

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Química y Farmacia

Estudio comparativo de algunos procedimientos de
evaluación de cafeína en café, té y yerba mate.

Tesis presentada para optar al grado
de Doctor en Química por Oscar Osval
do Gatti.

1 9 4 7

Trabajo realizado en el Laboratorio
Enrique Herrero Ducloux de esta Fa-
cultad.-

13858

Padrino de Tesis

PROFESOR DOCTOR ALFREDO SANGUINETI

A mis padres.

A mis hermanos.

Señor Interventor

Señores Consejeros

Señores Profesores.

Presento a vuestra consideración este trabajo titulado "Estudio comparativo de algunos procedimientos de evaluación de cafeína en café, té y yerba mate", que he realizado en el Laboratorio Dr. Enrique Herrero Ducloux de esta Facultad bajo la vigilancia del Profesor Dr. Alfredo Sanguinetti, a fin de dar cumplimiento a las disposiciones reglamentarias vigentes, para optar al grado de Doctor en Química.

Agradezco íntimamente al Dr. Alfredo Sanguinetti, el honor que me ha conferido al apadrinarme en esta Tesis.

Quedo además muy reconocido a todos mis profesores y demás personal docente de esta Facultad por las enseñanzas que de ellos he recibido.

La Plata, Junio de 1947.

SUMARIO

- CAPITULO I) Introducción. Procedimientos más usuales consignados en la bibliografía, para la determinación cuantitativa de la cafeína en el café, té y yerba mate.
- CAPITULO II) Descripción y estudio analítico de los procedimientos de evaluación que hemos utilizado:
- a) En el café
 - b) En el té
 - c) En la yerba mate.
- CAPITULO III) Estudio analítico para la determinación del grado de pureza de la cafeína extraída.
- a) Procedimiento de Kjeldahl
 - b) Procedimiento colorimétrico.
- CAPITULO IV) Consideraciones generales y conclusiones.
- CAPITULO V) Bibliografía.
-

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

Procedimientos más importantes consignados por la bibliografía, para la evaluación de cafeína en café, té, y yerba mate.-

INTRODUCCION

La encuesta bibliográfica que hemos realizado en procura de conocer la totalidad de métodos y procedimientos ideados y propuestos para la valoración de la cafeína en alimentos nervinos -especialmente en el café, té, y yerba mate- pone de manifiesto, por una parte, el marcado interés demostrado por numerosos investigadores en el afán incesante y tesonero de mejorar paso a paso los anteriores o hallar nuevos, de manera de acercarse más y más a la máxima exactitud posible; y por otra, -después de una prolija comparación de los resultados obtenidos por los diferentes medios empleados -que no podría afirmarse a ciencia cierta si se habría logrado ese propósito.

En efecto -y llama poderosamente la atención del estudioso- que ningún investigador, si nos atenemos a la muy amplia bibliografía consultada, se haya preocupado por estudiar analíticamente la pureza de los residuos cafeínicos finales, después de la purificación más o menos completa indicada, y si lo hizo, de no publicar nada al respecto.

Todas fincan el grado de exactitud alcanzado en el mayor residuo obtenido, referido a 100 partes.

Un estudio integral de la cuestión expuesta -tomando en consideración todos los factores interferentes físicos y químicos, de todos los procedimientos ideados y aconsejados hasta el presente- tendría tal magnitud, exigiría un esfuerzo tan grande y prolongado, que sólo sería posible llevarlo a buen término con la colaboración de gran número de ayudantes; en verdad, factible solamente para un instituto de investigaciones. En estas razones se hallaría muy probablemente las causas de que tal cuestión no haya sido acometida hasta el presente.

Sin embargo, convencidos de que es posible alcanzar resultados muy útiles e importantes, de verdadero interés teórico-práctico, sin necesidad de recurrir a tan magna como impropia tarea, con sólo practicar el estudio analítico minucioso de todos los métodos y procedimientos de valoración que se practican corrientemente en la actualidad en los laboratorios correspondientes como también de aquellos que dentro de cada grupo hayan alcanzado de acuerdo a las conclusiones de su autor o investigadores que lo hayan practicado, una exactitud superior a los demás.

Y es precisamente este trabajo de estudio analítico de los procedimientos que la larga experiencia ha indicado como los mejores, que ofrecemos a la consideración benévola de los distinguidos profesores de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad Nacional de La Plata, deseoso así de ofrecer una modesta contribución a resolver la -cuestión, que hemos puesto de manifiesto, en su faz práctica, de verdadero interés indudablemente.

Los que se han ocupado largamente, con gran minuciosidad, del asunto, han podido establecer los numerosos factores que influyen en las

marchas analíticas practicadas, todos ellos causantes de la discordancia y disparidad anotadas en los resultados obtenidos; serían los principales: clase de álcali, disolventes y de reactivos de purificación, empleados; sin dejar de tenerla, a veces de verdadera importancia, la temperatura, el material de vidrio y detalles de técnica.

De una manera indirecta, el conocimiento del grado de pureza de los residuos cafeínicos, dará una idea general aproximada de la influencia de aquellos factores.

El estudio comparativo del porcentaje de cafeína pura obtenidos en los productos mencionados y por los procedimientos que vamos a ensayar nos permitirá indicar cuales son los mejores desde el punto de vista enunciado.-

Métodos y procedimientos consignados en la bibliografía general y especial para la valoración de la cafeína en café, té, y yerba mate.

El cuadro siguiente da una idea de conjunto, a la vez de la gran cantidad, de procedimientos propuestos y aconsejados sucesivamente para tal fin.

De acuerdo con la clasificación didáctica que el Prof. Dr. Alfredo Sanguinetti expone en sus clases de Química Analítica Aplicada, la totalidad de los métodos a que hacemos referencia pueden ser reunidos en dos grandes grupos principales, los que a su vez, comprenderían cada uno dos grupos secundarios.

En el primer grupo principal -denominado "Métodos Directos" se incluyen todos aquellos en los cuales la cafeína es extraída directamente por solventes apropiados. (CHCl_3 , C_6H_6 , etc.)

Comprende dos grupos secundarios, el primero en los que el solvente actúa directamente sobre la muestra -previamente pulverizada, tamizada y homogeneizada- sin una preparación previa y simplemente humedecida o adicionada de alcalinoscentes; y el segundo cuando el solvente actúa sobre un extracto acuoso preparado de antemano; haciendo o no uso de álcalis.

En el segundo grupo principal -"Métodos Indirectos"- se reúnen todos aquellos en los cuales se practica una eliminación previa -total o casi total- de las sustancias que acompañan a las cafeínas. Este resultado puede alcanzarse por dos vías distintas, lo que da origen a dos grupos secundarios: el 1º) cuando la eliminación se practica por defecación del extracto acuoso y 2º) por carbonización, operación, que, a su vez, puede practicarse:

a) por vía seca: por acción del calor.

b) por vía húmeda: por acción del H_2SO_4 .

Finalmente, cada grupo de los enunciados corresponde a otros sub-grupos, como puede observarse en el cuadro siguiente que resume una clasificación general de los mismos. (ver cuadro adjunto)

I) Procedimientos elegidos para la evaluación de cafeína en café.

1º) Procedimiento de Savini G. (1)

Directo, correspondiente al sub-grupo de extracción acuosa sin alcalinizar.

El autor manifiesta que con un testigo preparado conteniendo cantidades conocidas de cafeína y coloreado intensamente con caramelo se obtuvieron aplicando este procedimiento excelentes resultados.-

2º) Procedimiento de Fendler G. y Stuber W. (2)

Directo, del sub-grupo de extracción con solventes alcalinizando con NH_4OH .

Es la tentativa oficial norteamericana para café.

3º) Procedimiento de Power F.B. y Chesnut V.K. (3)

Directo, del sub-grupo de extracción con solventes sin alcalinizar.

Es el procedimiento oficial norteamericano para evaluar cafeína en café.

4º) Procedimiento de Scotti G. (4)

Directo, correspondiente al sub-grupo de extracción acuosa alcalinizando con CaO .

El autor asegura resultados analíticos satisfactorios.

5º) Procedimiento de Ugarte T. (5)

Indirecto, del sub-grupo por carbonización seca.

Según su autor es rápido y obtiene un elevado porcentaje de extracción.

6º) Procedimiento de Cortez F.F. (6)

Indirecto, del sub-grupo por carbonización húmeda.

Su autor asegura que presenta grandes ventajas sobre todos los usados hasta ahora y que se puede realizar en tan solo dos horas.-

II) Procedimientos elegidos para la evaluación de cafeína en té.

1º) Procedimiento de Andrew R.E. y Bailey E.M. (7)

Directo, del sub-grupo de extracción alcalinizando con MgO .

Es el procedimiento oficial norteamericano para la evaluación de cafeína en té.

2º) Procedimiento de Uglow W.A. y Schapiro A.M. (8)

Indirecto, del sub-grupo de extracción acuosa, alcalinizando con Na_2CO_3 y defecando con $CuSO_4$.

CUADRO SINTETICO DE LOS PRINCIPALES PROCEDIMIENTOS DE EVALUACION DE CAFEINA EN CAFE, TE y YERBA MATE

PROCEDIMIENTOS DE EVALUACION								
D I R E C T O S								
Extracción directa con solventes orgánicos								
Alcalinizando								
MH ₄ OH								
Sin alcalinizar	Lendrich y Nottbohm	1909	Caliente	CCl ₄ - H ₂ O (Soxhlet)	CHCl ₃ , parafina	MnO ₄ K 1% - H ₂ O ₂ 3%	Por pesada	Café y té
	Virchow	1911	frío	CHCl ₃ - H ₂ O	MgO parafina	-	Por pesada o Det.N.	Café tostado
	Power y Chesnut	1919	caliente	C ₂ H ₅ OH (Soxhlet)	CHCl ₃ - H ₂ SO ₄ - MgO	KOH 1%	Por pesada	Café y té
	Lukas	1924	frío	CHCl ₃ - H ₂ O	-	-	Determina N.	Café
						MnO ₄ K 1% - H ₂ O ₂ 3%	Det.refractométrica	Café
	Borgmann	1932	caliente	CCl ₄ - H ₂ O (Soxhlet)	-	MnO ₄ K 1% - H ₂ O ₂ 3%	Por pesada	Café
	Jesser	1933	caliente	CCl ₄ (Soxhlet)	NaOH ¹ /N - CuSO ₄ 20%	MnO ₄ K 2% - Na ₂ SO ₃ 10%	Determina N.	Café
	Keller	1897	frío	CHCl ₃	-	C ₂ H ₅ OH	Por pesada	Té
	Katz	1902	frío	CHCl ₃	Eter y HCl 5%	-	Por pesada	Café y té
	Keller-Siedler	1902	frío	CHCl ₃	-	H ₂ O caliente	Por pesada o Det.N.	Café
MH ₄ OH	Burmann	1911	frío	CHCl ₃	-	Sublimación	Por pesada	Café
	Fendler y Stuber	1914	frío	CHCl ₃	-	MnO ₄ K 1% - H ₂ O ₂ 3%	Por pesada	Café
	Phillippe	1916	frío	CHCl ₃	H ₂ SO ₄ - NH ₄ OH	Sublimación	Por pesada	Café y Té
	Grandval-Lajoux modificado	1916	frío	CHCl ₃	-	HCl 5% - eter - KOH 1%	Por pesada	Yerba mate
	Vautier	1918	caliente	Eter (Soxhlet)	-	Sublimación	Por pesada	Café
	Bonifazi	1927	caliente	CHCl ₃ (Soxhlet)	MgO	MnO ₄ K 1% - H ₂ O ₂ 3%	Por pesada	Café
						Sublimación		
	Gobert	1927	frío	Acetato de etilo	CHCl ₃	MnO ₄ K 1% - H ₂ O ₂ 3%	Por pesada o Det.N.	Café
	Gobert	1929	frío	Acetato de etilo	CHCl ₃	MnO ₄ K 1% - H ₂ O ₂ 3%	Por pesada	Té
	Fisher	1939	frío	CHCl ₃	Na ₂ SO ₄ - C ₂ H ₅ OH	Carbón	Por pesada	Té
MgO	Commaille	1895	frío	CHCl ₃	-	H ₂ O caliente	Por pesada	Café
	Dekker	1903	caliente	CHCl ₃ (Soxhlet)	-	-	Por pesada	Café
	Leger	1905	caliente	CHCl ₃	-	H ₂ O caliente	Por pesada	Café
	Bonn y Desgrez	1932	caliente	CHCl ₃	HCl 5% - Ac.Silico- tungstico	-	Incinerar y pesa	Café
CaO	Paul y Cownley	1908	caliente	C ₂ H ₅ OH (Soxhlet)	H ₂ SO ₄ - CHCl ₃	-	Por pesada	Café

PROCEDIMIENTOS DE EVALUACION

		Procedimientos	Año	Temperatura de la extracción	Solvente del extracto obtenido	Reactivos posteriores	Purificación	Forma de dosar	Para evaluar cafeína en:
DIRECTOS	Extracción acuosa	Tasilly	1904	Caliente	CHCl ₃ (Soxhlet)	H ₂ SO ₄ - MgO	-	Por pesada	Café
		Savini	1924	caliente	CHCl ₃	NH ₄ OH	MnO ₄ K 0.5%	Por pesada	Café
		Smith	1903	caliente	C ₂ H ₅ OH	CHCl ₃	-	Por pesada	Café
		Balland	1907	caliente	Eter	-	H ₂ O	Por pesada	Café
		Lab.de Connecticut	1921	caliente	CHCl ₃	H ₂ SO ₄ 10%	KOH 1%	Por pesada	Té
		Andrew y Bailey	1923	caliente	CHCl ₃	H ₂ SO ₄ 10%	KOH 1%	Determina N.	Té
		Scotti	1938	caliente	CCl ₄	(CH ₃ COO) ₃ Al	MnO ₄ K 10% - H ₂ O ₂	Por pesada	Café
		Georges	1896	caliente	CHCl ₃	-	-	Por pesada	Té
		Herlant	1904	frío	CHCl ₃	Na ₂ O ₃	-	Por pesada	Café
		Procedimientos	Año	Reactivos de defecación	Solvente del extracto obtenido	Reactivos posteriores	Purificación	Forma de dosar	Para evaluar cafeína en:
INDIRECTOS	Extracción acuosa en caliente	Hilger y Juckemack	1897	(CH ₃ COO) ₃ Al-Na ₂ CO ₃	CCl ₄ (Soxhlet)	Al(OH) ₃	-	Por pesada	Café
		Domergue y Nicolás	1909	(CH ₃ COO) ₂ Hg - 3%	C ₆ H ₆ y CHCl ₃ (Soxhlet)	MgO	-	Por pesada	Té
		Azadian	1922	(CH ₃ COO) ₂ Pb	-	HCl 5% - Ac.Silico-túngstico	-	Incinerar y Pesa	Café
		Kidd-Nanji-Edwards	1942	(CH ₃ COO) ₂ Zn FeK ₄ (CN) ₆ 10%	CHCl ₃	-	-	Por pesada	Café y té
		Delga	1944	(CH ₃ COO) ₂ Pb	CHCl ₃	MnO ₄ K	MnO ₄ K - H ₂ O ₂	Determina N.	Café
		Hasselmann y Lopes da Cruz	1945	(CH ₃ COO) ₂ HPb	CHCl ₃	Na ₂ SO ₄ - H ₂ SO ₄ 50%	MnO ₄ K - sucrosa	Por pesada	Yerba mate
		Uglow y Schapiro	1928	CuSO ₄	CHCl ₃	-	-	Por pesada	Té
		Procedimientos	Año	Temperatura de la extracción	Solvente del extracto obtenido	Reactivos posteriores	Purificación	Forma de dosar	Para evaluar cafeína en:
		Cortez	1934	Caliente	CHCl ₃	NaOH - conc.	-	Por pesada	Café, té, yerba mate, etc.
		Ugarte	1920	caliente	CHCl ₃	NH ₄ OH 1/N - H ₂ O	-	Por pesada	Café, té, yerba mate, etc.

