.

Se recogieron fracciones de 10 ml. Se emplearon 5 ml de las mismas para efectuar una titulación y el

resto fué utilizado para las medidas espectrofotométricas y para la identificación de las sustancias presentes por cromatografía en papel.

Para las titulaciones se mezclaron los 5 ml de solución con igual volumen de agua en un erlenmeyer de 50 ml, se agitó unos segundos para transferir el ácido a la fase acuosa, se agregó el indicador azul de bromotimol y se tituló con hidróxido de sodio 0,02 normal.

En las cromatografías en papel se utilizaron los métodos que ya se habían indicado anteriormente. Se utilizó el sistema de solventes No.1 y se colocaron testigos de ácido clorogénico y neoclorogénico para identificar las zonas fluorescentes. Para los ácidos cafeico e isoclorogénico no fueron necesarios testigos porque éstos eran fácilmente identificables en el cromatograma por su fluorescencia verde y por su Rf.

Tabla XI. Identificación de los ácidos clorogénicos aislados por cromatografía en columna.

<u>Fracción</u>	<u>Solvente de elución butanol-cloroformo.</u>	<u>Identificación por cro- matografía en papel.</u>
7 a 20	5:95	sin fluorescencia
21	15:85	ácido isoclorogénico
22 a 27	15:85	idem
28	15:85	idem
29 a 30	15:85	ácido clorogénico
31 a 38	15:85	idem
39 a 42	15:85	idem
43 a 49	25:75	banda 5107
50	25:75	idem
51 a 56	25:75	sin fluorescencia
57 a 60	25:75	ácido neoclorogénico
61 a 69	35:65	idem
70 a 72	35:65	idem
73 a 78	35:65	sin fluorescencia
78 a 85	50:50	sin fluorescencia

Las mediciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro Unicam, usando como blanco la misma mezcla de solventes que componía el líquido de elución, el cual variaba con las fracciones, como se indica en la tabla. Las lecturas se hicieron a 310, 315, 320, 325, 330, 335 y 340 m μ y sólo se consideraron como ácidos derivados del cafeico las fraccio-

nes con máximos en 325 ó 330 m μ . Cuando la absorción a 325 ó 330 era demasiado alta, se hacían diluciones de la muestra con la mezcla cloroformo-butanol adecuada. La transformación de lecturas de absorción a pesos se hicieron utilizando los datos de El^{1%} dados por Sondheimer (1958).
lcm

Los resultados de las titulaciones, comparados con los datos de absorción fueron los indicados en la tabla XII.

Tabla XII. Dosaje de los ácidos clorogénicos de la yerba mate.

<u>Acido</u>	<u>Por titulación</u>	<u>Por espectrofotometría</u>
Isoclorogénico	35,8 mg	42,4 mg
Clorogénico	7,2 mg	6,6 mg
Neoclorogénico	15,8 mg	23,2 mg

En el ácido neoclorogénico la diferencia entre los dos métodos era muy elevada, mientras que no ocurre lo mismo con los otros dos ácidos; pero de todas maneras no hay duda que los resultados obtenidos indicaban aproximadamente la concentración de los ácidos clorogénicos en la yerba mate. El análisis de la fracción de los tubos 43 - 50 dió los siguientes resultados: Si se le asigna el peso molecular 354 daría por titulación 6 mg y por espectrofotometría a 325 m μ

si $R_{1\%} = 440$ serían 14 mg. Dicha sustancia dió los R_f indicados en la Tabla XIII por cromatografía en papel, donde se ve que es perfectamente diferenciable de los ácidos clorogénico y neoclorogénico. La sustancia se comporta por cromatografía de la misma manera que la sustancia Tubos 19-20 que se describe más adelante y que se obtiene cuando se hace actuar hidróxido de sodio sobre el ácido neoclorogénico o sobre la "Sustancia Tánica de Hauschild" (S.T.H.).

Tabla XIII. Cromatografía en papel de la banda 510.

	<u>Sistema 1</u>	<u>Sistema 2</u> (Papel 3 & 8)	<u>Sistema 3</u>
Ac. clorogénico	.58	.65	.11
Ac. neoclorogénico	.65	.57	.03
Banda 510	.52	.54	.06
Sustancia T 19-20 (Otro cromatograma)	.45	.50	.07

DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE.

Las distribuciones se realizaron empleando un aparato Craig de 50 tubos, de 10 ml de capacidad para cada fase. Se utilizó como fase inferior buffer de fosfato de sodio 2 molar a pH 3, el cual se preparaba de la siguiente manera:

132 ml de ácido fosfórico 85% se diluyen hasta unos 500 ml con agua y se agregaba solución de hidrato de sodio al 50% hasta aproximarse al pH deseado; luego se dejaba enfriar la solución a temperatura ambiente, se ajustaba el pH hasta 3.0 exactamente y se llevaba a 1000 ml. Se comprobó que era importante que el pH de la fase acuosa fuese siempre el correcto para obtener resultados reproducibles. Como fase superior se utilizó acetato de etilo. El acetato de etilo se purificaba previamente sometiendo a la destilación recogiendo la fracción que pasaba entre 76,5 y 77°.

Las medidas de concentración de las sustancias en la fase superior e inferior después de realizada la distribución se efectuaban midiendo la absorción a 325 m μ en un espectrofotómetro Beckman DU. Habitualmente no se calculó el valor de ϵ en cada lectura sino que se expresaron los resultados en A = absorbancias que son los valores que se leían directamente en la escala del espectrofotómetro.

Las curvas teóricas de distribución se calculaban según el método que se encuentra descrito por Craig y Craig (1950).

Las diferentes fracciones fueron estudiadas por cromatografía en papel, con los sistemas más adecuados para cada caso. Se utilizaron preferentemente los tubos correspondientes a cada pico, y las fases de acetato de etilo de los mismos por no contener estas últimas sales que pudiesen interferir en los resultados de la cromatografía en papel. Si era necesario, la fase de acetato de etilo empleada se concentraba para tener una concentración suficiente de sólido que facilitara la realización de la cromatografía. La experiencia demostró que cuando la absorción medida en el aparato era menor de $A = 0,080$ a $A = 0,100$, en la escala que se extendía de cero a infinito, aun la concentración entre 10 - 20 veces su volumen original no permitía revelar la presencia de sustancia alguna por los métodos cromatográficos empleados.

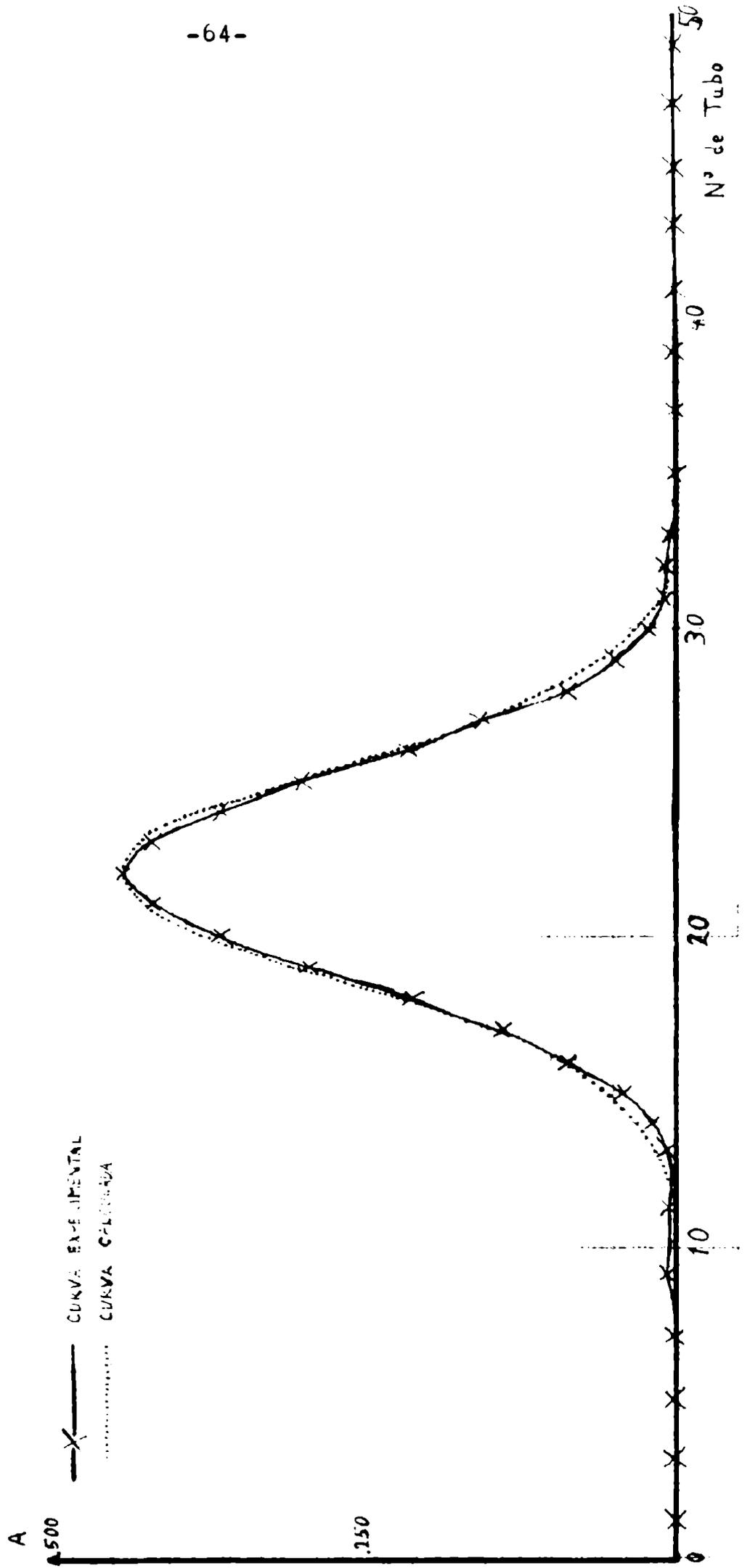
DISTRIBUCION DEL ACIDO CLOGENICO

Se utilizó un ácido clorogénico preparado según Moores, Dermott y Wood (1948), que tenía las siguientes constantes: Punto de fusión 208° y poder rotatorio en alcohol agua (1:1) -39° ; siendo las cifras de la literatura: Punto de fusión $207-208^{\circ}$, poder rotatorio: $[\alpha]_D = -38,0$. Se emplearon 2 mg de ácido en cada experiencia de distribución. Se efectuaron 50 transferencias y se procedió entonces a determinar las concentraciones en las dos fases de cada tubo con el procedimiento que se ha indicado anteriormente.