Afirman sus autores que el procedimiento es simple y rápido y que el residuo final puede considerarse como cafeína 100%.

- 3º) Además aplicamos al té los procedimientos de Power y Chesnut; Ugarte; y Cortez, por las razones expuestas.

III) Procedimientos elegidos para la evaluación de cafeína en yerba mate.

- 1º) Procedimiento de Grandval-Lajoux modificado (9)

Directo, del sub-grupo de extracción con solventes orgánicos, alcalinizando con NH_4OH .

Es el procedimiento oficial adoptado por la Oficina Química Nacional de nuestro país, para la evaluación de cafeína en yerba mate.

- 2º) Procedimiento de Hasselmann J. y López da Cruz A. (10)

Indirecto, del sub-grupo de extracción acuosa en caliente; defecando con acetato básico de plomo.

Es un procedimiento moderno, sus autores afirman que controles realizados con cantidades conocidas de cafeína dan excelentes resultados.

- 3º) Además aplicamos a la yerba mate los procedimientos de Ugarte, y Cortez, por las razones ya expuestas.

Análisis

- a) Homogeneización, preparación y conservación de las muestras para análisis.

Un cuarto de kilogramo de la muestra se arroja sobre un papel satinado y seco y se la mezcla bien; en el caso de la yerba mate debe tenerse mayor cuidado tratando de que los palos se distribuyan homogéneamente.

Se toman luego cien gramos, se muelen finamente; es conveniente proceder a la molienda y tamizado hasta tanto las partículas pasen totalmente por un tamiz de 1 m.m; en caso de ser necesario por indicación expresa de algún procedimiento, se continuará moliendo y tamizando hasta llenar las condiciones del caso.

Luego se envasan las muestras en frascos de vidrio con tapa esmerilada, bien seco;

Sobre este polvo, ya sea de café, té o yerba mate, efectuamos las determinaciones cuantitativas de humedad y cafeína, que en cada caso se detallan.

Las muestras utilizadas son las siguientes:

Muestra de café.

Nº 1	Café de Puerto Rico	tostado
Nº 2	Café de Puerto Rico	verde
Nº 3	Café Caracolillo	tostado
Nº 4	Café Caracolillo	verde

Muestras de té.

Nº1 Té de la India negro.

Nº2 Té de la China negro.

Muestras de yerba mate.

Nº1 Yerba mate virgen paraguaya.

Nº2 Yerba mate de cultivo argentina.

En todos los casos, mediante la realización de análisis sumarios hemos podido comprobar la bondad de las muestras utilizadas.

b) Determinación de humedad (9b) (por pérdida de peso a 100°C)

Se pesa 2 grs. de la muestra preparada segun a) en un cristallizador tarado, se mantiene durante cuatro horas a 100°C en la estufa de agua, se deja enfriar en un desecador y se pesa rápidamente. La diferencia entre esta pesada y la anterior, multiplicada por 50 dará la humedad por ciento. (Método Oficial Argentino).

Para obtener resultados comparables dentro del convencionalismo de los métodos por desecación, es recomendable utilizar siempre cristallizadores de vidrio de características y dimensiones invariables

Por ello se aconseja el cristallizador de vidrio (del modelo oficial indicado para evaluar el extracto seco de los vinos) con fondo perfectamente plano y de estas medidas: diámetro 6,2 a 6,5 cm., altura 1,8 a 2,0 cm.; espesor de las paredes 1,0 a 1,5 mm.

-----00000000-----

Nota Preliminar

Expuesto ya con detalles, el plan de trabajo que hemos realizado y pasamos a exponer, corresponde consignar aquí, que H. Marangoni, en 1945, (68) ha efectuado un trabajo similar, en su aspecto fundamental al presente; pero si bien llega a algunas conclusiones interesantes, no responde ya, a nuestro juicio, a los conocimientos, resultados y exigencias analíticas del momento actual.

Dicho autor, en efecto, ha dado a su trabajo una extensión muy limitada, concretándose a comparar el procedimiento de Cortez con el de Stahl-Schmidt mejorado por Allen (69), procedimiento éste, escasamente citado, practicado y recomendado por los tratadistas modernos, habiendo sido ya reemplazado por otros más convenientes hace ya muchos años.

En consecuencia por las razones enunciadas hemos estimado indispensable, tratar la cuestión con una mayor amplitud, tomando en consideración la casi totalidad de los procedimientos aconsejados por los autores modernos y practicados en la mayor parte de los laboratorios en la actualidad, algunos de ellos ya oficiales en nuestro país, en E.E.U.U. etc; solo, así se podrá, por una comparación crítica, teórica y especialmente experimental, establecer sobre bases firmes conclusiones de carácter general, de que carece el trabajo arriba mencionado.-

-----00000000-----

C A P I T U L O I I

Descripción y estudio analítico de
los procedimientos de evaluación -
que hemos utilizado.

En café, té y yerba mate.-

Parte A) Estudio de los procedimientos de evaluación de cafeína en café

I) Procedimiento de Savini G. (1)

Para café y sustitutos del mismo.

Cinco gramos de polvo de café (10 a 20 de sustituto) se hierven 30 minutos con 100 ml. de agua; se filtra; la operación es repetida 3 veces con 50 ml. de agua y los líquidos filtrados reunidos se llevan a reacción alcalina con NH_4OH ; se agota luego durante 2 a 3 horas en un extractor con CHCl_3 . El extracto clorofórmico es evaporado a sequedad, y se termina calentando luego varios minutos a 100°C con corriente de aire; se hierve el residuo con 50 ml. de agua, se filtra por papel libre de materia grasa, lavando luego con agua fría; el filtrado se hierve con suficiente cantidad de MnO_4K al 0.5% para que de un color violeta permanente. La solución incluyendo el precipitado, se trata en un extractor como se hizo anteriormente, con CHCl_3 ; el extracto se evapora y el residuo es secado a 98°C durante 15 a 20 minutos; se pasa luego a un desecador y se pesa.

Comentario.

Se inicia este procedimiento con la preparación de un extracto acuoso el que es luego alcalinizado con hidróxido de amonio y utiliza como disolvente el CHCl_3 .

Para purificar el residuo obtenido, realiza igual que Lendrich y Nottbohm (11) un tratamiento oxidante a base de MnO_4K ; finalizando con una posterior extracción con CHCl_3 .

Es este un procedimiento relativamente largo de realizar y comienza con el inconveniente de las trepidaciones que se producen cuando se realizan las extracciones acuosas, proyectando con cierta violencia el material contra las paredes del vaso y el vidrio de reloj que lo cubre. Además el filtrado de ese extracto es muy lento: de todo lo cual resulta un procedimiento todo práctico. La continuación del procedimiento es normal no observándose otros inconvenientes prácticos.

Los porcentajes de cafeína hallados son bajos comparados con los obtenidos por el procedimiento de Cortez que es el que hemos adoptado para comparar los diversos procedimientos estudiados. Elegimos ahora y en lo sucesivo este procedimiento como base de comparación porque de nuestro trabajo resulta el que proporciona los mejores datos analíticos. El cuadro adjunto da una idea de lo antedicho.

Cuadro N° 1

Muestra de café	Humedad % Of. Arg.	Proced. de Savini cafeína extraída		Proced. de Cortez cafeína extraída
		% s/sust. húmeda	% s/sust. seca	% s/sust. seca
N°1 tostado	3.55	1.120	1.162	1.306
"2 verde	9.05	1.020	1.121	1.286
"3 tostado	4.09	0.970	1.011	1.262
"4 verde	9.54	0.900	0.995	1.260

II) Procedimiento de Fendler G. y Stuber W. (2)

Para café verde o tostado.

Después que el café verde o tostado fué pasado a través de un tamiz de malla de 1 m.m; 10 g. del polvo son colocados en un frasco de vidrio con tapón con 10 g. de solución de NH_4OH al 10% y 200 g. de CHCl_3 , agitando fuerte sin cesar durante media hora.

Se filtra el contenido del frasco sobre un papel plegado suficientemente grande como para contener todo el contenido del frasco; se cubre el embudo con un vidrio de reloj y el filtrado es evaporado en un matraz de boca ancha de 250 ml., sobre un baño de agua; las últimas trazas de CHCl_3 son eliminadas por ráfagas de aire.

El residuo es cubierto con 80 ml. de agua caliente y calentado sobre baño de agua hirviendo, agitando con frecuencia durante 10 minutos y luego se enfría; a esta solución se le agrega si se trata de café tostado 20 ml. y de café verde 10 ml. de solución de MnO_4K al 1%, haciendo luego una pausa de 15 minutos.

El exceso de MnO_4K es eliminado por adición de H_2O_2 al 3% conteniendo alrededor de 1% de ácido acético.

Se agrega primero 2 ml. de H_2O_2 ; si persigue rojizo se agregan otros ml. hasta que la solución no esté marcadamente coloreada. Cuando esto ocurre el frasco y su contenido se colocan en un baño de agua hirviendo y agregan porciones de 0.5 ml. de H_2O_2 hasta que no se produzcan nuevos cambios de color en la solución; esta es luego calentada 15 minutos sobre un baño de agua hirviendo, enfría y filtra sobre un papel de filtro húmedo de 9 cm. de diámetro.

El frasco y el filtro son lavados repetidas veces con agua fría; el líquido filtrado se lleva a volumen de 250 ml.; se toman 200 ml., se agitan con 50 ml. de CHCl_3 y luego tres veces sucesivas son porciones de 25 ml. del mismo solvente.

Las soluciones clorofórmicas reunidas son evaporadas en un matraz de 250 ml. de boca ancha, las últimas trazas de solvente son eliminadas con ráfagas de aire.

El residuo de cafeína es secado a 100°C , hasta constancia de peso.

Comentario.

Inicia este procedimiento la extracción con cloroformo en medio alcalino, usando para ese fin NH_4OH ; realiza luego la purificación del material extraído con MnO_4K en exceso, que elimina luego con H_2O_2 adicionada de ácido acético y finaliza extrayendo ese líquido con cloroformo, evaporando el solvente y llevando a peso constante en estufa de agua, el residuo de cafeína obtenido.

Es este un procedimiento cómodo y práctico que no ofrece inconvenientes en su realización; constituye además la tentativa oficial norteamericana para café.

Los pesos de cafeína por ciento obtenida de las diversas muestras van consignados en el cuadro siguientes:

Cuadro N° 2

Muestra de café	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Fendler y Stuber cafeína extraída		Proced.de Cortez cafeína extraída % s/sust. seca
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca	
N°1 tostado	3.55	1.060	1.099	1.306
" 2 verde	9.05	0.974	1.071	1.286
" 3 tostado	4.09	0.940	0.980	1.262
" 4 verde	9.54	0.852	0.942	1.260

III) Procedimiento de Power F.B. y Chesnut V.K. (3)

Para café y té.

Diez gramos de polvo fino de la muestra, previamente humecidos con una pequeña cantidad de alcohol son extraídos durante 8 horas en un aparato de Soxhlet con alcohol; el extracto alcohólico se coloca en una cápsula de porcelana y se evapora el disolvente. El residuo es luego cubierto con una suspensión de 10 g. de MgO en 100 ml. de agua; se evapora a sequedad sobre un baño de vapor de agua, removiendo con un pequeño movimiento; se transfiere luego a un papel de filtro con alrededor de 250 ml. de agua caliente y el filtrado extratado en un frasco Erlenmeyer con 10 ml. de H_2SO_4 al 10%; se hierve luego activamente por espacio de 30 minutos, se entibia y filtra a través de un doble papel de filtro humedecido, recogiendo en una ampolla de decantación y lavando con pequeñas y sucesivas porciones de H_2SO_4 al 0.5%; se agita 6 veces con 25 ml. de $CHCl_3$ cada vez, se reúnen los extractos clorofórmicos y agitan con 5 ml. de KOH al 1%, filtrando luego a través de un pequeño papel de filtro seco recogiendo en un Erlenmeyer; el líquido alcalino es lavado con dos porciones de 10 ml. de $CHCl_3$ las que son agregadas al Erlenmeyer. El cloroformo es evaporado y la cafeína transferida con una pequeña cantidad de $CHCl_3$ a un beaker tarado, se evapora luego el $CHCl_3$, se seca 30 minutos sobre un baño de agua hirviente, se pasa a un desecador y finalmente se pesa.

Comentario.

Es este el procedimiento oficial norteamericano para la evaluación de cafeína en café.

Realiza la extracción por medio del alcohol etílico en un aparato de Soxhlet, constituye esto gran ventaja pues agota el café usando poca cantidad desolvente; trata luego con MgO y posteriormente acidifica con H_2SO_4 llevando a ebullición; anteponiéndose a cualquier crítica por esta forma de conducir el proceso, sus autores dicen que no involucra ninguna pérdida el tratamiento con MgO y posterior ebullición con H_2SO_4 ; finaliza el procedimiento con sucesivas extracciones clorofórmicas y secando sobre baño de agua hirviente.

Constituye este trabajo un procedimiento sencillo pero un poco largo y que debe realizarse con mucho cuidado en algunos de sus pasos para no perder cafeína, tal como ocurre en el tratamiento con MgO , donde se lleva a seco y luego se extrae con agua, debiéndose antes pulverizar muy bien el residuo seco para que no se formen grumos y quede allí incluida la cafeína que luego se perdería.

Los datos cuantitativos se incluyen en el cuadro siguiente:

Cuadro Nº 3

Muestra de café	Humedad % Of. Arg.	Proced. de Power y Chesnut cafeína extraída		Proced. de Cortez cafeína extraída
		% s/sust. húmeda	% s/sust. seca	
Nº1 tostado	3.55	1.100	1.140	1.306
" 2 verde	9.05	1.010	1.111	1.286
" 3 tostado	4.09	1.040	1.084	1.262
" 4 verde	9.54	0.935	1.034	1.260

IV) Procedimiento de Scotti G. (4)

Para café.

Una mezcla de 4 g. de polvo de café y 2 g. de CaO se colocan en un vaso y se le agrega 40 ml. de agua, se hierve durante 15 minutos con la adición de 2 g. de acetato de aluminio, para formar una suspensión durante la ebullición.

El líquido se enfría, diluye a 100 ml. con agua destilada, agita y filtra. Una porción de 50 ml. es evaporada a alrededor de 10 ml. y tratada con 20 ml. de solución de MnO_4K al 10% (exceso).

Después de una hora el exceso de MnO_4K es descompuesto con H_2O_2 , llevado a 100 ml. y la suspensión es filtrada.

Se toman 50 ml. y evaporan a sequedad sobre un baño de vapor; el residuo se trata con 100 ml. de CCl_4 y filtrado a través de un filtro humedecido con CCl_4 . Luego se evapora el disolvente y el residuo es finalmente tomado con $CHCl_3$; se evapora el cloroformo, se seca y pesa.

Comentario.

Este procedimiento realiza una extracción acuosa alcalinizando con CaO y agregando acetato de aluminio para formar una suspensión.

Purifica con MnO_4K en exceso que descompone posteriormente agregando H_2O_2 .

Hace luego una extracción con CCl_4 , lleva a seco y finaliza tomando ese residuo con $CHCl_3$, evaporando nuevamente y pesando.

Adolece este procedimiento de varios inconvenientes: utiliza como alcalinizante el CaO que en general se lo considera perjudicial pues destruye la cafeína según el Dr. L.P. Palet (12); además en la fase inicial de

la extracción se producen fuertes trepidaciones que ensucian completamente el vaso y el vidrio de reloj que lo cubre.

Luego realiza una extracción con CCl_4 que no es precisamente el disolvente ideal para la cafeína; posteriormente lleva a seco y toma el residuo con CHCl_3 , evapora el disolvente, seca y pesa.