Utilizando los datos obtenidos con la fase superior, se obtuvieron los datos indicados por la curva (Gráfico I). Presentaron un máximo en los tubos 21 a 22. El cálculo teórico demostró que se trataba de una sustancia pura.

La repetición de este ensayo, que se efectuó varias veces por ser la sustancia que se disponía en mayor cantidad y para controlar la constancia de los resultados, dió siempre una distribución idéntica a la mencionada.

GRAFICO I. Distribución del Acido Clorogénico.



DISTRIBUCION DEL ACIDO NEOCLOGROGENICO.

Se empleó un ácido neoclorogénico remitido por el Dr. J. W. Corse quien ha descrito un método (Corse - 1953) de preparación del ácido neoclorogénico a partir de puré de duraznos, empleando el método de distribución en contracorriente. Este ácido, según información del Dr. Corse fué obtenido a partir de ciruelas.

En nuestro caso su ensayo de distribución efectuado en forma exactamente igual a la indicada anteriormente, utilizando 2 mg, dió la curva que se indica (Gráfico II) cuyo máximo se encuentra entre los tubos 9 y 10 y que coincide con la curva teórica, indicando la buena pureza de la sustancia. La diferencia entre los máximos del ácido clorogénico y neoclorogénico permite su fácil diferenciación por distribución en contracorriente.

Por cromatografía en papel se verificó que el producto no había sufrido transformación porque dió el mismo Rf que el ácido neoclorogénico original.

Acción del calor sobre el ácido neoclorogénico.

Como aparentemente la materia tánica es un anhídrido del ácido neoclorogénico, se aplicó la técnica ya usada por Barnes, Feldman, White (1950) para anhi-

drizar isoclorogénico.

Se calentó durante 16 horas al vacío, a 134° , 5 mg de ácido neoclorogénico en presencia de pentóxido de fósforo.

Una muestra de este producto calentado dió la distribución en contracorriente indicada en la curva (Gráfico III). La misma reveló que no se produjo cambio alguno con respecto al ácido neoclorogénico original puesto que se obtuvo un solo pico coincidente con los mismos tubos que la curva del producto original. La curva teórica coincidía con la encontrada, lo cual confirmaba que la sustancia no se había alterado o modificado por calentamiento.

GRAFICO II . Distribución del Acido Neoclorogénico.

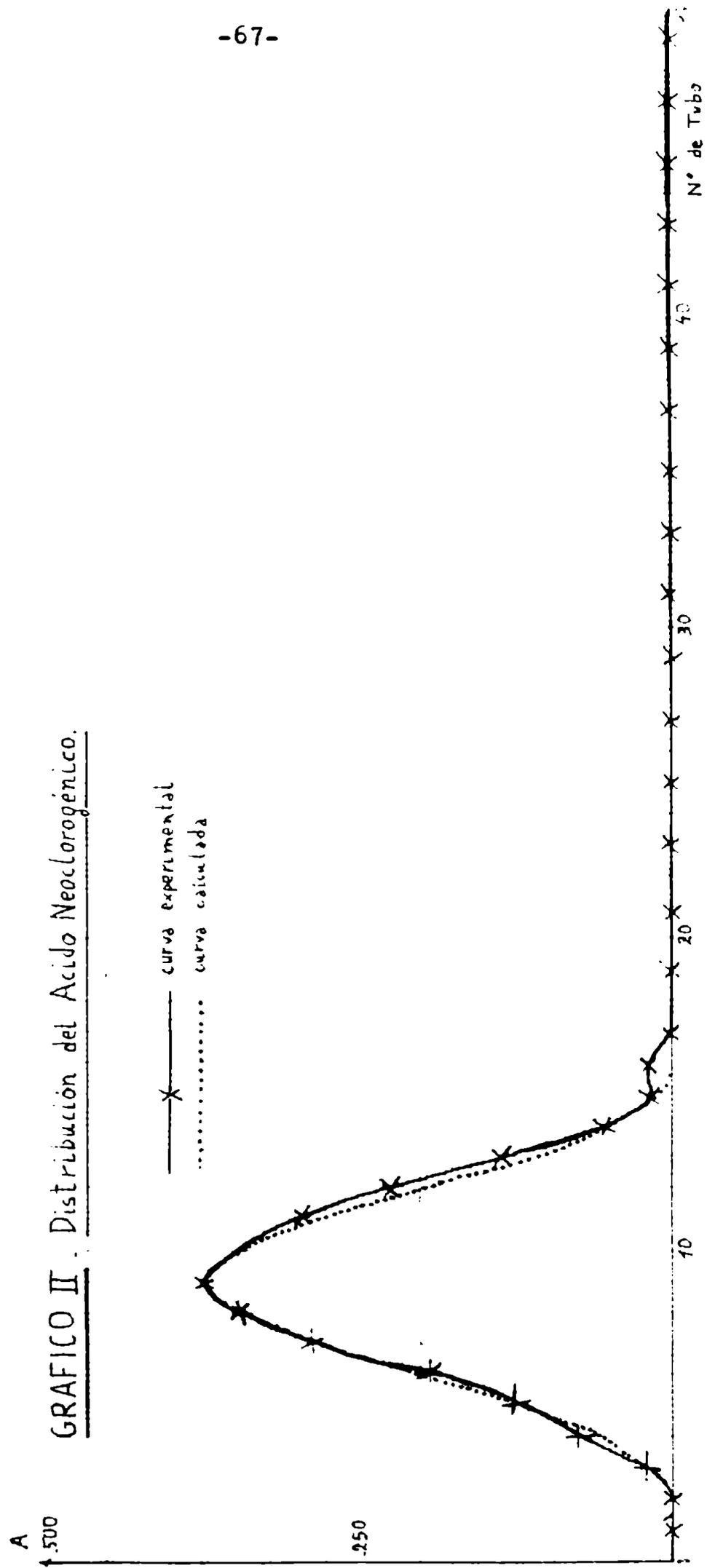


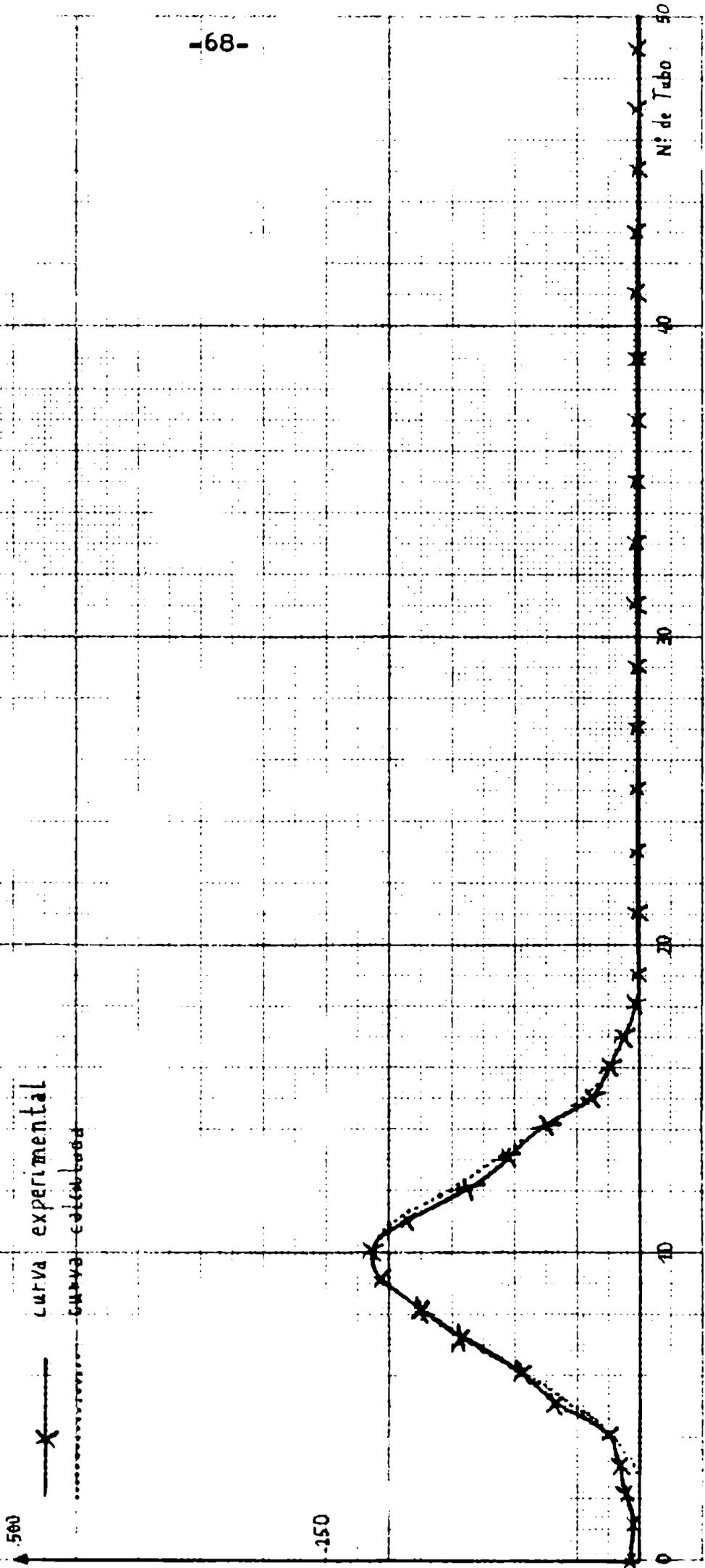
GRAFICO III Distribución del Acido Neoclorogénico Calentado a 134°

A

500

250

— X — curva experimental
..... curva calculada



DISTRIBUCION DEL ACIDO ISOCLOGENICO.

Este ácido fué obtenido de las aguas madres de la preparación del ácido clorogénico a partir de café, según el método de Barnes, Feldman, White (1950). Era una sustancia amorfa. Sus Rf en distintos solventes coincidían con las cromatografías en papel descritas en la literatura.

Este ácido, distribuido en contracorriente con el mismo sistema que se ha indicado anteriormente, reveló un desplazamiento bastante cercano al ácido cafeico y a la S.T.H. (Gráfico IV). El máximo se encontró en el tubo 47. Ensayos efectuados por cromatografía en papel (sistema 1) indicaron que era posible una fácil identificación de las tres sustancias cuyos máximos se encuentran en la curva de distribución entre los tubos 40 y 50. Así los resultados de las cromatografías de los tubos de máxima concentración fueron respectivamente:

<u>Sustancia</u>	<u>Rf en el sistema No.1</u>
Contracorriente ácido cafeico	.17
Contracorriente de S.T.H.	.31
Contracorriente de ác.isoclorogénico	.14 cola

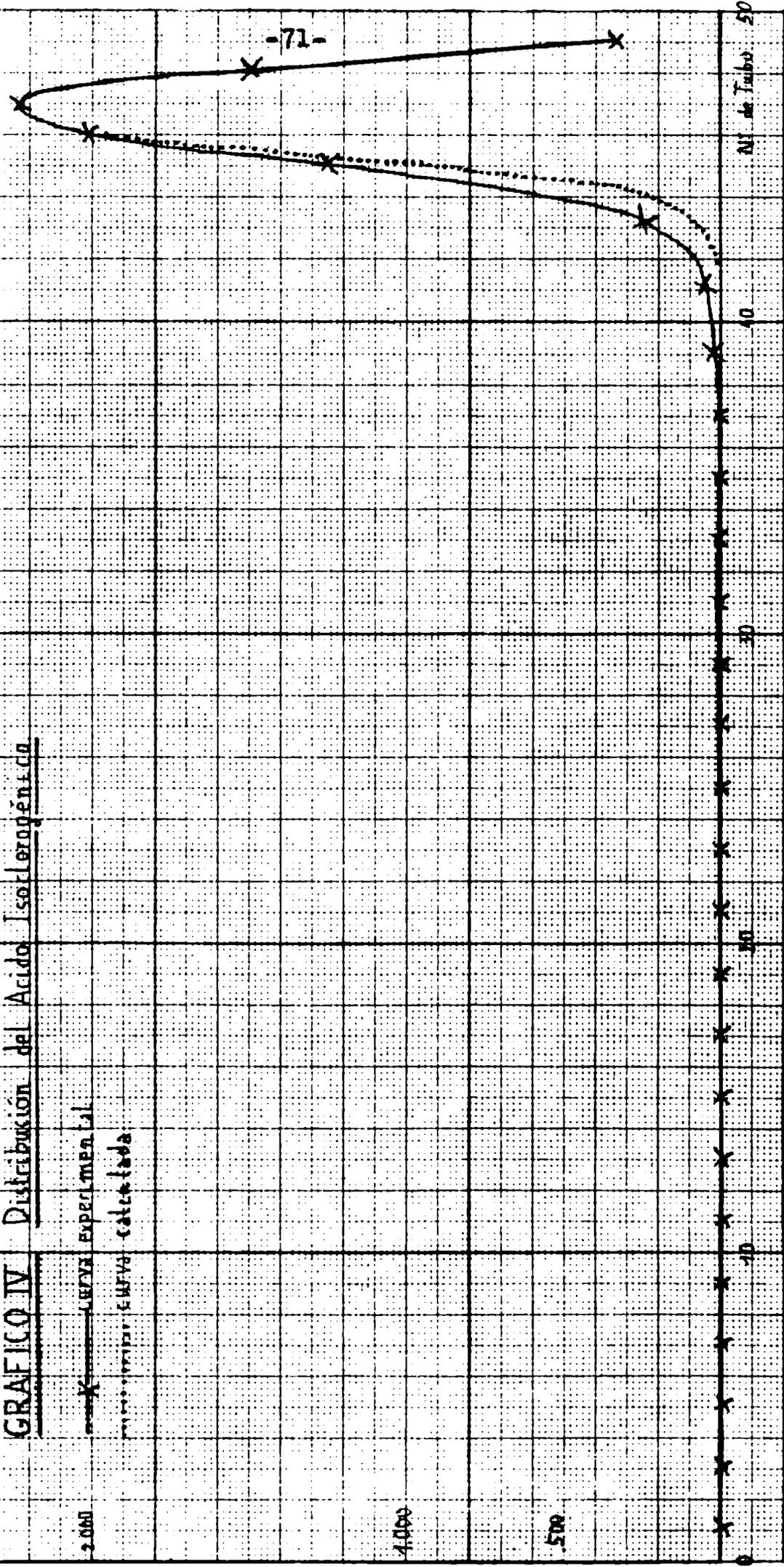
Con esta experiencia también se confirmó que las sustancias sometidas a la partición en contra-

corriente no habian sufrido ninguna transformación durante este proceso.

A

GRAFICO IV Distribución del Acido Isoclorogénico

 CURVA EXPERIMENTAL
 CURVA CALCULADA



DISTRIBUCION DE LA MATERIA TANICA.

Se empleó una muestra de materia tánica preparada por Deulofeu, Díaz, Fondovilla y Mendive (1943) a partir de yerba mate y cuyas constantes coincidían con las de Hauschild (1935). Se sometieron 2 mg a la distribución en contracorriente con el sistema ya indicado, obteniéndose un máximo de absorción en el tubo 43. La curva de distribución coincidía con la teórica indicando un producto puro (Gráfico V).

DISTRIBUCION DEL ACIDO CAFEICO.

Como el ácido cafeico podía ser un producto de hidrólisis de la sustancia tánica, o de los ácidos clorogénicos ensayados, se estableció su comportamiento en la distribución en contracorriente para poderlo distinguir.

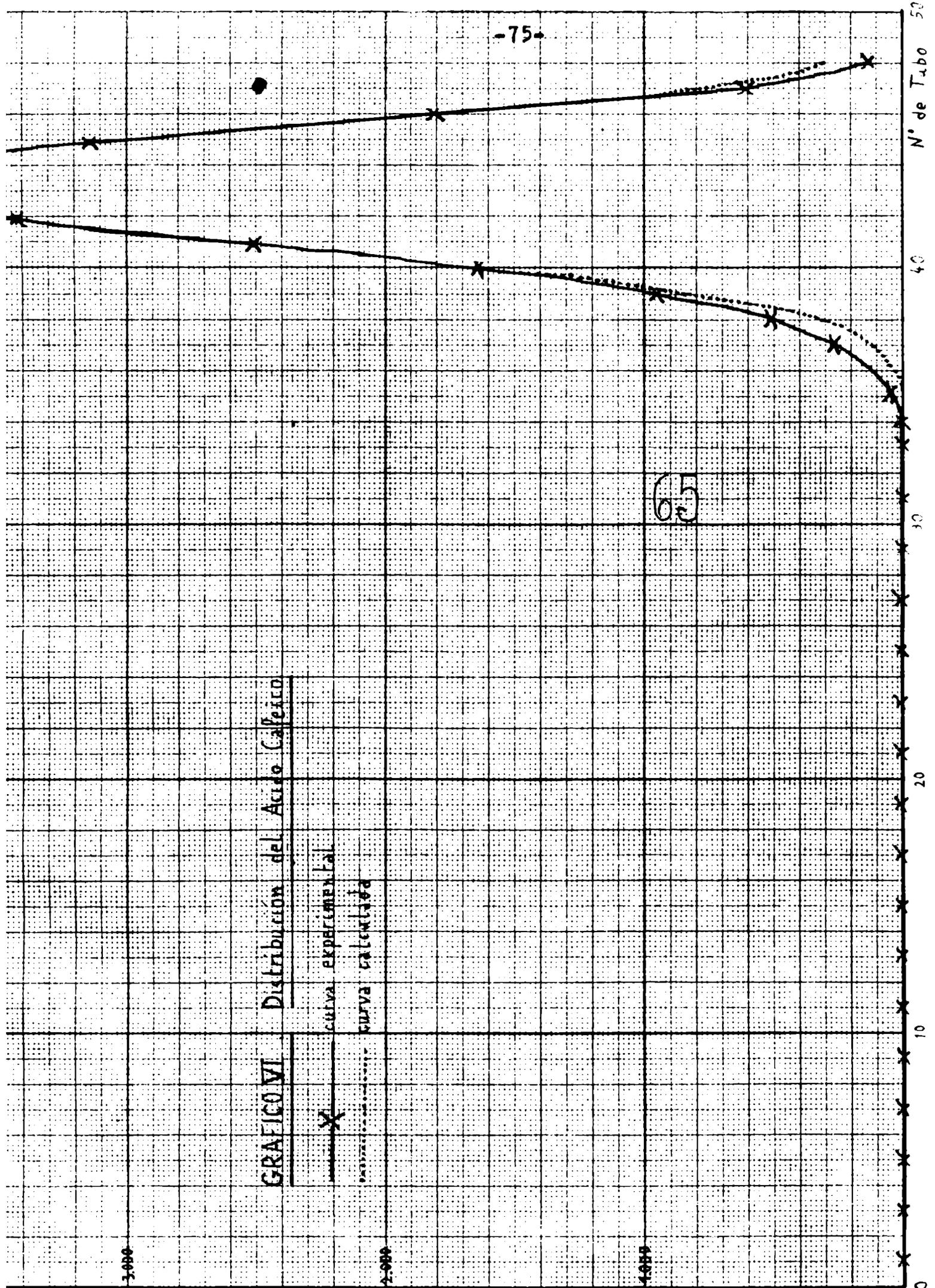
Se empleó ácido cafeico preparado a partir de yerba mate, de acuerdo a la técnica descrita en Deulofeu, Díaz, Fondovilla, Mendive (1943). Este producto fundía a 213° y se utilizaron 2 mg para el ensayo de distribución en el sistema indicado. Se obtuvo un máximo en el tubo 43 y la curva de distribución coincidía con la teórica, indicando un producto puro (Gráfico VI).

GRAFICO VI

Distribución del Ácido Cafeico

curva experimental

curva calculada



-75-

65

Nº de Tubo 50

40

30

20

10

0

ACCION DE LOS ALCALIS DEBILES

SOBRE LA S.T.H.

1. Se había observado que la S.T.H. tratada con álcalis débiles en medio hidroalcohólico sufría una transformación, lo cual podía observarse claramente al efectuar una cromatografía en papel como se indica en la siguiente experiencia:

En cuatro tubos de ensayo se distribuyeron respectivamente:

Tubo 1 1 mg de S.T.H. + 0,1 ml alcohol-agua.

Tubo 2 1 mg de S.T.H. 0,1 ml alcohol-agua 0,05 ml
NaOH 0,1 N.

Tubo 3 1 mg ác. clorogénico 0,1 ml alcohol-agua.

Tubo 4 1 mg ác. clorogénico 0,1 ml alcohol-agua
0,05 ml NaOH 0,1 N.

Se colocan los cuatro tubos en baño maría a 55° durante una hora haciendo circular nitrógeno por cada una de las soluciones para tener una atmósfera inerte. Luego se enfriaron los tubos, se extrajo la correspondiente muestra de cada uno y se estudió por cromatografía. Los resultados son los indicados a continuación:

Tabla XIV. Acción de álcalis sobre la S.T.H.