Los datos que se consignan en el cuadro N° 4 son aparentemente buenos; pero si se observan los cuadros de por ciento de pureza por valoración de nitrógeno y por colorimetría, se verá que ni siquiera las tres cuartas partes del peso del residuo final es cafeína.

Cuadro N° 4

Muestra de café	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Scotti cafeína extraída		Proced.de Cortez cafeína extraída
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca	% s/sust. seca
N°1 tostado	3.55	1.350	1.399	1.306
" 2 verde	9.05	1.200	1.319	1.286
" 3 tostado	4.09	1.281	1.336	1.262
" 4 verde	9.54	1.110	1.227	1.260

V) Procedimiento de Ugarte T. (5)

Para café, té, yerba mate, etc.

Se pesan 0.5 g. de sustancia finamente pulverizada. Se hace caer en un balón de Kjeldahl, seco, de 500 ml. de capacidad y de tal modo que caigan bien todas las porciones al fondo; si queda algo adherido al cuello del balón, se arrastra con un pincel.

Se calienta con una pequeña llama de 2-3 cm. de largo (gas o alcohol) y se mantiene así hasta la total carbonización de la sustancia, agitando si fuera necesario para que toda la masa quede de un color negro uniforme. Debe cuidarse que los vapores blanquecinos que se producen durante la operación no escapen, lo que se conseguirá retirando con tiempo el mechero.

Se enfría el balón, se le agregan 5 ml. de agua destilada, se hierve y moja toda la pared; luego se filtra y repite la operación tres veces más; el líquido en total no debe pasar de 20 ml. Los filtrados se recogen en un cristalizador de 7 cm. de diámetro, se lleva éste a un baño de agua hirviendo hasta sequedad; el residuo se disuelve en 2 ml. de agua destilada, se agregan 1 ó 2 gotas de NH_4OH $1/\text{N}$ y 5 ml. de CHCl_3 , se agita bien y la mezcla se pasa a un embudo con dos papeles de filtro impregnados con CHCl_3 . Se lava dos veces con 5 ml. de CHCl_3 por vez recogiendo en un vaso pequeño; se evapora a sequedad y al residuo se lo trata por 2 ml. de agua destilada, se mantiene a baño maría por 2 minutos y se filtra, recogiendo el filtrado en un vidrio de reloj tarado, se repite la operación dos veces más y el líquido de las tres filtraciones se evapora a baño maría. Se seca el residuo de cafeína en estufa a 100-105°C y se pesa.

Comentario.

Realiza este procedimiento la carbonización seca, vale decir por medio del calor; hace lugar una extracción acuosa del material carbonizado; se lleva luego ese líquido a sequedad, el residuo obtenido se disuelve en agua alcalinizada con amoníaco y se extrae con CHCl_3 ; se vuelve a llevar a seco y finaliza realizando una extracción acuosa de ese residuo; luego evapora, seca y pesa.

Este procedimiento no es sencillo de realizar; comienza con el inconveniente de la carbonización seca, la que debe cuidarse constantemente para que no escapen los vapores fuera del balón; para la realización de este paso y el subsiguiente, vale decir cuando se toma el residuo seco con agua amoniaca y CHCl_3 , debe poseerse una técnica especial de trabajo; son estos especialmente los motivos por los cuales el método no se hace recomendable.

Los datos cuantitativos se detallan en este cuadro.

Cuadro Nº 5

Muestra de café	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Ugarte cafeína extraída		Proced.de Cortez cafeína extraída
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca	
Nº1 tostado	3.55	1.230	1.275	1.306
Nº2 verde	9.05	1.110	1.220	1.286
Nº3 tostado	4.09	1.160	1.209	1.262
Nº4 verde	9.54	1.100	1.216	1.260

VI) Procedimiento de Cortez F.F. (6)

Para café, té, yerba mate, etc.

En un beaker de 200 ml. de capacidad se colocan 1 g. de café finamente pulverizado junto con 2 ml. de H_2SO_4 concentrado y se lleva a baño maría por espacio de 15 minutos, luego se agregan 50 ml. de agua destilada hirviendo, dejando reposar por espacio de 15-20 minutos en baño maría. Se filtra en caliente sobre filtro plegado, dentro de una ampolla de decantación, teniendo cuidado de lavar el vaso y el filtro repetidas veces con agua hirviendo acidulada con H_2SO_4 ; se enfría y alcaliniza con solución concentrada de NaOH , enfriar nuevamente la ampolla en una corriente de agua, se agrega enseguida 50 ml. de CHCl_3 , se agita y luego de decantado se filtra el CHCl_3 a través de un papel de filtro mojado con cloroformo; se recibe el filtrado en un beaker tarado y se repite la operación dos o tres veces más con 25 ml. de cloroformo por vez; se destila el cloroformo para recuperarlo, se seca el residuo en estufa, se coloca en un desecador con ácido sulfúrico y luego se pesa.

Realiza este procedimiento lo que en nuestro cuadro calificamos, "por carbonización húmeda"; practica esta operación por medio del H_2SO_4 concentrado, luego efectúa una dilución, filtra y alcaliniza con solución concentrada de NaOH, realizando luego la extracción de la cafeína por medio del cloroformo.

Inconvenientes prácticos, puede afirmarse que no existen mayormente; debe tenerse solamente cuidado en la operación del lavado del material carbonizado, rompiendo algunos grumos que se forman, pues de lo contrario en ellos quedaría encerrada cafeína que luego se perdería.

Es además el procedimiento más sencillo y rápido de todos los ensayados; dando los más altos porcentajes de cafeína extraída, tal como lo detalla el siguiente cuadro:

Cuadro N° 6

Muestra de café	Humedad % Of.Arg.	Procedimiento de Cortez Cafeína extraída	
		% s/sust.húmeda	% s/sust. seca
N° 1 tostado	3.55	1.260	1.306
" 2 verde	9.05	1.170	1.286
" 3 tostado	4.09	1.210	1.262
" 4 verde	9.54	1.140	1.260

Resultados analíticos cuantitativos generales, obtenidos mediante la aplicación de los procedimientos de evaluación de cafeína, en café.

Cuadro Nº 7

Procedimientos	Muestras	Tipos	Humedad % Of. Arg.	Cafeína extraída % s/sust.húmeda	Cafeína extraída % s/sust.seca
Savini	Nº 1	Tostado	3.55	1.120	1.162
Fendler y Stuber	"	"	"	1.060	1.099
Scotti	"	"	"	1.350	1.399
Power y Chesnut	"	"	"	1.100	1.140
Cortez	"	"	"	1.260	1.306
Ugarte	"	"	"	1.230	1.275
Savini	" 2	verde	9.05	1.020	1.121
Fendler y Stuber	"	"	"	0.974	1.071
Scotti	"	"	"	1.200	1.319
Power y Chesnut	"	"	"	1.010	1.111
Cortez	"	"	"	1.170	1.286
Ugarte	"	"	"	1.110	1.220
Savini	" 3	tostado	4.09	0.970	1.011
Fendler y Stuber	"	"	"	0.940	0.980
Scotti	"	"	"	1.281	1.336
Power y Chesnut	"	"	"	1.040	1.084
Cortez	"	"	"	1.210	1.262
Ugarte	"	"	"	1.160	1.209
Savini	" 4	verde	9.54	0.900	0.995
Fendler y Stuber	"	"	"	0.852	0.942
Scotti	"	"	"	1.110	1.227
Power y Chesnut	"	"	"	0.935	1.034
Cortez	"	"	"	1.140	1.260
Ugarte	"	"	"	1.100	1.216

Parte B) Estudio de los procedimientos de evaluación en té.

I) Procedimiento de Andrew R.E. y Bailey E.M. (7)

Para té.

Se muele té para que pase por un tamiz de $\frac{1}{25}$ de pulgada; a 5 g. de té molido en un frasco graduado de 500 ml. se le agregan 10 g. de MgO y 200 ml. de agua, hierve suavemente sobre una pequeña llama por espacio de dos horas, con un tubo de vidrio de 30 pulgadas de largo como condensador. Se enfría y diluye a 500 ml., filtra a través de un papel seco hasta 300 ml. dentro de un Erlenmeyer; agrega 10 ml. de H_2SO_4 al 10% y evapora por lenta ebullición a alrededor de 100 ml. Se filtra dentro de una ampolla de decantación, lava el frasco con pequeñas porciones de H_2SO_4 al 1% y extrae 6 veces con $CHCl_3$ usando 25-20-15-10-10 y 10 ml.

Se trata el extracto clorofórmico resultante con 5 ml. de solución de KOH al 1%; cuando los líquidos están completamente separados se saca el cloroformo; se lava luego la solución alcalina con porciones de 2 a 10 ml. de $CHCl_3$ en una ampolla de decantación y agregan los lavados al cloroformo de la extracción.

Se evapora o destila el $CHCl_3$ a pequeño volumen, transfiere a un beaker tarado, evapora luego a sequedad favoreciendo el secado en una estufa de agua a $100^\circ C$ hasta obtener constancia de peso.

Se pasa luego el residuo de cafeína a un frasco de digestión con sucesivas pequeñas porciones de H_2SO_4 concentrado y se determina el nitrógeno por el procedimiento de KJELDAHL.

La cafeína se calcula multiplicando el valor del nitrógeno obtenido por el factor 3.464.-

Comentario.

Este procedimiento es el oficial norteamericano para la evaluación de cafeína en el té, inicia la operación con una extracción acuosa alcalina, usando para tal fin el MgO ; una vez obtenido el extracto acuoso lo trata con H_2SO_4 al 10%, posteriormente extrae la cafeína por repetidas adiciones de $CHCl_3$; una vez obtenido el extracto clorofórmico evapora el disolvente y lleva el residuo a la estufa hasta peso constante y finaliza evaluando el nitrógeno por el procedimiento de Kjeldahl.

Este procedimiento no ofrece ningún inconveniente técnico en su realización, siendo a su vez rápido y cómodo; usa para alcalinizar el MgO , álcali débil al que no se le conocen inconvenientes ni por destruir la cafeína, ni por formar combinaciones con ella que hicieran posible una pérdida del alcaloide.

Los datos comparativos se adjuntan en el cuadro siguiente.

Cuadro Nº 8

Muestra de té-	Humedad % Of. Arg.	Proced. de Andrew y Bailey cafeína extraída		Proced. de Cortes cafeína extraída
		% s/sust. húmeda	% s/sust. seca	% s/sust. seca
Nº 1 negro	7.83	3.005	3.260	3.553
" 2 "	6.25	2.870	3.061	3.328

II) Procedimiento de Power F.B. y Chesnut V.K. (3)

Para café y té.

Este procedimiento ya ha sido detallado anteriormente.

Puede decirse por los datos que se consignan a continuación y los que se darán cuando se hable del valor absoluto del procedimiento, que si bien era recomendable para la evaluación de cafeína en café, no lo es para té puesto que existen procedimientos más exactos.

El cuadro siguiente da una idea de lo expuesto.

Cuadro Nº 9

Muestra de té	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Power y Chesnut cafeína extraída		Proced.de Cortez cafeína extraída
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca	
Nº 1 negro	7.83	2.933	3.182	3.553
" 2 "	6.25	2.716	2.897	3.328

III) Procedimiento de Uglow W.A. y Schapiro A.M. (8)

Para té.

Se hierven 10 g. de polvo de la muestra, en 400 ml. de solución de Na_2CO_3 al 4%, durante 30 minutos. Se enfría luego a 60-70°C y los taninos y albúminas naturales son precipitados por solución saturada de CuSO_4 , gradualmente agregada hasta que la solución esté ligeramente ácida.

El conjunto es disuelto a 500 ml., se agita durante 30 minutos y luego se deja reposar por espacio de otros 20 minutos; 300 ml. del líquido claro se pipetea y extraen 4 veces con porciones de 80 ml. de CHCl_3 .

El cloroformo es evaporado a temperatura no superior a 60°C, el residuo de cafeína es secado a 80-90°C y luego pesado.

Comentario.

Realiza este procedimiento una extracción acuosa alcalinizada por medio del Na_2CO_3 , purifica luego la solución precipitando taninos y albúminas por agregado de solución saturada de CuSO_4 y finaliza extrayendo una parte de este líquido claro, con CHCl_3 en sucesiva extracciones; posteriormente luego de haber evaporado el disolvente, se seca y pesa el residuo final de cafeína.

La extracción haciendo uso del Na_2CO_3 es criticada por F.C. van Eekhout (13) que dice que este álcali no es el más indicado y puede ser causa de pérdida de cafeína; en lo que respecta a la parte práctica el

procedimiento es cómodo y sencillo; obteniéndose un residuo de cafeína muy pura.

Los datos cuantitativos obtenidos se consignan en este cuadro.

Cuadro Nº 10

Muestra de té	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Uglow y Schapiro cafeína extraída		Proced.de Cortez cafeína extraída % s/sust.seca
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca	
Nº 1 negro	7.83	2.788	3.024	3.553
" 2 "	6.25	2.641	2.817	3.328

IV) Procedimiento de Ugarte T. (5)

Para café, té, yerba mate, etc.

Este procedimiento ha sido ya consignado con todos sus detalles anteriormente en la página 10.

Al igual que en aquella oportunidad diremos que el procedimiento requiere mano experta para alcanzar resultados satisfactorios; los datos obtenidos revelan que el procedimiento es analíticamente aceptable.

Cuadro Nº 11

Muestra de té	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Ugarte cafeína extraída		Proced.de Cortez cafeína extraída % s/sust.seca
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca	
Nº 1 negro	7.83	3.214	3.487	3.553
" 2 "	6.25	3.054	3.258	3.328

V) Procedimiento de Cortez F.F. (6)

Para café, té, yerba mate, etc.

Este procedimiento ya fué descrito en la página 11.

En tal oportunidad elogiamos este procedimiento por su sencillez, rapidez y alto porcentaje de extracción; en este caso ocurre lo mismo tal como lo demuestra el cuadro siguiente.

Cuadro Nº 12

Muestra de té	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Cortez cafeína extraída	
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca
Nº 1 negro	7.83	3.275	3.553
" 2 "	6.25	3.120	3.328

Resultados analíticos cuantitativos generales, obtenidos mediante la aplicación de los procedimientos de evaluación de cafeína, en té.

Cuadro N° 13

Procedimientos	Muestras	Tipos	Humedad % Of Arg	Cafeína extraída % s/sust. húmeda	Cafeína extraída % s/sust. seca
Andrew y Bailey	N° 1	negro	7.83	3.005	3.260
Power y Chesnut	" "	"	"	2.933	3.182
Ugnow y Schapiro	" "	"	"	2.788	3.024
Cortez	" "	"	"	3.275	3.553
Ugarte	" "	"	"	3.214	3.487
Andrew y Bailey	" 2	negro	6.25	2.870	3.061
Power y Chesnut	" "	"	"	2.716	2.897
Ugnow y Schapiro	" "	"	"	2.641	2.817
Cortez	" "	"	"	3.120	3.328
Ugarte	" "	"	"	3.054	3.258

Parte C) Estudio de los procedimientos de evaluación de cafeína en yerba mate.

I) Procedimiento de Grandval-Lajoux modificado (9)

Para yerba mate.

Se pesa 5 g. de la muestra y se coloca en un frasco de 250 ml. de boca ancha, con tapón esmerilado, se humedece con 5 ml. de amoníaco concentrado y se agregan 200 ml. de CHCl_3 puro anhidro. Se agita de tanto en tanto durante unas horas y se deja durante la noche. Se filtra y lava repetidas veces con CHCl_3 , recogiendo en un Erlenmeyer. Se destila el cloroformo en baño maría y se continúa calentando el residuo hasta la eliminación completa del disolvente.

El residuo se disuelve cuidadosamente en 5 ml. de eter etílico, se agregan luego 20 ml. de HCl al 5%, se agita bien y se desaloja el eter completamente, calentado y agitando suavemente, tratando que la materia resinosa verde que se separa, se reuna formando un pelotón adherido al fondo del vaso.