Cromatografías.

<u>Tubo No.</u>		<u>Rf en sistema 3</u>
1	S.T.H. sin álcali	.65.00
2	S.T.H. con álcali débil	.03.07.
3	Ac. clorogénico sin álcali	.13.
4	Ac. clorogénico con álcali débil	.14.

Se podía comprobar que la S.T.H. se había transformado en otro producto por acción del álcali diluido (tubo 2), mientras que el testigo sin álcali (tubo 1) daba los mismos Rf que la sustancia pura original. La experiencia similar que se hizo con el ácido clorogénico indicaba que el mismo no sufría ninguna transformación (tubos 3 y 4).

Se pensó que podía tenerse una idea de la transformación producida estudiando los productos con una distribución en contracorriente.

2. Partición en contracorriente de la S.T.H. tratada con álcalis diluidos.

2,010 mg de la sustancia técnica de la yerba mate se disolvieron en 0,2 ml de alcohol-agua (1:1), se añadió 0,1 ml de hidrato de sodio 0,1 N y se calentó en baño de agua a 55° durante 1 hora. Terminado el calentamiento, la solución obtenida se añadió a 10 ml

del buffer de fosfatos a pH 3 que formó la fase inferior del sistema de distribución en contracorriente empleado y se procedió a efectuar una distribución en las mismas condiciones que se utilizaron para las sustancias puras.

Al analizarse las absorciones de los diferentes tubos, se encontraron tres picos (Gráfico VII). Uno de ellos dió un máximo en el tubo No.9 y por cromatografía en papel se identificó como ácido neoclorogénico (Rf .55 y .62 en los sistemas Nos. 1 y 2).

La sustancia que daba un máximo en el tubo 19, estudiada por cromatografía en papel resultó ser idéntica a la sustancia que se encontró al someter el ácido neoclorogénico a la acción de los álcalis diluidos (Rf .08 en el sistema No.3).

La sustancia con un máximo en el tubo No.44 reveló ser una mezcla: por cromatografía en papel se identificó ácido cafeico y sustancia tánica. La comparación de la curva de distribución con la curva teórica demostró también que se estaba en presencia de una impureza que se desplazaba más lentamente que la sustancia tánica, en este caso ácido cafeico.

Repetiendo la experiencia anterior en idénticas condiciones, pero prolongando el calentamiento por 1,5 horas, se obtuvo una distribución esencialmente

igual a la anterior. La única diferencia que pudo anotarse es que el pico de ácido neoclorogénico había sufrido una disminución de aproximadamente 25%, por haberse producido una mayor hidrólisis, aumentando el de ácido cafeico (Gráfico VIII).

GRAFICO VII Distribución de la S.T.H. trabada con Alcolis Diluidos durante 1 hora.

x curvas experimentales

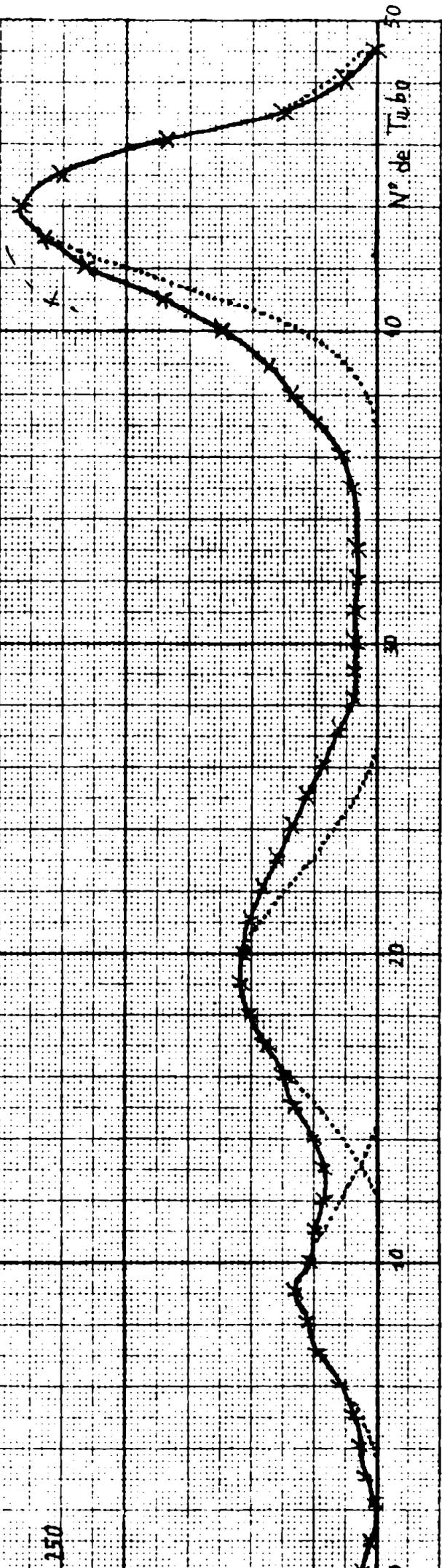
..... curvas calculadas

A

500

250

-80-



A GRAFICO VIII Distribucion de la S.T.H. tratada con Alcalis Diluidos durante 15 horas

—x— CURVA EXPERIMENTAL
..... CURVAS TEORICAS

500

250

Nº de Tubo 50

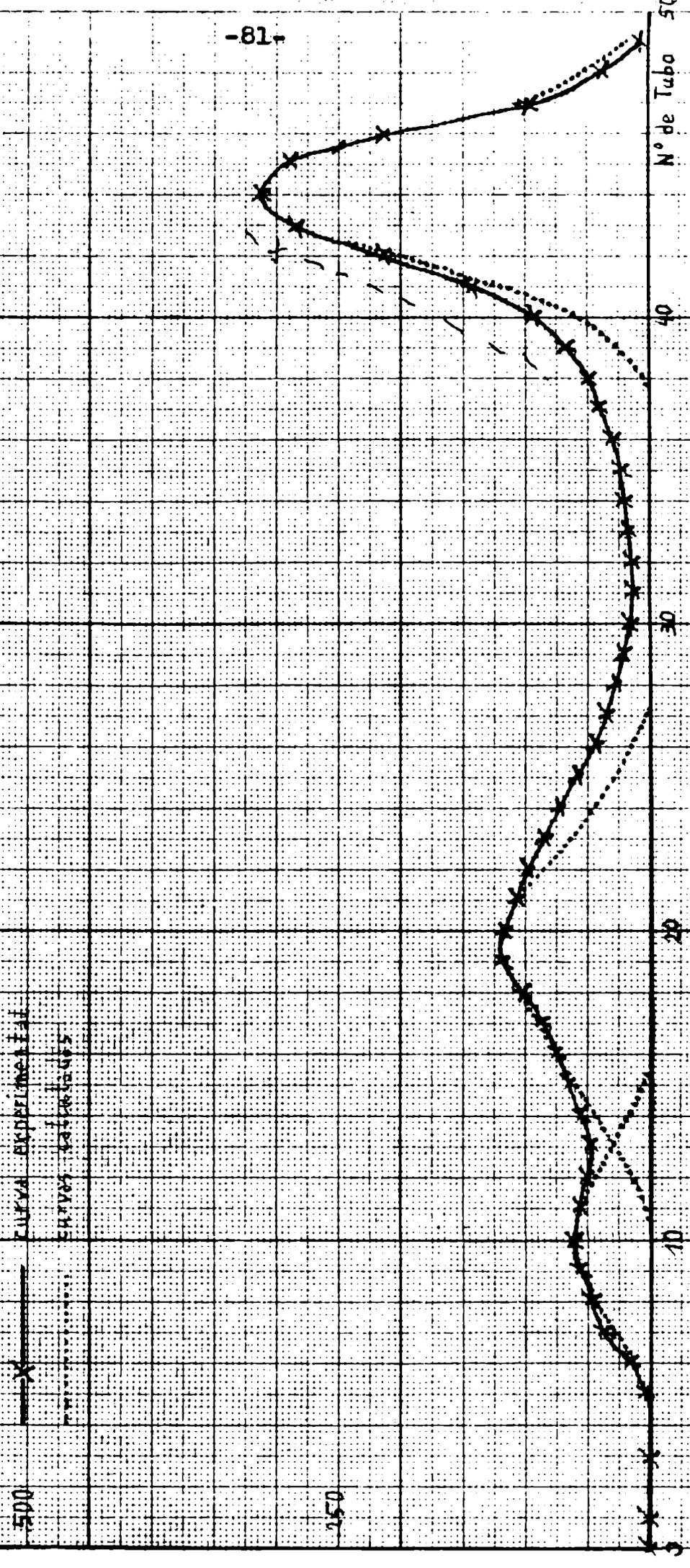
40

30

20

10

5



ACCION DE LOS ALCALIS DILUIDOS
SOBRE EL ACIDO NEOCLOGENICO.

1. 1,5 mg de ácido neoclorogénico se disolvieron en 0,15 ml de alcohol-agua (1:1), se añadió 0,075 ml de hidrato de sodio 0,1 N y se calentó en baño de agua a 55° durante 1 hora. Terminado el calentamiento, la solución obtenida se añadió a 10 ml del buffer de fosfatos a pH 3 que forma la fase inferior del sistema de distribución en contracorriente empleado y se procedió a efectuar una distribución en las mismas condiciones que se utilizaron para las sustancias puras.

Al analizarse las absorciones de los diferentes tubos se encontraron dos picos (Gráfico IX). Uno de ellos dió un máximo en el tubo No.11 y, por cromatografía en papel, demostró ser idéntico al ácido neoclorogénico, como se indica en la tabla XV.

La sustancia S 19-20, que daba un máximo en el tubo No.20, estudiada por cromatografía en papel en los mismos sistemas, tenía valores Rf que la distinguían netamente del ácido neoclorogénico originalmente tratado y de los otros conocidos. No pudo observarse ningún pico que pudiera atribuirse al ácido cafeico.

Tabla XV. Cromatografía de los picos de los tubos
No.11 y No.20.

<u>Sustancia</u>	<u>Rf en sistema No.1</u>	<u>Rf en sistema No.2</u>
Tubo No.11	.56	.45
Ac.neoclorogénico	.56	.45
Tubo No.20	.45	.50
Ac.clorogénico	.50	.53

La solución de este nuevo producto daba un máximo de absorción en 325 m μ , que coincidía con el máximo de los ácidos clorogénicos y cafeico (ver curva pág.).