Se filtra recogiendo el líquido en un embudo de decantación y con el residuo del vaso se repite la operación, reuniendo el líquido resultante con el anterior. Se lava el vaso y el filtro con 10 ml. de HCl al 5% y luego con agua destilada, reuniendo todos los filtrados.

El líquido obtenido de las filtraciones se extrae cuatro veces con porciones de 10 ml. de CHCl_3 cada vez, reuniendo todas las porciones en un embudo de decantación.

El líquido clorofórmico se agita con 5 ml. de KOH al 1% para separar los últimos restos de resina.

Se pasa el CHCl_3 a un cristizador tarado, se lava el KOH con 5 ml. de CHCl_3 que se añaden al anterior, se evapora al baño maría el cloroformo, se seca en la estufa a 100°C durante no más de media hora y se pesa.

La proporción de cafeína se deberá referir a 100 g. de la muestra libre de humedad.

Comentario.

Este procedimiento realiza la extracción de la cafeína tratando la muestra con cloroformo en medio alcalino usando para tal fin el amoníaco; luego trata a ese material extraído con eter y ácido clorhídrico, evapora el primero y extrae nuevamente con CHCl_3 , obteniendo así la cafeína.

Este método es el empleado por la Oficina Química Nacional para realizar las evaluaciones de cafeína en yerba mate; no ofrece ningún inconveniente práctico, siendo los resultados analíticos satisfactorios.

En el estudio comparativo de procedimientos de evaluación de cafeína en yerba mate realizado por los Dres. Ducloux E. y Heredia E. (14) se observan análogas conclusiones.

En el cuadro adjunto se consignan los valores obtenidos.

Cuadro Nº 14

Muestra de yerba	Humedad % Of. Arg.	Proced. de Grandval Lajoux modif. cafeína extraída		Proced. de Cortez cafeína extraída
		% s/sust. húmeda	% s/sust. seca	% s/sust. seca
Nº virgen	3.26	0.967	0.999	1.126
" 2 cultivo	3.21	0.901	0.931	1.160

II) Procedimiento de Hasselmann J. y López da Cruz A. (10)

Para yerba mate.

La muestra es molida para que pase por una malla de 2 m.m. y que pueda ser retenida por la de 1 m.m.; 10 gramos se extraen en un beaker de 500ml. con 100 ml. de agua hirviendo, durante cinco minutos y el extracto es pasado por filtración a través de una muselina en un aparato para filtrar por succión.

La extracción y filtración se repiten por tres veces con 100 ml. y luego cuatro veces con 50 ml. cada ebullición con agua. Las últimas cuatro extracciones son concentradas a pequeño volumen y agregadas a las tres primeras. Esta solución es clarificada dentro de un frasco de 500 ml. con acetato básico de plomo y el exceso de plomo es precipitado con solución saturada de Na_2SO_4 .

Se lleva a volumen de 500 ml.; la solución es filtrada y las tres primeras porciones del filtrado son desechadas, 250 ml. del filtrado se

extraen 4 ó 5 veces con porciones de 50 ml. de CHCl_3 en un embudo de separación.

El solvente es luego eliminado por destilación. El residuo es secado por 15 minutos a 100°C y disuelto en 25 ml. de agua hirviendo, la solución es tratada con agua hirviendo dentro de un pequeño beaker. Luego se enfría a la temperatura ambiente y se agrega 10 ml. de MnO_4K al 2%, después de 20 minutos el exceso de MnO_4K es destruido por agregado de sucrosa y calentado 5 minutos sobre baño de agua hirviendo. Luego H_2SO_4 al 50% es agregado gota a gota hasta que prácticamente todo el MnO esté disuelto.

La solución es extraída en una ampolla de decantación 4 ó 5 veces con 25 ml. de CHCl_3 cada vez.

El extracto es destilado para eliminar el CHCl_3 y el residuo es secado a peso constante a 100°C . El CHCl_3 debe ser purificado antes de ser usado, por tratamiento con Na_2SO_3 en solución, siguiendo luego un lavado con agua.

Comentario.

Se practica aquí una extracción acuosa en fases sucesivas y se clarifica esta solución con acetato básico de plomo precipitándose el exceso con Na_2SO_4 ; se realiza luego una extracción clorofórmica de ese líquido, lleva a seco, disuelve en agua y purifica con MnO_4K al 2%, destruyéndose el exceso con sucrosa; se disuelve el MnO producido con H_2SO_4 al 50%, luego la solución se extrae con CHCl_3 repetidas veces, destila éste, seca el residuo a 100°C y pesa.

Este método es muy moderno pues se ha publicado en 1945; es largo de realizar y de técnica relativamente complicada, no dando además resultados muy satisfactorios tal como puede comprobarse en el cuadro siguiente.

Cuadro Nº 15

Muestra de yerba	Humedad % Of. Arg.	Proced. de Hasselmann y L. da C. cafeína extraída		Proced. de Cortez cafeína extraída
		% s/sust. húmeda	% s/sust. seca	
Nº1 virgen	3.26	0.929	0.960	1.226
" 2 cultivo	3.20	0.875	0.904	1.160

III) Procedimiento de Ugarte T. (5)

Para café, té, yerba mate, etc.

Este procedimiento ya ha sido aplicado para la evaluación de cafeína en el café y té, vale por lo tanto lo dicho en aquellas oportunidades también para la yerba mate.

Los datos analíticos van a continuación.

Cuadro Nº 16

Muestra de yerba	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Ugarte cafeína extraída		Proced.de Cortez cafeína extraída % s/sust.seca
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca	
nº1 virgen	3.26	1.055	1.090	1.226
" 2 cultivo	3.21	1.019	1.052	1.160

IV) Procedimiento de Cortez, F.F. (6)

Para café, té, yerba mate, etc.

Es este procedimiento también para yerba mate el que dá los mejores resultados analíticos cuantitativos, unidos siempre a la sencilla técnica de trabajo y rapidez, asegurando su autor que en su ejecución no se tarda mas que 2 horas.

Cuadro Nº 17

Muestra de yerba	Humedad % Of.Arg.	Proced.de Cortez cafeína extraída	
		% s/sust.húmeda	% s/sust.seca
nº1 virgen	3.26	1.186	1.226
" 2 cultivo	3.21	1.123	1.160

Resultados analíticos cuantitativos generales, obtenidos mediante la aplicación de los procedimientos de evaluación de cafeína en yerba mate.

Cuadro Nº 18

Procedimientos	Muestras	Tipos	Humedad % Of.Arg.	Cafeína extraída % s/sust.húmeda	Cafeína extraída % s/sust.seca
Grandval La- joux modif.	Nº 1	virgen	3.26	0.967	0.999
Hasselmann y L.da Cruz	" "	"	"	0.929	0.960
Cortez	" "	"	"	1.186	1.226
Ugarte	" "	"	"	1.055	1.090
Grandval La- joux modif.	" 2	cultivo	3.21	0.901	0.931
Hasselmann y L.da Cruz	" "	"	"	0.875	0.904
Cortez	" "	"	"	1.123	1.160
Ugarte	" "	"	"	1.019	1.052

Además de los procedimientos ya descriptos, la bibliografía cita como importantes a los siguientes:

Procedimiento de Lendrich K. y Nottbohm E. (11)

Para evaluación de cafeína en café.

Los autores proponen el siguiente procedimiento: 20 g. de café (pasados a través de un tamiz de malla de 1 m.m.) se humedecen con 10 ml. de agua, dejándose en reposo por espacio de 2 horas, removiendo ocasionalmente.

Transfiere luego a un cartucho de papel y extrae durante 3 horas con CCl_4 ; se agrega a la solución de CCl_4 cargada de extracto 1 g. de parafina, se destila el solvente y el residuo es tratado con agua caliente usando primero 50 ml. y luego 3 porciones de 25 ml. El extracto acuoso después de enfriado, es filtrado a través de un filtro húmedo; se trata luego el filtrado con 10 a 30 ml. de solución de MnO_4K al 1%. Después de 15 minutos el exceso de MnO_4K es eliminado precipitando al Mn como óxido hidratado, mediante una pequeña porción de H_2O_2 al 3% conteniendo 1% de ácido acético; se calienta 15 minutos sobre un baño de vapor, luego se filtra y evapora a sequedad. Se seca el residuo a 100°C , se extrae con CHCl_3 en caliente, se pasa a un beaker tarado, se evapora el cloroformo, seca luego el residuo media hora a 100°C y pesa la cafeína.

Experimentalmente los autores demuestran que el CCl_4 extrae menos impurezas que otros solventes; que el grado de humedad en el cartucho de extracción es el más favorable; que las 3 horas de extracción son suficientes para extraer toda la cafeína; que el tratamiento de la cafeína extraída con MnO_4K y H_2O_2 , no es causa de pérdida de la misma y que puede dar un producto final puro que por pesada directa da resultados solamente apenas superiores (0.02-0.12 %) a la de aquellos que determinan el nitrógeno y calculan la cafeína.

Solamente mínimas cantidades de sustancias nitrogenadas son extraídas por el primer tratamiento con CCl_4 ; y si la cafeína es calculada por el nitrógeno del residuo los resultados difieren en 0.10% de la en realidad obtenida. Los Dres. Garino y Guglielmelli (15) hallan en yerbas porcentajes bajos de cafeína por este procedimiento y más altos con otros, lo que dice de una pérdida de alcaloide. Se debe al empleo del CCl_4 que no se alcance a extraer, en las condiciones de la experiencia, todo el alcaloide contenido en la muestra.

Los mismos autores encuentran, después de la extracción con CCl_4 ; sobre el residuo que queda en el cilindro de extracción de Schleicher y Schüll, una buena porción de cafeína no disuelta por el disolvente. Es este el motivo que hace que este procedimiento no sea aplicable a yerbas.

Procedimiento de Burmann J. (16)

El autor construye un aparato que tiene la forma de un gran tubo de ensayo con dos estrangulamientos en forma anular; la sustancia se coloca en la parte inferior, que va sumergida en un baño de aceite a temperatura conveniente. Comenzada la sublimación, esta se sigue en la parte del tubo comprendida entre los dos estrangulamientos, en cristales incoloros o li-

geramente coloreados (en este caso basta lavar con un poco de eter de petróleo), quedando las demás impurezas en el fondo del tubo. Se disuelven luego los cristales en CHCl_3 , transvasar a un balón tarado, desalojar el solvente y pesar después de secar.

Se puede aún resublimar la cafeína, con lo que se obtienen soberbios cristales incoloros, capilares, delgados de punto de fusión 234°C .

El autor controla el método con soluciones de cafeína de título conocido a las que incorpora diversas impurezas.

Su manual operatorio es así: 5 g. de café, molido fino, es secado en estufa de agua o en vacío, a peso constante; la pérdida multiplicada por 20 da la humedad por ciento. El polvo se coloca en un Erlenmeyer de 100 ml. y se agita 10 minutos con 50 ml. de eter de petróleo (de punto de ebullición 60°C), decantar sobre filtro (conviene embudo de porcelana de 4 cm. de diámetro sobre Erlenmeyer de 150 ml.); agitar con 25 ml. de eter de petróleo, echar sobre el filtro y lavar con otros ml. de disolvente. El solvente, en vaso tarado de 250 ml. se evapora a baño maría hasta 100°C y pesa (peso constante). El peso, multiplicado por 20 da el tenor en materias grasas.

Una vez desangrasado el polvo se introduce en un frasco de 200ml. cerrado a esmeril; se agregan 150 g. de CHCl_3 y agita unos minutos; se agregan 5 ml. de solución de NH_4OH al 10%; se agita a menudo por espacio de media hora; filtra tapando el embudo con 2 hojas de papel de filtro humedecido en CHCl_3 ; se recibe en un Erlenmeyer tarado de 150 ml. y desaloja el disolvente a baño maría; seca a estufa y pesa. El peso multiplicado por 20 da el por ciento de cafeína bruta (coloreada en marrón).

Después, este residuo de cafeína bruta se disuelve en un poco de CHCl_3 y se introduce en el aparato del autor (15-18 m.m. de diámetro y 15-18 cm. de largo, estrangulado como ya se dijo). Se desaloja el CHCl_3 a baño maría y se seca a 100°C o al vacío; se coloca un tapón de amianto lavado sin apretar en el anillo inferior y se obtura la parte superior del aparato con algodón. Se sumerge el tubo más allá del primer estrangulamiento, en parafina líquida. Un termómetro sumergido en el baño, permite regular la temperatura. Poco a poco la cafeína sublima, y a las 3 horas la operación ha terminado. Un trazo de lima en el estrangulamiento inferior, da la cafeína pura en la otra parte del tubo, que se disuelve en cloroformo que se pasa a un Erlenmeyer tarado; evapora el solvente a baño maría, seca y pesa.

Este peso, multiplicado por 20 menos 2.5 mg. da el porcentaje de cafeína pura contenida en la muestra. (Se obtienen buenos resultados para análisis industriales). Una segunda sublimación da la cafeína absolutamente pura, fusible a 234°C .

Los Dres. Herrero Ducloux y Heredia (14) en su estudio crítico de los procedimientos de evaluación de cafeína, dicen refiriéndose a éste que es inaplicable a yerba mate, porque el producto que el autor considera cafeína bruta, es una masa compacta que contiene cera, resina, cloró-

fila y otras impurezas que hacen elevar el porcentaje a 5.604-5.846, cosa imposible. En el residuo impuro no va todo el alcaloide, pues sublimado uno que contenía 6.040 %, sólo se obtuvo como alcaloide un 0.420 %. Si a esto se agrega que el eter de petróleo empleado para arrastrar las materias grasas, disuelve a 18°C 0.0025 g. de cafeína, se comprende porque no es aceptado el método para yerba mate.-

Procedimiento de Virchow C. (17)

Se agitan 10 g. de polvo fino de café con 100 ml. de CHCl_3 ; se filtra, repetir la extracción 2 veces más y colocar los filtrados en un balón de destilación. Agregar un g. de parafina y destilar hasta recoger 200 ml. El resto del CHCl_3 debe destilarse muy despacio sobre una pequeña llama o sobre un baño de agua. Mientras el balón está aún caliente (70-80°C), se agrega 25 ml. de agua caliente; se debe luego calentar el balón hasta que la parafina esté bien fundida. Todo el contenido del balón se vierte dentro de un beaker de 150 ml. El beaker se coloca en un baño de agua, hasta que toda la parafina esté clara y fundida. Luego se enfría, filtra y lava con agua fría. El extracto acuoso se evapora en una cápsula tarada y se pesa como cafeína cruda.

Para purificar se agrega una pequeña cantidad de agua caliente y se remueve con una varilla de vidrio sobre baño de agua, hasta que esté bastante concentrado; se agrega luego una pequeña cantidad de MgO , se lleva a seco y se muele a polvo fino.

Transferir a un beaker y extraer por decantación 3 veces usando CHCl_3 ; filtrar, se destila luego el CHCl_3 y se pesa el residuo como cafeína pura. Se puede practicar además una determinación de nitrógeno en el residuo.

Este procedimiento da resultados concordantes con aquellos que extraen en aparatos de Soxhlet; los autores asignan a este procedimiento las ventajas siguientes: es rápido; da una extracción completa y un producto puro; siendo además la pérdida de cloroformo insignificante.-

Procedimiento de Adam F. (18)

Para evaluación de cafeína en café.

Diez gramos de polvo fino de café se agitan durante una hora en un frasco de 200 ml., con 200 g. de cloroformo y 10 g. de solución al 10% de NH_4OH . Se filtra dentro de un balón obteniéndose 150 g., procediéndose luego a destilar el solvente. El residuo se lava dentro del balón con 20 ml. de eter sulfúrico y 10 ml. de HCl al 0.5%, agregándose además 0.5 g. de parafina; calentar sobre un baño de vapor removiendo vigorosamente hasta que el eter sulfúrico haya sido completamente eliminado, estando en estas condiciones la parafina completamente fundida.

Se enfría y filtra a través de un papel de filtro humedecido con algunos ml. de ácido clorhídrico diluido. El filtrado es extraído con CHCl_3 por espacio de 3 horas en un extractor del tipo Katz; luego se evapora el CHCl_3 y se seca en la estufa de agua, obteniéndose así la cafeína pura.

Es este procedimiento una modificación del de Katz (19) y en vez de purificar como este, mezclando la cafeína cruda con $\text{Pb}(\text{OH})_2$ y MgO y realizando luego una reextracción; determina el nitrógeno por el procedimiento de Kjeldahl y la cafeína resulta multiplicando por $3/4$ y el factor 3.46.-

Procedimiento de Costés G. (20)

Para café.

Se tratan 5 g. de fino polvo de café (20 g. si la muestra es de café decafeinizado) con 20 ml. de H_2SO_4 concentrado en pequeñas porciones, agitando después de cada adición; calentar sobre un baño de agua 15-20 minutos y tratar con 3 porciones de (200-150-y 100 ml.) de agua hirviendo, continuando la ebullición 5-10 minutos luego de cada adición de agua. Se vierten las sucesivas porciones de extracto acuoso a través de un filtro plegado, dentro de una cápsula, conteniendo la cantidad necesaria de NaOH que sea requerida para neutralizar el ácido.

Concentrar el filtrado a 200 ml. y hacerlo alcalino con un pequeño exceso de Na_2CO_3 . Se extrae con 3 porciones de (50-35- y 30 ml.) de CHCl_3 y se evapora luego a sequedad el extracto clorofórmico obtenido. Para purificar el residuo de cafeína obtenido se procede de la manera siguiente: se calienta durante 10 minutos sobre un baño de agua hirviendo con 2 ml. de H_2SO_4 concentrado; diluir con una pequeña cantidad de agua, filtrar y lavar el filtrado 5 ó 6 veces con agua caliente. El filtrado es tratado con NH_4OH hasta hacerlo alcalino; extrayendo posteriormente con (25-20- y 15 ml.) de CHCl_3 . Se evapora el extracto en un beaker tarado, primero a 80°C y luego a 100°C ; secar media hora y luego pesar. El residuo contiene alrededor de 93% de cafeína pura, tal como lo demuestra la evaluación del nitrógeno.-

Procedimiento de Lukas J. (21)

Para evaluar cafeína en café.

El autor modifica el procedimiento de Lendrich-Nottbohm-Fendler, haciendo más simple la extracción.

Diez gramos de polvo fino de café se humedecen con 10 ml. de agua (álcali no es necesario usar), se agrega 200 g. de CHCl_3 y la mezcla se agita por espacio de 30 minutos; destila luego el CHCl_3 y lleva el residuo a sequedad.

Se determina el nitrógeno por el procedimiento de Kjeldahl y se calcula la cafeína multiplicando por el factor 3.464.-

La cafeína puede ser también determina refractométricamente como sigue: el residuo obtenido después de destilar el CHCl_3 y llevar a seco, es disuelto en 30 ml. de agua caliente; luego la solución es purificada por tratamiento con 20 ml. de solución MnO_4K al 1%, descomponiendo el exceso con H_2O_2 al 3%; o por absorción de las impurezas con carbón animal puro. Luego de purificada la solución es filtrada, se toman

100 ml. y con ellos se determina η . Calculándose después por medio de el contenido de cafeína.-

Procedimiento de Gobert S. (22)

Para café.

La siguiente técnica es recomendada: 5 g. de polvo de café se colocan en un tubo de vidrio de centrifuga y se adicionan de 5 ml. de NH_4OH concentrado, se deja estar agitando ocasionalmente durante 20 minutos para café tostado y 30 minutos para café verde; se extrae luego con 4 porciones de 25 ml. cada una de acetato de etilo, se agita durante 10 minutos y se centrifuga de 5 a 7 minutos por cada extracción.

Se agrega después 0.5 g. de parafina al extracto obtenido, destilar luego el acetato de etilo y secar el residuo 30 minutos a 100°C . Se trata el residuo con 3 porciones de 50 ml. cada una de agua hirviendo, se lleva el extracto acuoso a ebullición sobre una plancha de asbestos; enfriar luego lentamente, filtrar y adicionar solución de MnO_4K al 1% (20 ml. para café tostado y 10 ml. para café verde), se deja reposar 15 minutos y se descompone el exceso de MnO_4K por agregado de H_2O_2 al 3% conteniendo 1% de ácido acético, se reposa nuevamente por espacio de 15 minutos en el baño de agua caliente; se filtra y lava con agua hirviendo, se evapora el filtrado y seca 15 minutos a 100°C .

El residuo se toma con 3 porciones de 25 ml. cada una de CHCl_3 caliente; filtrar dentro de un pequeño Erlenmeyer tarado, lavar con 15 ml. de CHCl_3 ; destilar cuidadosamente el cloroformo, secar 30 minutos a 100°C y luego 6 horas en un desecador, pesando finalmente el residuo.

Se puede realizar una determinación de nitrógeno y multiplicar por 3.464, en vez de pesar la cafeína pura.-

Procedimiento de Bonifazi G. (23)

Para evaluar cafeína en cafés decafeinizados.

Según el autor los procedimientos de Lendrich-Nottbohm y Fendler y Stuber dan valores satisfactorios de cafeína con cafés comunes; pero la cafeína obtenida por esos procedimientos no es pura y resultan serios errores cuando el contenido de cafeína es muy bajo; el procedimiento de Vautier (24) elimina esas dificultades.

El siguiente procedimiento adopta las mejoras sugeridas por Vautier a los otros procedimientos y es capaz de dar resultados muy buenos. Cuando el contenido de cafeína es sólo 0.0011 g. en 5 g. de muestra; se agregan 0.050 g. de cafeína pura y luego se recogen 0.0519 g. de cafeína sublimada que es sólo superior en 0.8 mg.

El procedimiento es así: se introducen 25 g. de fino polvo de café dentro de un dedal, se agregan 5 ml. de NH_4OH al 5% y se extrae por espacio de 3 a 4 horas con cloroformo o eter en un aparato de Soxhlet. Destilar el solvente, tomar el residuo con 80 ml. de agua fría y hervir 5 minutos. Después se agrega 1 g. de MgO suspendido en una pequeña cantidad de agua y se hierve 5 minutos más. Filtrar a través de un filtro ple-

gado y húmedo, lavar 4 ó 5 veces con 20-25 ml. de agua hirviendo, evaporar luego a sequedad y calentar en una estufa de agua una hora a 100°C . Se trata el residuo con 10 ml. de agua hirviendo, si este no es enteramente soluble, se filtra, lava y nuevamente se evapora a sequedad. Se toma ahora el residuo con alrededor de 50 ml. de agua y se agregan 5 ml. de solución de MnO_4K al 1%. Agitar 15 minutos y luego decolorar con H_2O_2 al 3% que contiene 1% de ácido acético. Se filtra si es necesario; evaporar a sequedad y calentar durante una hora a 100°C en estufa. Se extrae el residuo 4-5 veces con cloroformo hirviendo frotando bien con una varilla y se filtra a través de un pequeño filtro.

Evaporar el cloroformo y luego sublimar la cafeína de acuerdo a las directivas de Vautier. Se seca el sublimado una hora a 100°C y después se pesa.

Los resultados indican que un buen café decafeinizado contiene alrededor de 42 mg. de cafeína por 100 g. de café.

Procedimiento de Hilger y Juckenack (25)

Para café.

Veinte gramos de café molido fino, en vaso de precipitado grande se adicionan de 900 ml. de agua y se dejan a temperatura ambiente unas horas. Hervir (reponiendo el agua) 3 horas (para café tostado $1\frac{1}{2}$ hora) y dejar enfriar a $60-80^{\circ}\text{C}$. Agregar 75 g. de acetato de aluminio y 1.9 g. de NaHCO_3 a pequeñas dosis y agitando. Hervir 5 minutos, dejar enfriar; completar con agua a 1.020 ml. y filtrar.

750ml. de filtrado claro que corresponden a 15 g. de muestra se adicionan de 10 g. de $\text{Al}(\text{OH})_3$ precipitado y pulverizado más una papilla de papel de filtro con agua. Evaporar en baño maría agitando de vez en vez. El residuo se seca en estufa a 100°C . Luego se extrae en Soxhlet 8-10 horas con CCl_4 ; se destila el solvente y el residuo se seca a 100°C , dando la cafeína.

Algunas veces los valores obtenidos con este procedimiento son variables, y se debe purificar el residuo. Para tener exactamente el dato de cafeína del residuo se determina el nitrógeno por el método de Kjeldahl y de la cantidad de nitrógeno se deduce la cafeína deshidratada (1 ml. de $\text{H}_2\text{SO}_4^{\text{N}}/10 \equiv 0.00485$ g. de cafeína anhidra).

Este procedimiento fué considerado durante muchos años como el más exacto y fué aceptado también en los convenios. Pero parece que, según las observaciones de Gadamer y Wantig, Lendrich y Murfield (26) la cafeína no se extrae por completo de la papilla de papel y los resultados son, por consiguiente, demasiado bajos. Por la misma razón estima Hefelmann (27) que es necesario pulverizar el residuo de extracción, con MgO y extraer de nuevo.

Otros autores para evitar pérdidas, parten de la ebullición acuosa, sin secar, tratándola con CHCl_3 (Foster y Riechelmann (28), L.Graf (29), Tatlock y Thomson (30), G.Costés (20)). Wolff (31), recomienda, según propuesta de Trillich y Göckel (32) extraer con eter acético después de ha-

cer actuar el acetato de plomo básico y el MgO .

Después determina el nitrógeno por el procedimiento de Kjeldahl.

Pero para café tostado se tiene un dato mayor de cafeína porque se produce con esta operación bases como la piridina, que también son solubles en eter acético.

Estos últimos autores modifican también el procedimiento de Socolof para café, operando como en la modificación anterior con eter acético sobre café seco y extraen por segunda vez el residuo hervido con una lechada de MgO . Es más exacto pero necesita calcular la cafeína mediante la evaluación del nitrógeno por el procedimiento de Kjeldahl.

El procedimiento, dadas las anteriores consideraciones, es deshechado para la evaluación de la cafeína en el café.-

Procedimiento de Hilger y Juckenack; modificado por Lendrich y Murfield (33).

Operando de acuerdo al procedimiento de Hilger y Juckenack se obtiene un producto preferiblemente blanco y privado de sustancias minerales, pero no se puede decir que sea puro.

Para controlar la pureza de esta sustancia extraída, después de pesada, se disuelve en 100 ml. de agua a $17.5^{\circ}C$ y se examina en el refractómetro a inmersión de Zeiss. Del valor de la refracción leída se tiene la cantidad de cafeína con la fórmula siguiente:

$$X = \frac{Y - 15}{5}$$

Donde Y es el valor de la refracción leída; 15 es el mismo valor para el agua destilada (34).-

Procedimiento de Commaille (35)

Cinco gramos de polvo de café, se adicionan de un g. de MgO y un poco de agua; la pasta se vuelve amarilla y luego verde; se deja en contacto 24 horas. Se agita 3 veces con 100-150 g. de $CHCl_3$ hirviendo. Se destila el $CHCl_3$ y el residuo se toma por agua hirviendo; se pasa por filtro mojado para separar las materias grasas, se evapora a sequedad la solución filtrada, en cápsula tarada, se seca al vacío y se pesa.-

Procedimiento de Paul y Cownley (36)

Se pulveriza finamente 10 g. de café, se agregan 5 g. de CaO recién extinguida y 30 ml. de agua. Se deja en contacto unas horas y se evapora a baño maría a sequedad.

Se pulveriza el residuo seco y se agota con alcohol en un Soxhlet. Se evapora la solución alcohólica y se disuelve el residuo en agua acidulada con H_2SO_4 ; filtrar y agotar la solución acuosa varias veces con $CHCl_3$. Luego evaporar las soluciones clorofórmicas; secar y pesar el residuo de cafeína. El tenor de cafeína varía para cafés entre

0.60 y 2.17 %, esto sólo ya habla de la inexactitud del procedimiento.-

Procedimiento de Balland (37)

Para café verde o tostado.

Trata la muestra por agua caliente en presencia de MgO ; filtra y recomienza el tratamiento al agua hirviendo hasta llegar a agotar. Evapora a sequedad los licores en presencia de papel de filtro y el residuo así obtenido se agota con eter. Después de desecar; se pesa.

El mismo autor dice que la cifra así obtenida es muy elevada a causa de la extracción de una cierta proporción de materia grasa. Entonces hecha agua destilada en el cristizador y deja en contacto 12 horas. Decanta y seca de nuevo, pesando las materias que se han quedado adheridas al vaso. La diferencia entre las dos pesadas es el dato de cafeína.

Los Dres. Herrero Ducloux y Heredia ya mencionados en (14) lo deshechan para yerba mate, y por el disolvente empleado lo es también para el café; el residuo que se obtenía era de color negro y muy impuro.

En resumen, es un procedimiento largo, inseguro y dudoso.-

Procedimiento de Domergue y Nicolás (38)

En un decreto del Estado francés, del 6 de octubre de 1900, relativo a la admisión temporaria de tes destinados a la fabricación de cafeína, se prescribía el procedimiento de Domergue y Nicolás, para la determinación del tenor en este alcaloide.

Cinco gramos de sustancia pulverizada groseramente se adicionan de 60 ml. de agua destilada y se hierven. Luego se agregan 100 ml. de una solución de acetato de mercurio al 3%, se hierve unos instantes y filtra por papel mojado, agotando con agua hirviendo hasta que las aguas de lavado pasen incoloras.

El filtrado recogido (unos 300 ml.) se evapora a baño maría hasta reducción a unos 20 ml. y se agrega 2 g. de MgO y 15 g. de vidrio molido o arena cuarzosa lavada y calcinada.

Se deseca completamente la mezcla a baño maría. El residuo anterior se agota en un Soxhlet con mezcla de pesos iguales de C_6H_6 y $CHCl_3$, evaporando la solución, quedará la cafeína impura debido a que contendrá una pequeña cantidad de materia cerea.

El disolvente empleado tampoco es el apropiado.-

Procedimiento de Smith E.D. (39)

Se mezclan 0.65 g. de café pulverizado con 0.13 g. de MgO , se hierve 5 minutos con agua y se filtra. El residuo se hierve otros 5 minutos con 300 ml. de agua y vuelve a filtrar. Reune los filtrados y concentra hasta 20 ml. El resto, tratado con 120 ml. de alcohol se filtra, lava con alcohol y evapora este disolvente.

El residuo anterior se disuelve agregando poco a poco pequeñas cantidades de agua. Las soluciones se llevan a una ampolla de separación y se agitan con 25 ml. de $CHCl_3$, 3 veces, luego evapora el disolvente, seca a $100^{\circ}C$ y pesa.-

Procedimiento de Katz (19)

Diez gramos de polvo de café se agitan con 200 g. de CHCl_3 y 10 ml. de NH_4OH al 10%, durante 30 minutos. Se deja reposar, filtrar, obteniéndose 150 g. de líquido claro y sin agua. Destilar el CHCl_3 . Luego disolver el residuo en 6 ml. de eter (si es necesario, calentar con refrigerante de reflujo), más de 10 ml. de HCl al 0.5%. (Si se usa café entero, agregar aún 0.2-0.5 g. de parafina sólida).

Evaporar el eter y filtrar el líquido acuoso. El matraz y filtro se lavan repetidas veces con pequeñas porciones de HCl al 0.5%. Las soluciones acuosa clorhídricas se pasan a un embudo de separación y se agitan 4 veces con 20 g. de CHCl_3 por vez. Se destila el CHCl_3 deseca y pesa la cafeína.