2. 2 mg de ácido neoclorogénico se disolvieron en 0,2 ml de alcohol-agua (1:1), se añadió 0,1 ml de hidrato de sodio 0,1 N y se calentó en baño de agua a 55° durante 3 horas.

La distribución en contracorriente del producto calentado efectuada en la misma forma que se ha indicado en la experiencia anterior (1) dió máximos en los tubos Nos.11, 20 y 44 (Gráfico X). La cromatografía en papel indicó nuevamente que la sustancia con máximo en el tubo No.11 era ácido neoclorogénico (Rf .65 y .41 en los sistemas Nos.1 y 2) y que la sustancia presente en el máximo del tubo No.20 tenía Rf correspondientes con los de la experiencia anterior (.50 y

.46 en los sistemas Nos. 1 y 2).

En cuanto a la sustancia con un máximo en el tubo No.44, reveló ser ácido cafeico (Rf .18 en el sistema No.1).

3. Se colocaron en tubos separados 1,5 mg de ácido neoclorogénico y 1,5 mg de S.T.H. y ambos se sometieron al proceso de hidrólisis alcalina suave durante 1 hora exactamente igual como se indicó más arriba. Luego se transfirió el contenido de los dos tubos a la misma fase de buffer de fosfatos a pH 3 del tubo No.0 de la partición a contracorriente. Se realizó la distribución en las mismas condiciones que las sustancias puras. Al analizarse las absorciones (Gráfico XI), se encontró que se obtenían dos picos principales en la primera zona del sistema de tubos; uno en el tubo No.10 que correspondía a ácido neoclorogénico y otro pico en el tubo No.21 que correspondía a la sustancia desconocida llamada T 19-20 que producen por tratamiento con álcalis diluidos, el ácido neoclorogénico y la S.T.H. Además se encontró un pico en el tubo No.45, que por cromatografía en papel demostró ser S.T.H. sin hidrolizar (Rf .35 en el sistema No.1). Sin embargo, la forma ensanchada de la curva indica la presencia de otra sustancia con máximo en las cercanías del tubo No.42. Esta sustancia, que no

pudo identificarse por cromatografía en papel debida a estar presente en pequeñas cantidades, podría ser ácido cafeico, cuyo máximo está en el tubo 43.

A
GRAFICO IX Distribución de Acido Neoclorogenico Tratado con Alcalis Diluidos durante 1 hora.

—x— curva experimental
..... curvas calculadas

500

450

0

10

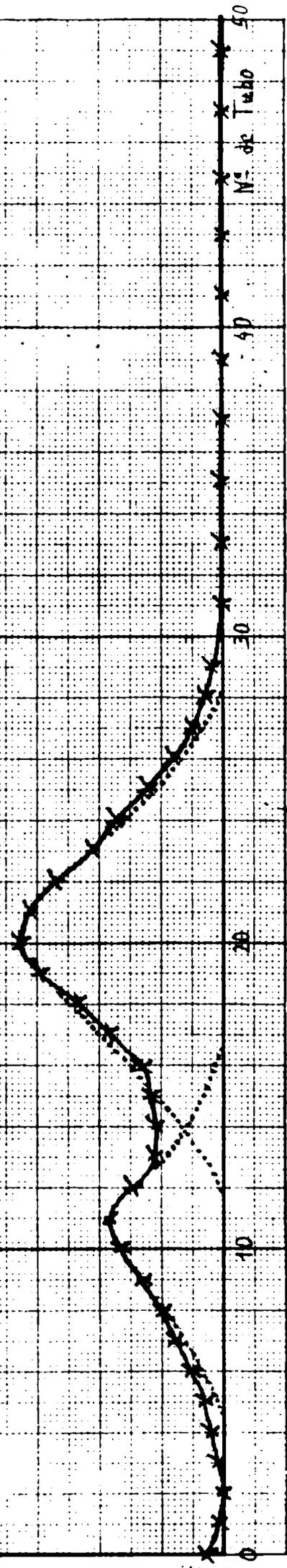
20

30

40

50

Nº de Tubo



17

A

GRAFICO X Distribucion de Acido Neocloropreno tratado con Alcalis Diluidos durante 3 horas

x curva experimental
 curvas calculadas

0.500

0.500

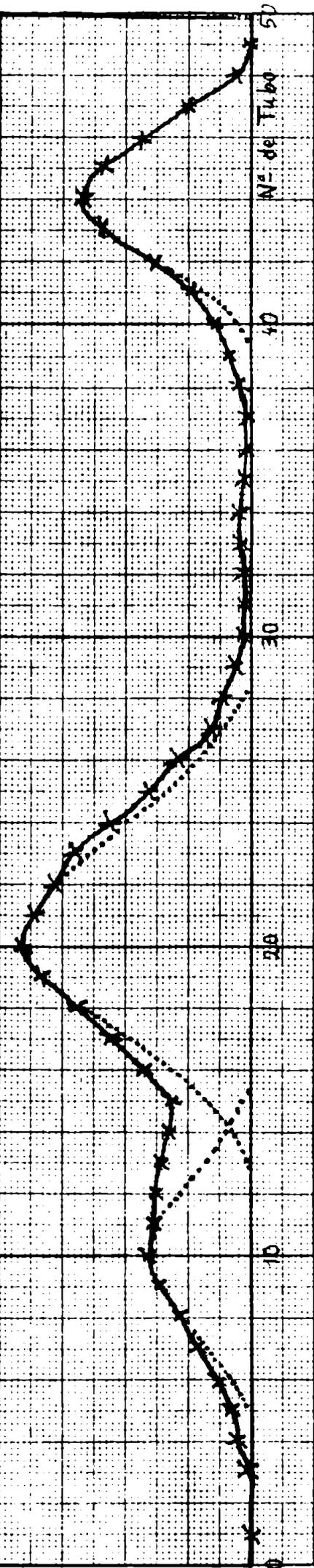


GRAFICO XI Distribucion de Acido Neotelorogenico y S.T.H. tratadas con Alkali Diluido

—x— curva experimental

..... curvas calculadas

A

500

250

Nº de Tubo

40

30

20

10

0

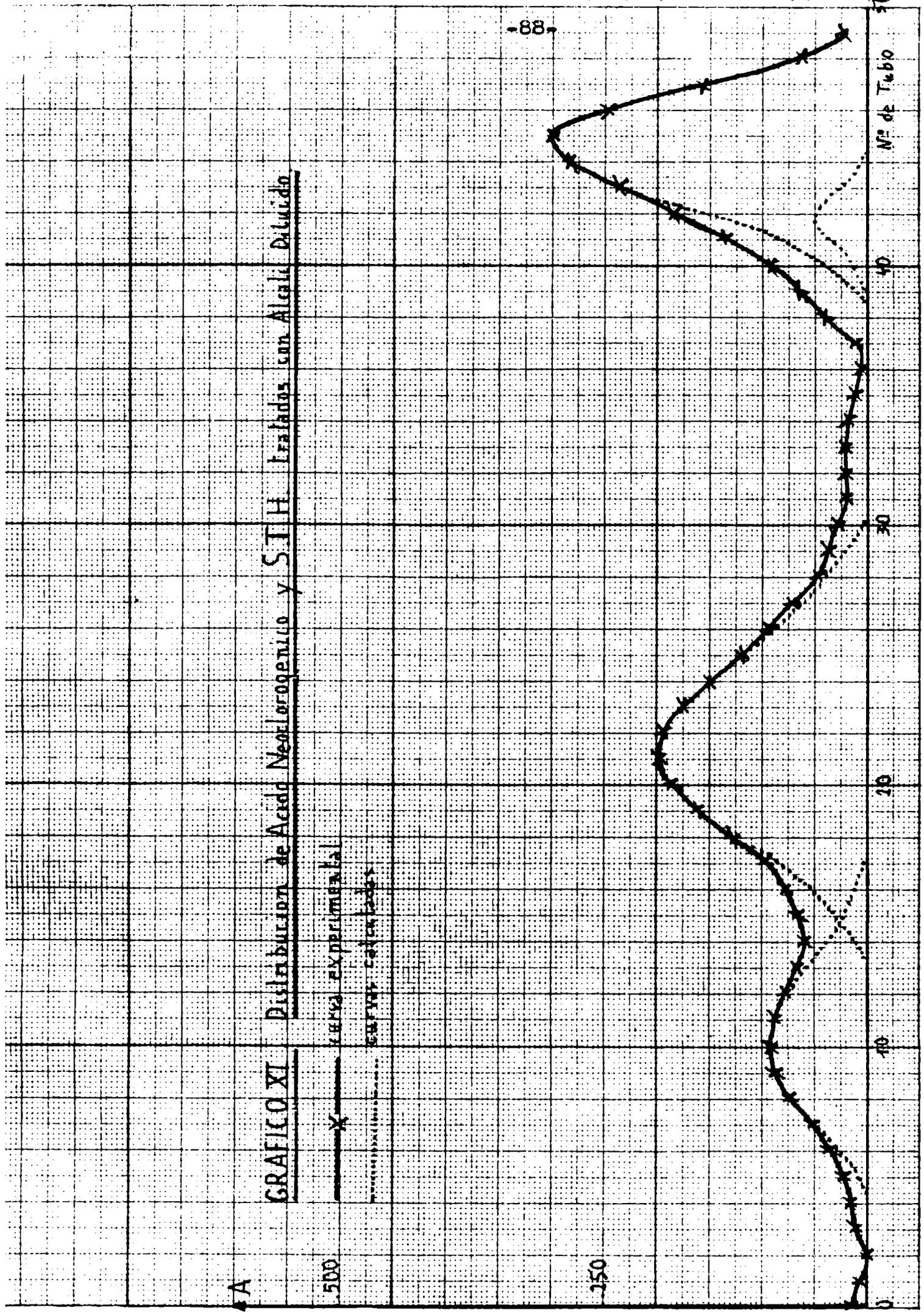
2

10

12

50

52



ACCION DE LOS ALCALIS DILUIDOS

SOBRE EL ACIDO CLOROGENICO.

1,5 mg de ácido clorogénico se disolvieron en 0,15 ml de alcohol-agua (1:1), se añadió 0,075 ml de hidrato de sodio 0,1 N y se calentó en baño de agua a 55° durante 1 hora.

Terminado el calentamiento, la solución obtenida se añadió a 10 ml del buffer de fosfatos a pH3 que formaba las fases inferiores del sistema de distribución en contracorriente empleado, y se procedió a efectuar una distribución en las mismas condiciones que se utilizaron para las sustancias puras.