El autor dice que en el caso de café, té, guaraná y kola se obtiene un producto tan puro (cafeína) que se puede secar a 100°C y pesar.

Aplicándose el procedimiento a yerba mate, consigna una modificación: antes de disolver el residuo en eter, agrega una lechada de hidróxido de plomo y luego MgO ; filtra y agota el filtrado con CHCl_3 y sigue con CHCl_3 extrayendo 4 veces con 20 g., etc. igual hasta el final. Pero obtiene datos bajos.

Este procedimiento está basado en proposiciones anteriores de Keller (40); Siedler (41); Beitter (42) que fueron encontradas oportunas por varios autores, entre ellos Gadamer (43), para la evaluación de cafeína en café, té, etc.

Ha sido comprobado y reconocido como exacto por Buttenberg y Wantig (44), aunque este último prefiere el CCl_4 al CHCl_3 .

Según Hartwich y Du Pasquier (45), al calentar a $97-99^\circ\text{C}$ tiene lugar una continua pérdida de cafeína, por lo cual prescriben secar en desecador con H_2SO_4 .

Reinsch (46) recomienda el mismo procedimiento, con la condición de que se determine el contenido de nitrógeno del producto considerado cafeína. Sobre la misma base reposa el procedimiento de C. Virchow (17), como también el antiguo de Grandval-Lajoux (47).

J. Burmann (16) quita previamente la grasa del café, con eter de petróleo y extrae luego la cafeína con CHCl_3 y NH_4OH .

De cualquier manera, en la práctica se tendrían buenos resultados con determinadas modificaciones.-

Procedimiento de Keller C. (40)

Es aplicado a los tes y se fundamenta en la extracción con CHCl_3 , de 3 a 6 horas en presencia de NH_4OH , por agitación; se filtra y destila a baño maría; el residuo se purifica por alcohol que separa la clorófila, pesándose luego la cafeína.

La cafeína obtenida por este procedimiento contiene casi - siempre pequeñas cantidades de esencia, grasa vegetal y principalmente clorófila; por lo tanto se debe purificar el residuo con agua y alcohol.

Las ventajas del procedimiento se refieren al té; las hojas se hinchan por acción del NH_4OH , el tanino se combina con este reactivo y libera la cafeína que a él se unía y la cede al CHCl_3 . Según la calidad del té el color de la solución extraída va del verde amarillento al parduzco, según la calidad del producto.

Keller deduce de sus observaciones en tes que las clases que se venden en el comercio como mejores y más caras se pagan, contienen más cafeínas.-

Procedimiento de Keller-Siedler (48)

Desengrasa el café con un poco de eter de petróleo y humedece con NH_4OH como el anterior; luego trata con CHCl_3 , agita y destila el disolvente; lo depura con agua caliente y pesa la cafeína.

Sin embargo el producto obtenido es muy impuro (llámase cafeína bruta) y debe procederse a un dosaje de nitrógeno en el mismo, para calcular la cafeína verdadera que él contiene.-

Procedimiento de Herlant (49)

Basado en la solubilidad de la cafeína en el benzoato de sodio. Consiste en mezclar un peso contenido de café pulverizado con 1-10 de su peso de CaO apagada, agotando con solución al 5% de benzoato de sodio. La solución de benzoato doble de sodio y cafeína se alcaliniza con Na_2CO_3 y filtra. Se agita con CHCl_3 , que luego se evapora y se tiene la cafeína cristalizada en agujas blancas y sedosas.-

Procedimiento de Tassilly (50)

Es generalmente usado para extractos de café.

El procedimiento se divide en dos partes: en la primera se realiza la preparación de un extracto acuoso, fraccionando el agua y llevando a sequedad, retomando, etc. Hasta que una gota del líquido no enturbie con una gota de solución concentrada de tanino. Interviene también el H_2SO_4 .

En la segunda parte se agrega arena calcinada y lavada y MgO mezclando bien; luego se lleva a un aparato de agotamiento continuo con 100 ml. de cloroformo, durante 3-4 horas.

Se destila el disolvente casi completamente y se coloca en un vaso tarado, dejando que se evapore totalmente al aire libre. Después se pesa.

El autor da otro procedimiento a partir de la preparación del extracto después del contacto con H_2SO_4 : alcalinizar con NH_4OH y agotar en frío con CHCl_3 en una ampolla de decantación (para evitar emulsiones se recomienda llenar la bola), 3-4 veces con 125 ml. de disolvente; la

solución clorofórmica se trata como en la primera parte.

Aconseja el autor, además, tomar la mitad del extracto acuoso preparado y seguir los dos caminos, para poseer así un control.-

Procedimiento de Phillippe E. (51)

Colocar en una ampolla de decantación de 500 ml. de capacidad 10 ml. de NH_4OH , agregar 5 g. de café finamente pulverizado y dejar por varios minutos que el polvo se humedezca por completo. Luego se afita con 50 ml. de CHCl_3 durante 3 minutos (4 veces). Se filtra cada vez sobre un pequeño filtro a pliegues dentro de un frasco cónico; los filtrados se destilan a baño maría.

Sobre el residuo se agregan 120 ml. de agua destilada y 20 ml. de H_2SO_4 ^N/10 y se calienta a fuego libre hasta ebullición. Después de frío se quitan las impurezas de la cafeína, agitando el líquido con eter en una ampolla de decantación. La solución con cafeína y H_2SO_4 se alcaliniza con NH_4OH hasta franca reacción y se agita de nuevo 4 veces con CHCl_3 para extraer la cafeína.

Se filtra, se destila a pequeño volumen y se sublima sirviéndose de un aparato especial, que consta sencillamente de un cristizador sobre el que va apoyado un vidrio de reloj con la cara cóncava vuelta hacia abajo y en la parte convexa va adoptado un refrigerante cilíndrico. El aparato se coloca para la sublimación sobre un baño de arena, calentándose con un pico de corona de tiro vertical. Terminada la sublimación se seca el vidrio de reloj con la cafeína adherida, durante 30 minutos en un desecador y se pesa; Luego se lava el vidrio de reloj con CHCl_3 , se seca y pesa; la diferencia de peso entre las dos pesadas da la cafeína.-

Procedimiento de Vautier E. (24)

Cinco gramos de café finamente pulverizados se ponen en un cartucho de Schleicher y Schüll, el que va luego dentro de un aparato de Soxhlet; se agrega 5 ml. de NH_4OH ; eter y se extrae durante 4 horas.

El eter cargado de amoníaco y extracto se destila a baño maría obteniéndose un residuo de cafeína y grasa; se trata con agua hirviendo, filtrando directamente en una cápsula plana a través de un filtro plegado y mojado; lavar con agua bien caliente hasta tener 100-150 ml. y evaporar luego a sequedad. Se toma el con 30-50 ml. de agua hirviendo y se filtra sobre un papel de filtro, dentro de una cápsula de vidrio, evaporar a sequedad; cubrir la capsula con un vidrio de reloj y sublimar la cafeína, se seca en un desecador y finalmente se pesa.-

Procedimiento de Gobert S. (52)

El procedimiento previamente descripto para la evaluación de cafeína en café, puede ser adaptado para la evaluación en té tal como sigue: se colocan 3 g. de fino polvo de té en un tubo de vidrio de centrifuga, se agregan 4 ml. de solución de NH_4OH de 22° Bé ; se deja estar 30 minutos agitando ocasionalmente. Extraer con 4 porciones de 25 ml.

cada una de acetato de etilo, agitar 10 minutos cada vez, centrifugar 3-7- minutos, decantar y destilar cuidadosamente el solvente, secar el residuo durante 30 minutos a 100°C . El residuo se trata 2 veces con 50 ml. y una vez más con 25 ml. de agua hirviendo, poniendo cada extracción a reposar sobre un baño de agua caliente por varios minutos; enfría la solución acuosa y agregar 15 ml. de solución al 1% de MnO_4K , se deja estar 15 minutos y se descompone el exceso de MnO_4K con H_2O_2 que contiene 1% de ácido acético, se deja reposar otros 15 minutos sobre el baño de agua hirviendo y luego se filtra, lava y evapora el filtrado a sequedad calentando 15 minutos a 100°C . Se trata el residuo con 3 porciones de 25 ml. cada una de cloroforme caliente; filtrar dentro de un Erlenmeyer tarado, evaporar cuidadosamente el solvente, secar 30 minutos a 100°C y 6 horas en un desecador y finalmente pesar la cafeína extraída.-

Procedimiento de Bonn A. y Desgrez Ch. (53)

Este procedimiento se aplica para evaluar cafeína, en extractos de café y orina.

Se evaporan 75 a 100 ml. del líquido sobre un baño de agua hirviendo, hasta que quede solamente húmedo; se mezcla el residuo con 15 g. de MgO recién incinerado, después de una hora de contacto en frío se transfiere a un frasco seco, se agregan 125 ml. de CHCl_3 anhidro y se calienta a reflujo durante 45 minutos. Luego se enfría, filtra y destila el CHCl_3 a sequedad; se toma con una pequeña cantidad de cloroforme y se transfiere a un beaker evaporando el disolvente. Se trata el residuo con 10 ml. de HCl al 5% y se agrega exceso de solución de ácido silicotúngstico (alrededor de 25 a 30 gotas por 0.01 g. de cafeína), calentar hasta que el precipitado esté completamente disuelto, dejando estar por 24 horas. Luego se filtra y lava con HCl al 5%, se incinera y pesa; el peso multiplicado por 0.2236 nos da el valor de la cafeína hidratada. Con 0.01-0.02 g. de cafeína la recuperación fué de 97.2 al 102% de lo calculado teóricamente.-

Procedimiento de Borgmann K. (54)

Para la evaluación de cafeína en cafés decafeinizados.

Se mezcla 20 g. de la muestra con arena, se humedece con agua y se extrae con CCl_4 en un aparato de Soxhlet. Se evapora el disolvente a sequedad y después se agrega 1 g. de parafina sólida, se trata luego el residuo con 125 ml. de agua caliente en pequeñas porciones; se filtra y enfría. A la solución resultante se la trata con 30 ml. de MnO_4K al 1% y luego de 15 minutos se descompone el exceso de MnO_4K por agregado de H_2O_2 al 3% conteniendo 1% de ácido acético; calentar la solución por espacio de 15 minutos sobre baño de agua hirviendo, se filtra y evapora a sequedad. El residuo se seca a 100°C ; se toma con CHCl_3 y se pasa a un beaker tarado, se evapora el disolvente y finalmente se seca y pesa la cafeína.-

Procedimiento de Jesser H. (55)

El extracto de CCl_4 proveniente del tratamiento de 20 g. de fino polvo de café durante 6 horas en un aparato de Soxhlet, se seca y eliminan todas las trazas del solvente calentando a 103°C durante 30 minutos. El residuo es tomado por 75 ml. de agua caliente, se agrega 10 ml. de solución de MnO_4K al 2% y se enfría luego la solución. Se mantiene así por espacio de 15 minutos y luego se le agregan 7 ml. de CuSO_4 al 20%, 7 ml. de Na_2SO_3 al 10% y 5 ml. de NaOH $\text{N}/1$; se agita y filtra, llevando el volumen a 200 ml.

Se determina la cafeína contenida en 100 ml. de esa solución, por evaluación del nitrógeno por el procedimiento de Kjeldahl; dando resultados bastantes cercanos a aquellos obtenidos por extracción con CHCl_3 , excepto con café decafeinizado donde la presencia de pequeñas cantidades de otros compuestos nitrogenados, causan un error relativo grande con respecto a la baja cantidad de cafeína contenida en él.

El procedimiento puede ser aplicado a infusiones por concentración de 200 ml. a alrededor de 40 ml., se adiciona de 20 ml. de NaOH $0.5/\text{N}$ y se extrae con 140 ml. (50-40-30- y 20 ml.) de CHCl_3 . El extracto se evapora y se trata luego como arriba, excepto que se usan solamente 5 ml. de solución de MnO_4K al 2%.-

Procedimiento de Fisher R. (56)

Se trata 2 g. de té (no mayor de malla 4) con 10 ml. de agua en un frasco de vidrio (de 100 a 150 ml.) y se calienta durante 5 minutos en un baño de agua hirviente. Se agregan 5 ml. de solución de NH_4OH al 10%, se enfría y adiciona de 80 g. de CHCl_3 ; agitar vigorosamente hasta formar una emulsión. Se deja estar media hora. Se agrega 9 u 12 g. de Na_2SO_4 anhidro en pequeñas porciones y se agita vigorosamente después de cada adición.

Se filtra luego dentro de un frasco por medio de un embudo con un tapón de algodón; se puede observar en el filtrado una clara turbidez pero esto no constituye ningún inconveniente. Se trata después el líquido verde o marrón con 0.5 a 1 g. de Na_2SO_4 y se vuelve a agitar. Luego de 5 minutos se agrega alrededor de 0.5 a 0.6 g. de carbón y se repite la operación con intervalos de 5 minutos hasta que se hallan agregado 3 porciones. Se deja reposar media hora y se filtra dentro de un frasco de 50 ml. a través de un filtro provisto de un tapón de asbestos; se debe evitar la evaporación, tanto como sea posible; el cuello del frasco que recibe el filtrado, debe ser estrecho.

Se pesa una cantidad del filtrado dentro de un frasco tarado (40 g. equivalen a 1 g. de té) y se evapora el cloroformo sobre un baño de agua hirviente. Se trata el residuo con 2 ó 3 ml. de alcohol absoluto y se vuelve a evaporar. Después se seca por espacio de 15 minutos sobre un baño de agua hirviente o por 10 minutos a 105°C en una estufa de aire; se enfría y pesa.-

Procedimiento de Kidd J.D., Nanji H.R. y Edwards F.W. (57)

Para la evaluación de cafeína en extractos de té y café.

En un frasco volumétrico de 100 ml., se mezclan 80 ml. de infusión acuosa con 5 ml. de acetato de zinc (21.9 g. de acetato de zinc más 3 ml. de ácido acético glacial más H_2O para formar 100 ml.), se hace rotar el frasco y se agregan 5 ml. de $K_4Fe(CN)_6$ al 10%; se mezcla bien y se filtra, llevando el volumen a 100 ml. Trasferir 50 ml. del filtrado a una ampolla de decantación y extraer con 25 ml. de $CHCl_3$. Se arrastra la capa de cloroformo dentro de otra ampolla de decantación y se lava con 20 ml. de H_2O ; repetir la extracción con $CHCl_3$ 4 veces y lavar cada extracción separadamente con 20 ml. de agua. Se filtran los extractos clorofórmicos extraídos a través de un pequeño papel de filtro, el que se lava luego con $CHCl_3$. Se evapora el solvente y pesa el residuo de cafeína.-

Procedimiento de Delga J. (58)

Para cafés tostados y mezclas de café y sustitutos.

Se extrae la cafeína 3 veces con agua hirviente, se clarifica la solución con acetato de plomo; se oxidan las impurezas con solución de MnO_4K , descomponiendo el exceso con H_2O_2 adicionada de acito acético. Se extrae luego la cafeína de la solución por medio del $CHCl_3$; se evapora éste y se determina el nitrógeno por el procedimiento de Kjeldahl.

El resultado obtenido es practicamente igual al obtenido por el procedimiento de Gobert.-

Otros procedimientos consignados en la bibliografía para la evaluación de cafeína son los siguientes:

Leger (59); Georges (60); Dekker (61).-

C A P I T U L O I I I

Estudio analítico para la determinación
del grado de pureza de la cafeína extraí
da.-

- A) Por el procedimiento de Kjeldahl
 - B) Por el procedimiento colorimétrico
-

Determinación de la pureza de la cafeína extraída

En este capítulo estudiaremos el valor real de los procedimientos de evaluación, determinando el grado de pureza de la cafeína aislada, al establecer el porcentaje de cafeína pura que contienen los extractos finales, obtenidos en cada uno de aquellos.

Para ese fin aplicamos: 1º) un micro-procedimiento de valoración de nitrógeno y 2º) un micro-procedimiento colorimétrico de valoración de la cafeína.

Las diversas cafeínas obtenidas, purificadas o nó por los diferentes procedimientos analíticos que hemos empleado en este trabajo, han resultado contener siempre una pequeña, mayor o menor, proporción de impurezas; por esta razón, de aquí en adelante denominaremos a tales residuos: "cafeína impura".

A) Microvaloración del nitrógeno de la "cafeína impura" Procedimiento de Kjeldahl (62)

1) Mineralización de la sustancia.

La cafeína impura se disuelve en un beaker con CHCl_3 y lleva a volumen en un matraz aforado de 50 ml., lavando repetidas veces con CHCl_3 el beaker.

Se extrae 25 ml. que reservamos para aplicar la colorimetría; los otros 25 ml. se transfieren a un balón de Kjeldahl donde se practicará la mineralización, teniendo cuidado de lavar el cuello del balón con CHCl_3 . Evaporar entonces el CHCl_3 con mucho cuidado, hasta completa sequedad.

Se agrega luego 1 ml. de H_2SO_4 purísimo D: 1.840 y unos pocos miligramos de una mezcla de sulfato de potasio y sulfato de cobre en proporción de 4 a 1, que han sido previamente pulverizados.

El balón con su contenido se calienta durante 10 minutos sobre tela de amianto; la materia orgánica en su mayor parte ya ha sido descompuesta.

Se agrega entonces una gota de perhidrol puro (libre de nitrógeno) y el calentamiento se prolonga por 3 minutos más.

Se agrega otra gota de perhidrol y la adición y calentamiento son continuados, si es necesario, hasta que la solución esté clara y la materia orgánica haya sido completamente destruída.

Luego se enfría y los costados del balón son lavados hacia abajo con 5 ml. de agua.

2) Determinación del amoníaco en el producto de la mineralización.-

Primero debe procederse a su destilación en medio alcalino.

Muchos aparatos se han propuesto para dicho fin desde el inicial de Pregl.

Así Parnas y Wagner (63), publicaron la descripción de un excelente aparato muy empleado y que junto con el de Pregl, han servido de base a los otros propuestos, que son tan sólo modificaciones de ellos.

Se ha utilizado un aparato del tipo Parnas-Wagner, pero construido especialmente, de acuerdo a un diseño de sus autores (64), con colocación mejorada de alguna de sus partes internas, completado con dispositivos especiales de evidente ventaja práctica.

Consta (figura 1 y 2) de un balón A de 100 ml. de capacidad conteniendo unas perlas de vidrio, al cual va adaptado todo el resto del aparato con cierre esmerilado perfecto (representado por el punteado en el esquema). Hacia el lado izquierdo se encuentra unido por un tubo de vidrio ligeramente inclinado, un doblete de bolas de vidrio B de las cuales, la inferior es del tipo Hopkins, pero con la particularidad de que el tubo interior curvado está prolongado en la parte inferior hasta casi tocar la parte interna de dicha bola. Luego continúa un pequeño refrigerante C de 25 cm. de largo y 3 cm. de diámetro, a cuyo final va adaptado por intermedio de un tubo de goma, un tubo de vidrio D de 25 cm. de largo, que en su parte superior es doble llevando un tubo lateral en el que se enchufa la goma de vacío de la trompa de agua y su parte inferior en forma de burbujeador de Folin, pero con 15 agujeros de menos de 1 m.m. de diámetro cada uno en la bolita y 10 de un milímetro en el capuchón. Este tubo va introducido en un tubo E de 20 cm. de largo y 3 cm. de diámetro, tapado con un buen tapón de goma perforado que es atravesado por el tubo "camisa" del burbujeador.

Al balón A, llega hasta una distancia de un milímetro de la pared (lo que permitirá que por aspiración se extraiga bien todo su contenido) un tubo de vidrio afinado en su parte final (para que no se introduzcan las perlas de vidrio al aspirar) y que en su parte superior lleva unida una ampolla de decantación. Hacia la derecha de dicho tubo, un poco por encima de la comunicación lateral con la bola de Hopkins y por debajo de la llave de la ampolla, se efectúa la unión con el generador de vapor G, por intermedio de un tubo de vidrio que lleva intercalada una llave Pirex de triple vía F.

Dicho generador de vapor es un matraz con tubo de seguridad y unido a dos frascos lavadores colocados en serie (de los cuales está indicado uno en el esquema).

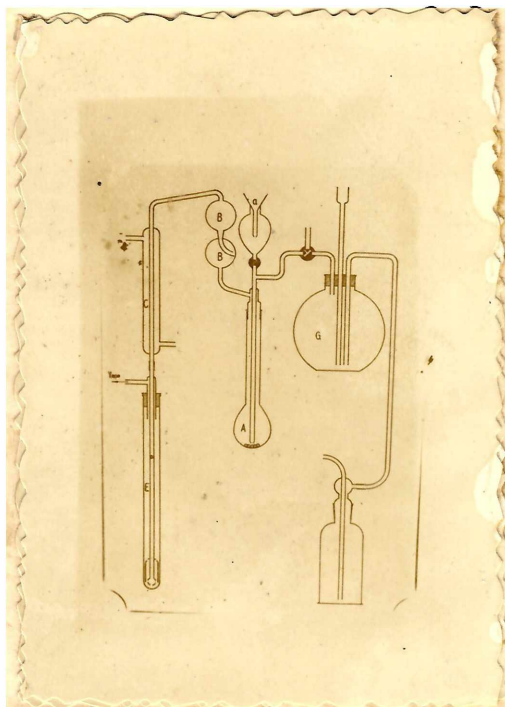
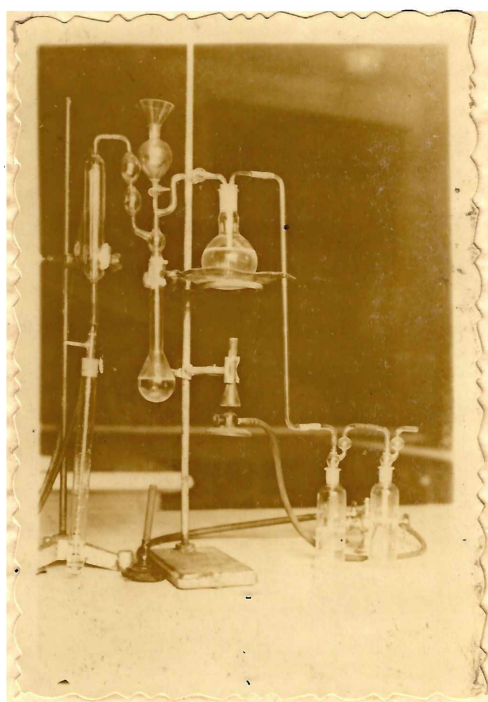
El diámetro de todos los tubos de vidrio empleados es de 0.7 cm.

El aparato, desde el generador de vapor hasta el burbujeador, tiene tan solo una unión de goma y ella se encuentra después del refrigerante, por lo que los productos calientes o fuertemente alcalinos no llegan a estar en contacto con ella, evitándose así el ataque de las gomas que puede alterar los resultados.

Los frascos lavadores, contienen el más externo solución de NaOH saturada y el otro H₂SO₄ concentrado. El primero para retener el CO₂ del aire que se aspira, que molestaría para apreciar el justo viraje-

del indicador y el segundo para retener la pequeña cantidad de NH_3 existente en el aire del laboratorio, para evitar lo cual se han propuesto otros recursos (65).

La unión del balón A con el resto del aparato, se efectúa con un cierre esmerilado perfecto pues se lo considera mucho más conveniente que la unión íntima por soldadura como lo es en la mayoría de los aparatos; resulta así, esta, la parte más frágil del aparato junto con el balón y en cambio estando separados como aquí, si se rompe éste, se reemplaza por otro.



Además si se desea, se puede hacer la "mineralización" directamente en dicho balón y después se adapta al aparato para destilar el amoníaco formado.

La prolongación del tubo interior en la ampolla de Hopkins trae una gran ventaja, pues teniendo la disposición común las gotas de agua condensadas quedan colgando de él por acción del vacío, lo que viene a representar una cierta obturación hidráulica, además esa agua retendrá amoníaco en solución, si bien en muy pequeña cantidad. Con la disposición del tubo interior e inclinación del tubo de unión con el balón A, como lo indica el esquema, en ningún momento se detiene agua en dicha región del aparato. Para evitar también esto, Polonovsky y Boulanger (66) modificaron el aparato de Parnas-Wagner, introduciendo una "camisa" de vidrio exteriormente al doblete de ampollas, por la que se hace circular vapor de agua que produce la evaporación del agua condensada en el interior de dichas ampollas. La solución dada por los autores, nos parece más sencilla y suficiente.

A la llave de triple vía F, que en algunas fotografías de aparatos del tipo Parnas-Wagner existe y en otros nó y sobre cuya existencia y aplicación nadie hace relato; los autores le han dado una aplicación

importantísima que abrevia el tiempo total de la operación y favorece el trabajo siempre que se desee microdestilar, por arrastre de vapor, en serie. Por ello comunican el matraz G con el exterior en todo momento que se desee que el vapor no llegue al interior del balón A, evitándose así la intercalación entre el balón A y el matraz G de un tubo depósito del vapor de agua que se produce, cuando no se emplea y también el balón A con el exterior, cuando aspirando por la trompa se desea que entre aire sin pasar por el generador.

Por ella se efectúa por aspiración con la trompa de agua, el lavado del aparato como veremos más adelante; y éste se lo considera original.

El número y tamaño de los agujeros del burbujeador final permite obtener numerosas y pequeñas burbujas, lo que favorece el contacto con el ácido asegurando la fijación del amoníaco. Se han realizado pruebas simultaneamente, con dos tubos de ese tipo, uno a continuación del otro y con una fuertísima aspiración por la trompa y no se pudo comprobar la existencia de amoníaco en el líquido ácido, del segundo tubo, lo que prueba la eficiencia de dicho burbujeador.

La destilación la efectuamos como en los demás aparatos de este tipo: calentamos el balón G hasta ebullición dejando escapar por la llave de triple vía F, el vapor hacia el exterior, pudiendo dirigirse por intermedio de un tubo de goma al desagüe o a un vaso cualquiera. Mientras tanto agregamos por el embudito (que conviene sea un poco afinado en su extremo para que no pasen a la ampolla de decantación perlas de vidrio, pues la obturarían y para sacarlas hay que desarmar el aparato) el líquido resultante de la mineralización, lavamos 2-3 veces el baloncito que contenía este líquido con 5 ml. de agua destilada hervida por vez e introducimos también I-II gotas de tintura de tornasol; como en nuestro caso sólo poseíamos un sólo balón de Kjeldahl con cuello esmerilado, realizábamos allí mismo la mineralización motivo por el cual sólo nos restaba adaptarlo al aparato.

En el tubo E vertemos ácido titulado, en cantidad necesaria de acuerdo a la cantidad de "cafeína impura" mineralizada teniendo en cuenta que 1 ml. de H_2SO_4 ^N/100 equivalen a 0.000485 g. de cafeína; en caso de poseer más muestras usamos H_2SO_4 ^N/10.

Agregamos también unas gotas de solución alcohólica de rojo de metilo al 0.1%.

Si la cantidad de ácido empleado no alcanza a cubrir los agujeros superiores de la campana del burbujeador se puede agregar cantidad suficiente de agua destilada hervida.

Después de adaptado este tubo al burbujeador, procedemos a alcalinizar el contenido del balón A, agregando por el embudito superior solución saturada de NaOH (libre de Na_2CO_3) en cantidad suficiente indicada por el viraje franco del tornasol. Cerramos la llave de la ampolla de decantación, abrimos lentamente el paso de agua de la trompa y con una vuel-

ta de la llave triple comunicamos A con G. Regulamos entonces la velocidad de la trompa y la ebullición en G, de modo de que en los 5 primeros minutos no se condense mucha agua en A y que en E se produzca un gradual y lento burbujeo. Después aumentamos un poco más, la intensidad de la corriente y de la ebullición y si se condensa demasiado líquido en el balón A, calentamos éste directamente con un mechero mientras sea necesario; la operación la continuamos así durante 15 minutos. Creemos muy conveniente, insistir en el arrastre por el vapor de agua y con ayuda de cierto vacío, pues el arrastre simple por aire no se ha mostrado tan eficiente, obteniéndose siempre datos bajos arrastrando el amoniaco de una cantidad conocida de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Una vez terminada la destilación desprendemos el tubo de fijación sin sacar el burbujeador ni el líquido de su interior, con lo que se evita diluir el ácido con el agua de lavado; sino destapanco el tubo E y elevando un poco el tapón procedemos a la titulación con NaOH $\text{N}/100$ ó $\text{N}/10$ según la normalidad del ácido colocado en E, empleando una microbureta adaptada a un frasco de Woolf parafinado interiormente y que contiene NaOH titulado exactamente y controlado periódicamente.

El tubo burbujeador sirve para agitar, manteniéndolo por su parte superior y elevándolo y bajándolo con lo que se agita y lava todo el interior del tubo, lo que hace muy cómoda la titulación.

3) Lavado del aparato: una vez que se ha retirado el tubo con el burbujeador, adaptamos con una unión de goma un tub de vidrio común sumergido en un gran vaso con agua. Unimos el tubo de aspiración de la trompa con la llave triple, con una vuelta de ella comunicamos el exterior con el balón A y aspiramos por la trompa el agua de dicho vaso varias veces. También agregamos agua por el embudito, dejando llenar la ampolla y abriendo después la llave la dejamos pasar al interior del aparato.

Luego agregamos agua destilada, en varias porciones, en el vaso que contefa agua común, como anteriormente, por el embudito superior y la aspiramos por la trompa. En menos de 5 minutos se tiene el aparato muy bien lavado y sin desarmar nada ni emplear pinzas de Morh, ni calentar y enfriar alternativamente y sucesivamente, el matraz G para que por dicho enfriamiento se produzca la aspiración que debe traer, a través de todo el aparato, el líquido de lavado. Aspirando por la trompa es mucho más cómodo, se ahorra más tiempo y el lavado se efectúa en forma más que suficiente pues se pueden hacer pasar continuamente varios litros de agua en pocos minutos.

El aparato queda así, listo para poder iniciar otra destilación, con el agua del generador aún caliente, lo que ahorra tiempo.

El frasco de lavado con NaOH , nos evita la ebullición del contenido del tubo fijador, pues de otro modo el CO_2 contenido en el aire aspirado, nos molestaría para apreciar el viraje del indicador.

De cada grupo de reactivos se ha efectuado periódicamente una determinación en blanco y este valor se sustrajo del correspondiente hallado en las determinaciones de nitrógeno practicadas.

Luego de efectuar los cálculos hemos hallado los siguientes valores:

- a) Estudio del grado de pureza de las "cafeínas impuras", obtenidas por los diversos procedimientos de evaluación aplicados al café, en base al % de nitrógeno obtenido, empleando el micro-procedimiento de Kjeldahl.