Las absorciones de los diferentes tubos dieron nuevamente un máximo en el tubo No.22 y la curva de distribución coincidía con la teórica, indicando una sustancia pura (Gráfico XII).

Un pequeño pico observado en el tubo No.43 no pudo estudiarse por cromatografía en papel debido a la gran dilución del sólido, pero por su ubicación y máximo de absorción (325 mμ) debía ser ácido cafeico.

GRAFICO VII
Distribucion de Acido Cloropénico tratado con Alas de D. hirsuta

..... CURVA EXPERIMENTAL
———— CURVA CALCULADA

A

500

250

0

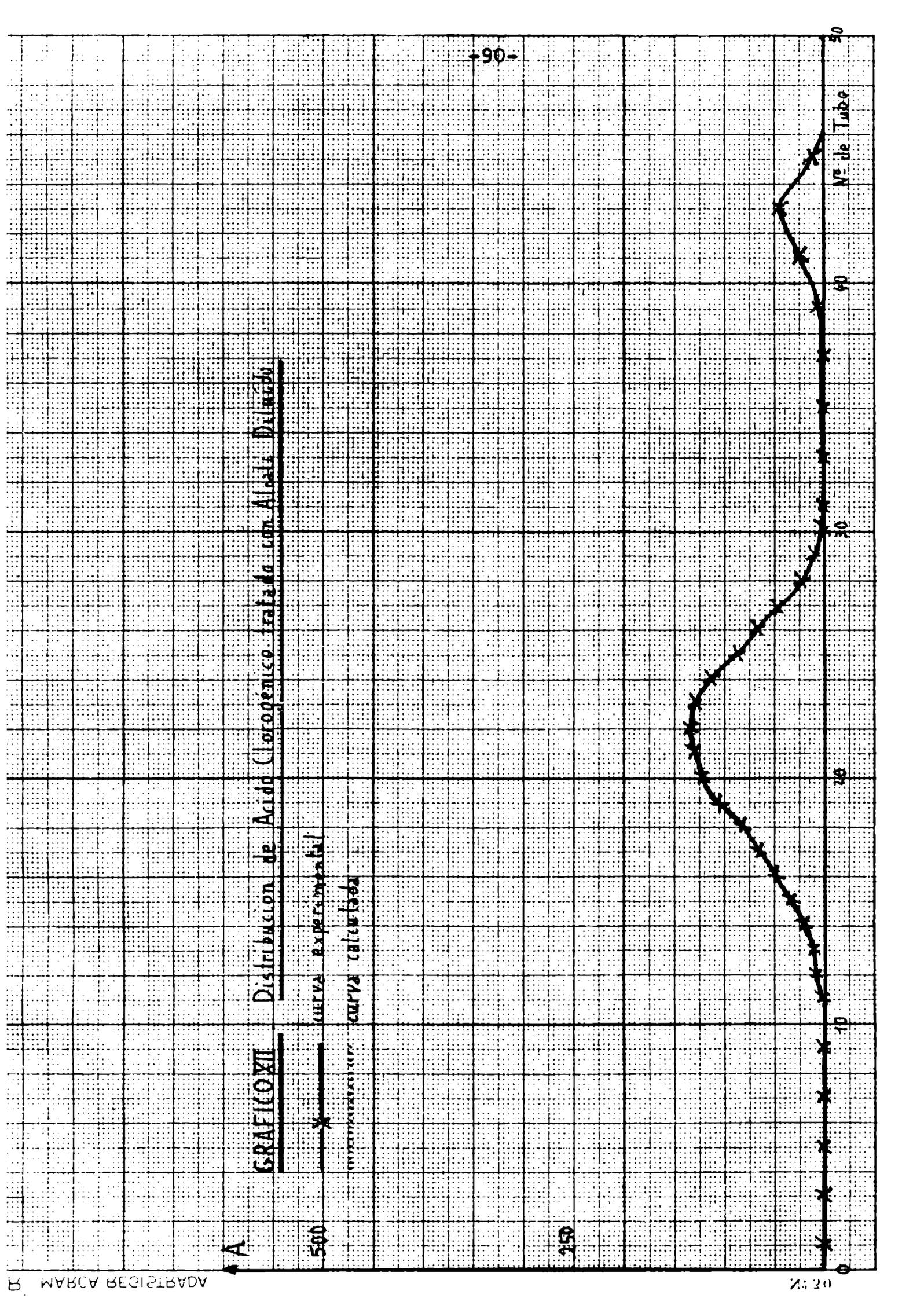
Nº de Tubo

40

50

20

10



ACCION DE LOS ALCALIS DILUIDOS
SOBRE EL ACIDO ISOCLOGENICO.

2 mg de ácido isoclorogénico se disolvieron en 0,2 ml de alcohol-agua (1:1), se añadió 0,1 ml de hidrato de sodio 0,1 N y se calentó en baño de agua a 55° durante 1 hora.

Terminado el calentamiento, la solución obtenida se añadió a 10 ml del buffer de fosfatos a pH 3 que formaba la fase inferior del sistema de distribución en contracorriente empleado y se procedió a efectuar una distribución en las mismas condiciones que se utilizaron para las sustancias puras.

Las absorciones de los diferentes tubos dieron nuevamente el máximo en el tubo No.47 que en este sistema corresponde al ácido isoclorogénico (Gráfico XIII). La curva de distribución coincidía con la teórica, indicando que se trataba de una sustancia pura. Por cromatografía en papel no fué posible detectar la aparición de ácido cafeico. Tampoco pudo comprobarse la formación de otra sustancia similar a la que producía el ácido neoclorogénico.

A.

GRAFICO XIII Distribucion de Acido Sacaropónico tratado con Alkali Dilitado

— X — CURVA EXPERIMENTAL

— ···· — CURVA CALCULADA

2.000

4.000

0

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

110

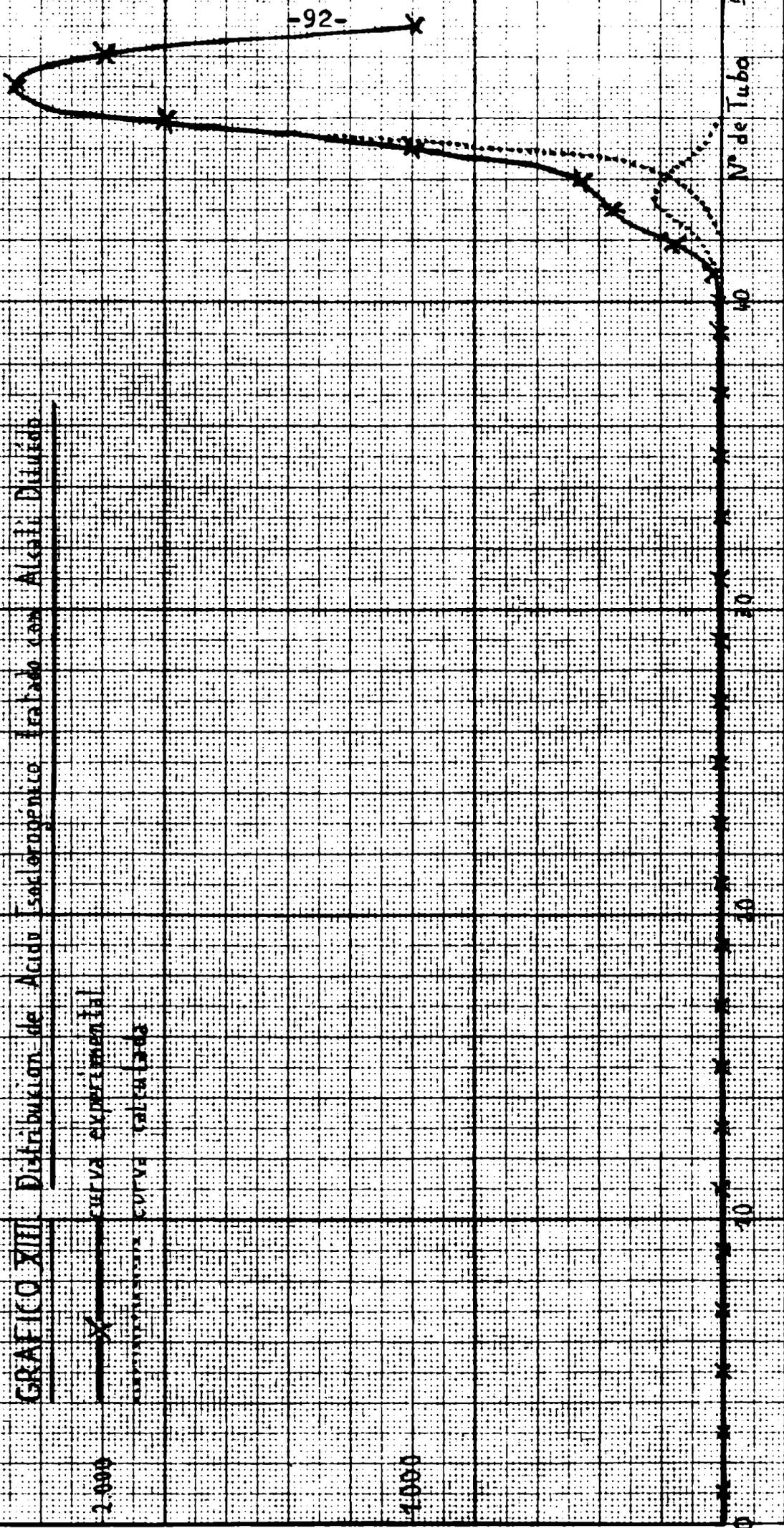
120

130

140

Nº de Tuba

-92-



HIDROLISIS ACIDA

DE LA SUSTANCIA TANICA DE HAUSCHILD.

2 mg de S.T.H. se disolvieron en 0,5 ml de ácido clorhídrico 6 N, y se calentó durante una hora en baño de agua hirviente, que son las condiciones habituales de hidrólisis de los ácidos clorogénicos (Cartwright y Roberts - 1955). Se enfrió y se extrajo el líquido cinco veces con 1 ml de éter etílico. Los extractos reunidos y concentrados a 0,5 ml dieron en la cromatografía los resultados indicados más abajo. Paralelamente se sometieron 2 mg de ácido clorogénico al mismo tratamiento y se cromatografiaron los extractos en la misma forma.

Tabla XVI. Cromatografía de la fase éter de la hidrólisis total.

<u>Sustancia</u>	<u>Rf en el sistema No.1</u> (Papel Whatman 1)
Acido cafeico	.21
S.T.H. hidrolizada	.21
Ac. clorogénico hidrolizado	.21

Los tres Rf idénticos indicaban la presencia de ácido cafeico.

Presencia de ácido quínico.

La fase inferior acuosa de la experiencia anterior se cromatografió en papel Whatman No.1 emple-

ando varios sistemas descritos por Jermstad y Jensen (1950) y por Cartwright y Roberts (1955). Paralelamente se desarrolló una muestra de ácido quínico puro y una solución acuosa obtenida en la misma forma que la primera, pero con 2 mg de ácido clorogénico.

Tabla XVII. Cromatografía de la fase acuosa de la hidrólisis total.

<u>Sistema de solventes</u>	<u>Rf S.T.H. hidrolizada</u>	<u>Rf Clorogénico hidrolizado</u>	<u>Rf quínico puro</u>
Butanol-fórmico-agua	.19	.18	.18
Acet. etilo-fórmico-agua	.14	.15	.15
Butanol-Acético-agua	.28	.28	.28
Isopropanol-amoníaco-agua	.64	.64	.66

Se efectuó la identificación de acuerdo con Cartwright y Roberts (1955), tratando el papel seco con solución de metaperiodato de sodio (preparado mezclando 1 volumen de solución saturada con 2 volúmenes de agua). Se dejó actuar durante 20 minutos, se pulverizó con nitroprusiato de sodio y piperacina (50 mg de cada sustancia en 4 ml de etanol al 50%). Se calentó por 5 minutos a 100°C y dió un color amarillo-anaranjado sobre fondo gris.

HIDROLISIS ACIDA

DE LA "SUSTANCIA TUBOS 19-20".

Se utilizó la sustancia proveniente del tratamiento alcalino de ácido neoclorogénico o de S.T.H. Para obtener una cierta cantidad de sustancia del tubo 19-20 y poder efectuar su hidrólisis se utilizaron tres fracciones diferentes:

Fracción 1.

Es el liofilizado de las fases acetato de etilo, secadas y redisueltas en agua, contenida en los tubos Nos.18-22 provenientes del tratamiento de 1,5 mg de ácido neoclorogénico con hidróxido de sodio 0,1 N. Estaba formada por un sólido amorfo de aspecto córneo que fué extraído dos veces con acetato de etilo en frío, dando soluciones que presentaban un máximo en 325 μ . La tercera extracción no extrajo más sustancias que absorbieran a 325 μ . La porción insoluble fué descartada. El espectro de estos productos ya se había hecho y se encontró que el máximo correspondía a 325 μ (ver pág.83).

Fracción 2.

Es el liofilizado proveniente de las fases acetato de etilo secadas y redisueltas en agua de los tubos Nos.18-22 originadas en el tratamiento alcalino con hidróxido de sodio 0,1 N de 2,1 mg de ácido neo-

clorogénico durante 3 horas, de 2,5 mg tratados por 1 hora y la mezcla de 1,5 mg de S.T.H. mezclada con 1,5 mg de neoclorogénico. Se reunieron todas las fases superiores de acetato de etilo de los cinco tubos de mayor absorción (correspondían los Nos.18-22), se concentró al vacío y se obtuvo un producto seco que contenía una gran proporción de sales. Se extrajo el liofilizado como en el caso anterior con acetato de etilo hasta encontrar que los líquidos de extracción dieran un valor bajo de absorción a 325 m μ . Los extractos reunidos se filtraron por papel para separarlos de todas las porciones insolubles.

Fracción 3.

Las fases inferiores de las fracciones empleadas más arriba (experiencias descritas en 1 y 2) se reunieron y formaban unos 250 ml de buffer de fosfatos de pH 3. Se extrajeron 4 veces con 100 ml de acetato de etilo, comprobando por espectrofotometría la presencia de la sustancia T 19-20. La última extracción contenía cantidades sumamente pequeñas de sustancia que absorbe a 325 m μ .

Todos los extractos de acetato de etilo se reunieron y se concentraron al vacío hasta algo menos de 100 ml, filtrándose de un pequeño insoluble que había aparecido. Se completó a 100 ml y se midió la absor-

ción en el espectrofotómetro a 325 m μ encontrándose una absorbancia $A = 0,800$. De los datos de absorción cuantitativa de ácido clorogénico puro en el mismo solvente se pudo calcular que los 100 ml contenían 1,67 mg de la sustancia.

Hidrólisis.

En un balón se colocó la cantidad de acetato de etilo conteniendo 1 mg de la sustancia T 19-20. Se concentró hasta sequedad colocándolo en un desecador vacío. Se añadió entonces 0,25 ml de ácido clorhídrico 6 N, donde la sustancia amorfa se disolvió con facilidad y se calentó durante 1 hora en baño de agua hirviente. Una vez frío se hicieron tres extracciones con 2 ml de éter etílico. Las capas superiores se reunieron, se concentraron hasta 0,5 ml y se hizo un estudio en cromatografía en papel.

Como control se utilizó 1 mg de ácido clorogénico que se sometió a las mismas operaciones que la sustancia T 19-20.

La capa acuosa inferior restante fué calentada suavemente para eliminar el éter disuelto y se estudió la misma para encontrar sustancias solubles en agua del tipo del ácido quínico.

Las cromatografías se hicieron en papel Whatman

No.1 y se desarrollaron conjuntamente con las sustancias patrón adecuadas. Para la fase etérea concentrada se utilizó como solvente de desarrollo ácido acético N/3 y se observaron las zonas a la luz ultravioleta después de someter el papel a la acción del amoníaco. Los Rf encontrados fueron los siguientes:

Tabla XVIII. Cromatografía de la fase éter de la hidrólisis total de S 19-20.

Acido cafeico	.17
Acido clorogénico hidrolizado	.17
Sustancia T 19-20 hidrolizada	.17

Los tres Rf idénticos indicaban la presencia de ácido cafeico.

La fase acuosa se estudió con los dos sistemas de cromatografía, abajo indicados; también sobre papel Whatman No.1. Con el revelador de ácido periódico nitroprusiato, el ácido quínico y el clorogénico hidrolizado presentaron una mancha amarillo canario característica, mientras que el producto de hidrólisis de la sustancia T 19-20 dió una mancha más difusa color naranja sucio. Repitiendo la cromatografía con el solvente isopropanol-amoníaco y pulverizando la tira de papel con azul de bromotimol se encontró que tanto el ácido quínico como la mancha desconoci-

da daban reacción ácida. Los Rf observados se indican en la tabla siguiente:

Tabla XIX. Cromatografía de la fase acuosa de la hidrólisis total de S 19-20.

<u>Solvente</u>	<u>Isopropanol-amoniaco</u>	<u>Acido acético N/3</u>
Acido quínico	.57	.95
Ac. clorogénico hidrolizado	.56	.95
Sust. T 19-20 hidrolizada	.00	.65

Los sistemas de solventes utilizados y el revelador son los descritos por Cartwright y Roberts (1955).

100-

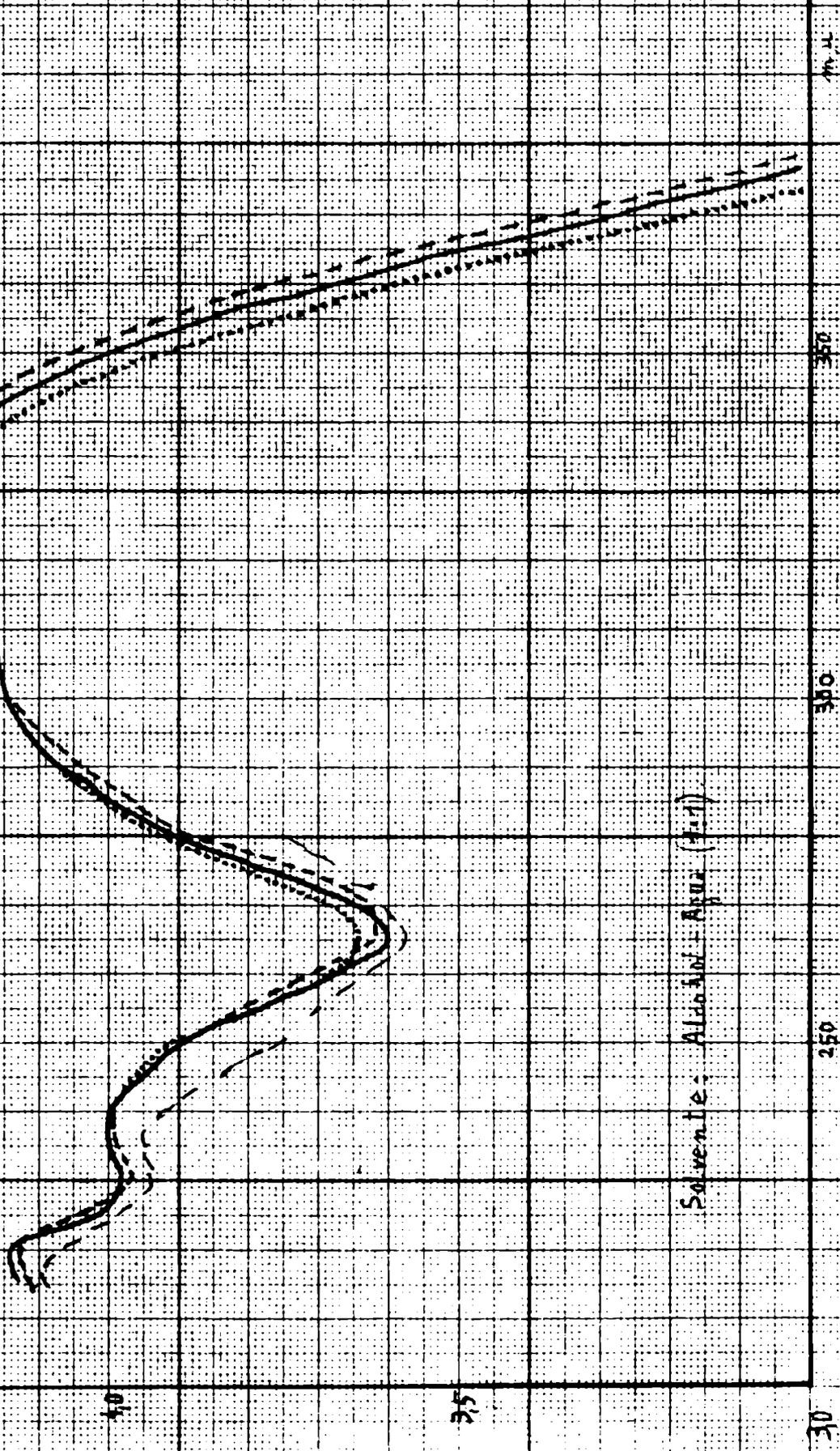
ESPECTRO ULTRAVIOLETA.

El estudio del espectro ultravioleta de las soluciones de materia tánica indica que es muy similar al del ácido clorogénico y del ácido cafeico. En el gráfico se pueden observar sus características que son las siguientes: máximos a 240 y 328 m μ con log 4,0003 y 4,2822 respectivamente; inflexión a 295 y mínimo a 265.

Como este espectro característico proviene de la porción ácido cafeico de las moléculas, la semejanza de los valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ indica que cada molécula contiene un solo resto cafeilo. O dicho de otra manera, a 320 m μ el ácido cafeico tiene $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 915 y la sustancia tánica $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 516, que representa el 56,3% del ácido cafeico. Esta relación está de acuerdo con las relaciones de sus respectivos pesos moleculares que son 180 y 336 respectivamente. En el caso de contener dos restos cafeilo, la relación de los valores de E hubiera sido del 69,7%.

GRAFICO XIV Espectros en el Ultravioleta

- Acido Clmogenico
- - - Sustancia Tenuis
- · · Acido Caprico



Solvente: Alcohol + Agua (1:1)

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- Se puede asegurar que en las hojas de yerba mate existen en cantidades apreciables los ácidos clorogénico, isoclorogénico y neoclorogénico. También existe una sustancia vinculada al grupo de ácidos que contiene el grupo cafeilo, que hemos llamado "sustancia tubos 19-20" (S.T. 19-20). No se ha podido encontrar en cantidades detectables ácido cafeico ni la Sustancia Tánica de Hauschild (S.T.H.).

2.- La Sustancia Tánica de Hauschild no tiene grupos carboxilo libres y, de acuerdo a la curva de titulación, se comporta como una lactona. Por tratamiento alcalino suave el ciclo lactónico se abre y la S.T.H. da lugar a la formación de ácido neoclorogénico y de una sustancia que hemos denominado "sustancia T 19-20".

3.- Por tratamiento alcalino suave el ácido neoclorogénico se transforma parcialmente en la "sustancia T 19-20", la cual pudo identificarse por partición en contracorriente y por cromatografía en papel.

No puede afirmarse en este momento si la "sustan-

cia tubos 19-20" que se encuentra por tratamiento de la Sustancia Tánica de Hauschild se produce directamente de la misma o pasando primero por el ácido neoclorogénico.

4.- La sustancia T 19-20 produce por hidrólisis ácido cafeico, pero no fué posible identificar ácido quínico. Se encontró que aparece una sustancia de interpretación difícil que es distinta al ácido quínico, pero que reacciona con el reactivo de meta-periodato, lo que indica la presencia de grupos alcohólicos vecinos.

RESUMEN.

Se trató de aclarar la estructura de una sustancia cristalina que fué aislada por primera vez de la yerba mate por Hauschild (1935) y posteriormente por Deulofeu, Fondovilla, Díaz, Mendive (1943).

El trabajo se encaminó primero hacia la identificación de la Sustancia Tánica de Hauschild por cromatografía en papel. Se encontró de esta manera que sus Rf no coincidían con los ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y cafeico.

Por hidrólisis energética en medio ácido la Sustancia Tánica de Hauschild produce los ácidos cafeico y quínico, los cuales se reconocieron por cromatografía en papel.

Se efectuó la determinación del equivalente de neutralización de la Sustancia Tánica de Hauschild y la curva obtenida demostró que no era un ácido carboxílico. Después de la hidrólisis alcalina suave, en cambio se pudo determinar un equivalente de neutralización 347, que coincide con el de una lactona del grupo de los ácidos clorogénicos. La Sustancia Tánica de Hauschild es por lo tanto una lactona que no es idéntica a la lactona del ácido isoclorogénico, descrita en la literatura.

- Para poder estudiar los productos de hidrólisis con álcalis diluidos se hicieron experiencias de distribución en contracorriente con los ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y cafeico que permitieron conocer sus máximos de distribución en condiciones experimentales bien normalizadas.

Aplicando la partición en contracorriente se pudo comprobar que por tratamiento alcalino suave de la Sustancia Tánica de Hauschild aparecen dos sustancias distintas. La primera de ellas resultó ser ácido neoclorogénico. La segunda no pudo obtenerse en cantidades suficientes como para estudiarla a fondo, pero pudo demostrarse que contenía ácido cafeico en su molécula. Provisoriamente se llamó a esta sustancia "sustancia tubos 19-20". Se encontró que la "sustancia T 19-20" es un producto vinculado con el ácido neoclorogénico porque también se lo obtiene al someter a este ácido al mismo tratamiento alcalino. Para su identificación, además de la distribución en contracorriente, se determinaron sus Rf por cromatografía en papel.

Por otra parte se realizaron experiencias para comprobar si la "sustancia T 19-20" ya existía como tal en las hojas de yerba mate. El estudio por cromatografía en papel de diferentes extractos reveló que contenían ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, ácido neoclorogénico y la "sustancia T 19-20". En ningún

caso se pudo encontrar la Sustancia Tánica de Hauschild en cantidades apreciables en alguno de los extractos estudiados.

Aplicando la técnica de Sondheimer (1958), con columna de Silicagel embebida en ácido sulfúrico 0,5 normal, se pudieron separar los ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y la "sustancia T 19-20" de extracto de yerba mate. Las identificaciones se hicieron por cromatografía en papel de cada una de las fracciones recogidas.

M. Badin

M. Badin

BIBLIOGRAFIA

- Albert, A., Biochem. J. 47, 531 (1958).
- Barnes., H.M., Feldman, J.R., White, W.V., J. Am. Chem. Soc. 72, 4178 (1950).
- Bulen, W.A., Varner, J.E., Burrell, R.C., Anal. Chem. 24, 187 (1952).
- Calzolari, C., Donda, A.F., AnnChim. 47, 1256 (1957).
- Cartwright, R.A., and Roberts, E.A.H., Chem. & Ind. 230 (1955).
- Clark, W.L., Mondy, N., Bedrosian, K., Ferrari, R.A., Michon, C.A., Food Technology 11.297 (1957).
- Clayton, M., Anal. Chem. 28.904 (1956).
- Craig, L.C. and Craig, D., "Extraction and Distribution" Vol. III de Technique of Organic Chemistry, Weissberger, Ed. Interscience, New York (1950) pág. 269.
- Corse, J.W., Nature 172.771 (1953).
- Dawson, R.F. and Wada, E., Tobacco 144.18 (1957).
- Deulofeu, V., Díaz, H., Fondovilla, M.E., Mendive, J.R., Anales A.Q.A. 31.99 (1943).
- Fischer, H.O.L., Dangschat, G., Ber. 65.1009 (1932); Ber. 65.1037 (1932).
- Fischer, H.O.L., Taabe, C., Ber. 60.485 (1927).
- Freudenberg, K., Ber. 53.232 (1920).
- Freudenberg, K., Ber. 52.177 (1920).
- García Paula, R.D., Boletín I.N.T. 4.3 (1953).
- García Paula, R.D., Revista de Química Industrial 22.72 (1953)
- González, C., San Martín, R., An. Real Acad. Farmac. 3.99 (1942).

- Gortler, K., A. 358, 327; 359, 217 (1908).
- Gortler, K., Ar. 247.184 (1909); 379.110 (1911).
- Hauschild, W., "Über die Bestandteile des Mates",
Diss., Zürich (1935).
- Hlasivetz, H., Liebigs Ann. 142.219 (1866).
- Hoepfner, W., Chem. Ztg. 56.991 (1932).
- Jermstad, J., Jensen, J., Pharm. Acta Helv. 25.209 (1950).
- Lentner, C., Deatherage, F.E., Chem. & Ind. 1331 (1958).
- Moore, R.G., Dermott, D.L., Wood, T.R., Anal. Chem. 20, 620
(1948).
- Nicholson, W.M., Rhind, D., Analyst 49.505 (1924).
- Nierenstein, M., "Tannins" en Allen's Commercial Organic
Analysis; Vol. V, Ed. Blackiston,
Philadelphia (1948).
- Panizzi, L., Scarpati, M.L., Gazzetta Chimica Italiana
84.792 (1954).
- Payen, F., A.Ch. 26.108 (1849).
- Roberts, E.A.H., Wood, D.J., Biochem. J. 49.414 (1951).
- Roberts, E.A.H., Chem. & Ind., 985 (1956).
- Rochleder, K., Hlasivetz, H., Ann. Chem. 66.39 (1848).
- Rudkin, G., Nelson, J.M., J. Am. Chem. Soc. 69.1470 (1947).
- Sondheimer, E., Arch. Biochem. & Biophys. 74.131 (1958).
- Uritani, I., Miyano, M., Nature 175.812 (1955).
- Watanabe, A., J. Pharm. Soc., Japan 56.71 (1936);
C.A. 31.2062.
- Weurman, C., Roif, C., Chem. & Ind. 72 (1958).
- Woodward, W.A., Cowland, A.N., Analyst 60.135 (1935).

I N D I C E

	Pág.
<u>Parte Teórica.</u>	
Introducción	1
Acido clorogénico	2
Acido isoclorogénico	16
Acido pseudoclorogénico	22
Acido neoclorogénico	24
Cinarina	27
Acidos clorogénicos encontrados en la yerba mate	29
Separación cromatográfica prepara- tiva de los ácidos clorogénicos.....	37
 <u>Parte Experimental.</u>	
Cromatografía de los ácidos clorogénicos..	40
Determinación del equivalente del ácido lactogénico	47
Los ácidos clorogénicos y sustancias relacionadas presentes en la yerba mate ..	49
Separación cromatográfica prepara- tiva de los ácidos clorogénicos	55
Distribución en contracorriente	61
Distribución del ácido clorogénico	63
Distribución del ácido neoclorogénico	65
Distribución del ácido isoclorogénico	69
Distribución de la materia tánica	72
Distribución del ácido cafeico	74
Acción de los álcalis débiles so- bre la S. T. H.	76

FOENIA

Pág.

Acción de los álcalis diluidos sobre el ácido neoclorogénico	82
Acción de los álcalis diluidos sobre el ácido clorogénico	89
Acción de los álcalis diluidos sobre el ácido isoclorogénico	91
Hidrólisis ácida de la sustancia tánica de Hauschild	93
Hidrólisis ácida de la "Sustancia tubos 19-20"	95
Espectro ultravioleta	100
Conclusión	102
Resumen	104
Bibliografía	107
Índice	109