Procedimiento de Savini

Cuadro 19

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	Tostado	1.162	86.091	1.000
2	verde	1.121	87.106	0.976
3	tostado	1.011	87.923	0.889
4	verde	0.995	89.041	0.886

Procedimiento de Fendler y Stuber

Cuadro 20

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust. seca
		% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	Tostado	1.099	96.126	1.056
2	verde	1.071	93.334	0.999
3	tostado	0.980	93.105	0.912
4	verde	0.942	95.169	0896

Procedimiento de Scotti

Cuadro 21

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust. seca
		% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	Tostado	1.399	62.436	0.873
2	verde	1.319	73.901	0.974
3	tostado	1.336	65.346	0.873
4	verde	1.227	69.772	0.856

Procedimiento de Power y Chesnut

Cuadro N° 22

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (S/% N.) (Kjeldahl)	
1	Tostado	1.140	96.519	1.100
2	verde	1.111	98.320	1.092
3	tostado	1.084	95.712	1.037
4	verde	1.034	96.020	0.993

Procedimiento de Cortez

Cuadro N° 23

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (S/% N.) (Kjeldahl)	
1	Tostado	1.306	91.987	1.201
2	verde	1.286	93.200	1.199
3	tostado	1.262	92.144	1.163
4	verde	1.260	92.210	1.161

Procedimiento de Ugarte

Cuadro N° 24

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (S/% N.) (Kjeldahl)	
1	Tostado	1.275	88.811	1.132
2	verde	1.220	91.716	1.110
3	tostado	1.209,	89.592	1.083
4	verde	1.216	91.815	1.116

- b) Estudio del grado de pureza de las "cafeínas impuras", obtenidas por los diversos procedimientos de evaluación aplicados al té, en base al % de nitrógeno obtenido, empleando el micro-procedimiento de Kjeldahl.

Procedimiento de Andrew y Bailey

Cuadro N° 26

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (S/% N.) (Kjeldahl)	
1	Negro	3.260	97.036	3.163
2	negro	3.061	96.566	2.956

Resultados analíticos generales obtenidos en la determinación del grado de pureza aplicando el micro-procedimiento de Kjeldahl para la evaluación del Nitrógeno, en las cafeínas impuras, aisladas por los diversos procedimientos de evaluación en el café.

Cuadro N° 25

Procedi- mientos	Muestras	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura
			(S. % N.) % s/sust.seca Pureza(Kjeldahl)		% s/sust.seca
Savini	Nº 1	Tostado	1.162	86.091	1.000
Fendler y	"	"			
Stuber	"	"	1.099	96.126	1.056
Scotti	"	"	1.399	62.436	0.873
Power y	"	"			
Chesnut	"	"	1.140	96.519	1.100
Cortez	"	"	1.306	91.987	1.201
Ugarte	"	"	1.275	88.811	1.132
Savini	" 2	verde	1.121	87.106	0.976
Fendler y	"	"			
Stuber	"	"	1.071	93.334	0.999
Scotti	"	"	1.319	73.981	0.974
Power y	"	"			
Chesnut	"	"	1.111	98.320	1.092
Cortez	"	"	1.286	93.200	1.199
Ugarte	"	"	1.220	91.716	1.119
Savini	" 3	Tostado	1.011	87.923	0.889
Fendler y	"	"			
Stuber	"	"	0.980	93.105	0.912
Scotti	"	"	1.336	65.346	0.873
Power y	"	"			
Chesnut	"	"	1.084	95.712	1.036
Cortez	"	"	1.262	92.144	1.163
Ugarte	"	"	1.209	89.592	1.083
Savini	" 4	verde	0.995	89.041	0.886
Fendler y	"	"			
Stuber	"	"	0.942	95.169	0.896
Scotti	"	"	1.227	69.772	0.856
Power y	"	"			
Chesnut	"	"	1.034	96.020	0.993
Cortez	"	"	1.260	92.210	1.161
Ugarte	"	"	1.216	91.815	1.116

Procedimiento de Power y Chesnut

Cuadro N° 27

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	Negro	3.182	91.116	2.899
2	negro	2.897	94.621	2.741

Procedimiento de Uglow y Schapiro

Cuadro N° 28

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	Negro	3.024	98.813	2.988
2	negro	2.817	99.201	2.794

Procedimiento de Cortez

Cuadro N° 29

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust. seca
		% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	Negro	3.553	92.513	3.287
2	negro	3.328	93.913	3.125

Procedimiento de Ugarte

Cuadro N° 30

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust. seca
		% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	Negro	3.487	90.869	3.169
2	negro	3.258	92.315.	3.008

Resultados analíticos generales, obtenidos en la determinación del grado de pureza aplicando el micro-procedimiento de Kjeldahl para la evaluación del nitrógeno, en las "cafeínas impuras", aisladas por los diversos procedimientos de evaluación, en el té.

Cuadro N° 31

Procedimientos	Muestras Tipos		Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
			% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
Andrew y Bailey	N° 1	negro	3.260	97.036	3.163
Power y Chesnut	" "	"	3.182	91.116	2.899
Uglove y Schapiro	" "	"	3.024	98.813	2.988
Cortez	" "	"	3.553	92.513	3.287
Ugarte	" "	"	3.487	90.869	3.169
Andrew y Bailey	" 2	negro	3.061	96.566	2.956
Power y Chesnut	" "	"	2.897	94.621	2.741
Uglove y Schapiro	" "	"	2.817	99.201	2.794
Cortez	" "	"	3.328	93.913	3.125
Ugarte	" "	"	3.258	92.315	3.008

c) Estudio del grado de la pureza de las "cafeínas impuras", obtenidas por los diversos procedimientos de evaluación aplicados a la yerba mate, en base al % de nitrógeno obtenido, empleando el procedimiento de Kjeldahl.

Procedimiento de Grandval-Lajoux modificado
Cuadro N° 32

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	virgen	0.999	96.051	0.960
2	cultivo	0.931	96.869	0.902

Procedimiento de Hasselmann y Lopes da Cruz
Cuadro N° 33

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust. seca	(S/% N.) Pureza (Kjeldahl)	
1	virgen	0.960	95.216	0.914
2	cultivo	0.904	94.913	0.858

Procedimiento de Cortez

Cuadro N° 34

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (S/% N.) (Kjeldahl)	
1	virgen	1.226	95.613	1.172
2	cultivo	1.160	95.921	1.112

Procedimiento de Ugarte

Cuadro N° 35

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (S/% N.) (Kjeldahl)	
1	virgen	1.090	92.315	1.006
2	cultivo	1.052	91.969	0.968

Resultados analíticos generales, obtenidos en la determinación del grado de pureza obtenido aplicando el micro-procedimiento de Kjeldahl para la evaluación del nitrógeno, en las "cafeínas impuras", aisladas por los diversos procedimientos de evaluación en la yerba mate.

Cuadro N° 36

Procedi- mientos	Muestras Tipos		Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
			% s/sust.seca	Pureza (S/% N.) (Kjeldahl)	
Grandval- Lajoux mo- dificado	N° 1	virgen	0.999	96.051	0.960
Hasselmann y Lopes da Cruz	" "	"	0.960	95.216	0.914
Cortez	" "	"	1.226	95.613	1.172
Ugarte	" "	"	1.090	92.315	1.006
Grandval- Lajoux mo- dificado	" 2	cultivo	0.931	96.869	0.902
Hasselmann y Lopes da Cruz	" "	"	0.904	94.913	0.858
Cortez	" "	"	1.160	95.921	1.112
Ugarte	" "	"	1.052	91.969	0.968

B) Determinación microcolorimétrica de la cafeína; por el procedimiento de Francisco A. Goin (67).

El procedimiento es de gran exactitud y rapidez; se lo aplica a la determinación de la cafeína en los comprimidos, ya sea en presencia de ácido acetil salicílico, fenacetina, o de ambas sustancias a la vez, como asimismo para determinar la riqueza de cafeína en una muestra de té, café, yerba mate o nuez de kola.

La solución iodo iodurada precipita a la cafeína cuantitativamente en medio ácido; este precipitado de fórmula $C_8H_{10}O_2N_4 \cdot HI \cdot I_4$ es disuelto en alcohol, comparando la coloración amarillento rojiza obtenida con la que da en las mismas condiciones la solución alcohólica del precipitado obtenido a partir de una solución tipo de cafeína.

Soluciones necesarias:

a) solución de cafeína

Cafeína (p.a) 1 gramos
Agua destilada c.s.h. 1000 ml.

b) solución iodo iodurada

Iodo pulverizado 5 g.
Ioduro potásico 4 g.
Agua destilada 250 ml.

Se utiliza intencionalmente una cantidad de ioduro potásico insuficiente para la total disolución del iodo, porque un exceso de esta sal redisolvería el precipitado alcaloídico.

Técnica de la determinación: en un tubo de centrifuga se miden 5 ml. de la solución de cafeína al milésimo. Se agrega 1 ml. de HCl al 20%. Se mezcla y se agrega 2 ml. de la solución iodo iodurada. Se mezcla y se centrifuga 5 minutos a 2.500 revoluciones. Se decanta sin temor a que se desprenda el precipitado que está firmemente adherido al fondo del tubo. Se invierte éste sobre papel de filtro, dejándolo así durante 2 ó 3 minutos, se agrega entonces 7 ml. de alcohol de 95° y se disuelve el precipitado agitando fuertemente el tubo.

Se pasa la solución a una probeta, se lava el tubo con 2 ó 3 ml. de alcohol que también se pasan a la probeta y se completa a 15 ml. Simultáneamente se hace lo mismo con el desconocido, que en nuestro caso (pág. 35) resulta la mitad de la extracción; evapora con cuidado el cloroformo hasta completa sequedad, trata con agua tibia y completa a 25 ml. de volumen; se toma una parte alícuota (en caso de que la muestra sea reducida, no se lleva a volumen y se utiliza toda), realizándose los mismos pasos que con el testigo y comparando finalmente en el colorímetro tipo Dubosc.

(Estos trabajos fueron realizados en el Instituto de Investigaciones de esta Facultad por no poseer el laboratorio de la Cátedra ni el colorímetro ni la centrifuga necesaria).

Por su parte, el autor relata el siguiente trabajo:

Cafeína presente en Mg.	Lectura actual en m.m.	Cafeína hallada en Mg.	Error: / - %
3.5	19	3.53	/ 0.84
4	16.9	3.991	- 0.22
4.5	15.1	4.468	- 0.70
5	13.5	4.999	- 0.02
5.5	13.1	5.575	/ 1.35

En estas determinaciones es necesario que el volumen de la solución acuosa de cafeína del testigo y del desconocido sea el mismo. En caso contrario se completará con H₂O destilada. Se pueden también hacer determinaciones de cafeína con cantidades menores que las consignadas en el cuadro. En ese caso el volumen al que debe llevarse la solución alcohólica - del precipitado conviene reducirla a 10 ml. o menos.-

a) Estudio del grado de pureza de las "cafeínas impuras", obtenidas por los diversos procedimientos de evaluación aplicados al café; usando el procedimiento colorimétrico.

Procedimiento de Savini
Cuadro Nº 37

Mues- tras Nº	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (s/ proced. colorimétrico)	
1	Tostado	1.162	90.231	1.048
2	verde	1.121	85.210	0.955
3	tostado	1.011	90.843	0.918
4	verde	0.995	88.331	0.879

Procedimiento de Fendler y Stuber
Cuadro Nº 38

Mues- tras Nº	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (s/proced. colorimétrico)	
1	Tostado	1.099	97.160	1.068
2	verde	1.071	90.520	0.969
3	tostado	0.980	97.461	0.955
4	verde	0.942	92.424	0.871

Procedimiento de Scotti

Cuadro N° 39

Mues- tras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza { s/proced. (colorimétrico)	
1	Tostado	1.399	70.965	0.993
2	verde	1.319	68.356	0.902
3	tostado	1.336	68.763	0.919
4	verde	1.227	64.922	0.797

Procedimiento de Power y Chesnut

Cuadro N° 40

Mues- tras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza { s/proced. (colorimétrico)	
1	Tostado	1.140	98.312	1.121
2	verde	1.111	93.860	1.042
3	tostado	1.084	97.519	1.057
4	verde	1.034	92.720	0.959

Procedimiento de Cortez

Cuadro N°41

Mues- tras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza { s/proced. (colorimétrico)	
1	Tostado	1.306	94.616	1.236
2	verde	1.286	91.561	1.177
3	tostado	1.262	94.217	1.189
4	verde	1.260	90.068	1.135

Procedimiento de Ugarte

Cuadro N° 42

Mues- tras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza { s/proced. (colorimétrico)	
1	Tostado	1.275	92.413	1.178
2	verde	1.220	90.020	1.098
3	tostado	1.209	92.006	1.112
4	verde	1.216	89.066	1.083

Resultados analíticos generales obtenidos en la determinación del grado de pureza logrado, aplicando el procedimiento colorimétrico, a las "cafeínas impuras", aisladas por los diversos procedimientos de evaluación, usados para café.

Cuadro N° 43

Procedimientos	Muestras	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura
			% s/sust.seca	Pureza { según proced. colorimétrico)	% s/sust.seca
Savini	N° 1	Tostado	1.162	90.231	1.048
Fendler y Stuber	" "	"	1.099	97.160	1.068
Scotti	" "	"	1.399	70.965	0.993
Power y Chesnut	" "	"	1.140	98.312	1.121
Cortez	" "	"	1.306	94.616	1.236
Ugarte	" "	"	1.275	92.413	1.178
Savini	" 2	Verde	1.121	85.210	0.955
Fendler y Stuber	" "	"	1.071	90.520	0.969
Scotti	" "	"	1.319	68.356	0.902
Power y Chesnut	" "	"	1.111	93.860	1.043
Cortez	" "	"	1.286	91.561	1.177
Ugarte	" "	"	1.220	90.020	1.098
Savini	" 3	Tostado	1.011	90.843	0.918
Fendler y Stuber	" "	"	0.980	97.461	0.955
Scotti	" "	"	1.336	68.763	0.919
Power y Chesnut	" "	"	1.084	97.519	1.057
Cortez	" "	"	1.262	94.217	1.189
Ugarte	" "	"	1.209	92.006	1.112
Savini	" 4	Verde	0.995	88.331	0.879
Fendler y Stuber	" "	"	0.942	92.424	0.871
Scotti	" "	"	1.227	64.922	0.797
Power y Chesnut	" "	"	1.034	92.720	0.959
Cortez	" "	"	1.260	90.068	1.135
Ugarte	" "	"	1.216	89.066	1.083

b) Estudio del grado de pureza de las "cafeínas impuras", obtenidas por los diversos procedimientos de evaluación aplicados al té, usando el procedimiento colorimétrico.

Procedimiento de Andrew y Bailey

Cuadro N° 44

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza { s/proced. (colorimétrico)	
1	negro	3.260	96.321	3.140
2	negro	3.061	98.215	3.006

Procedimiento de Power y Chesnut

Cuadro N° 45

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza { s/proced. (colorimétrico)	
1	negro	3.182	92.766	2.952
2	negro	2.897	94.819	2.747

Procedimiento de Uglow y Schapiro

Cuadro N° 46

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza { s/proced. (colorimétrico)	
1	negro	3.024	99.006	2.994
2	negro	2.817	97.978	2.760

Procedimiento de Cortez

Cuadro N° 47

Muestras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza { s/proced. (colorimétrico)	
1	negro	3.553	91.812	3.262
2	negro	3.328	94.512	3.145

Procedimiento de Ugarte

Cuadro N° 48

Mues- tras N°	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (s/proced. colorimétrico)	
1	negro	3.487	89.915	3.135
2	negro	3.258	93.114	3.034

Resultados analíticos generales, obtenidos en la determinación del grado de pureza, aplicando el procedimiento colorimétrico, a las "cafeínas impuras", aisladas por los diversos procedimientos de evaluación, usados para té.

Cuadro N° 49

Proce- dimeñ- tos	Mues- tras	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
			% s/sust.seca	Pureza (según proced. colorimétrico)	
Andrew y Bailey	N°1	negro	3.260	96.321	3.140
Power y Chesnut	"	"	3.182	92.766	2.952
Uglow y Schapiro	"	"	3.024	99.006	2.994
Cortez	"	"	3.553	91.812	3.262
Ugarte	"	"	3.487	89.915	3.135
Andrew y Bailey	N°2	negro	3.061	98.215	3.006
Power y Chesnut	"	"	2.897	94.819	2.747
Uglow y Schapiro	"	"	2.817	97.978	2.760
Cortez	"	"	3.328	94.512	3.145
Ugar te	"	"	3.258	93.114	3.034

c) Estudio del grado de pureza de las "cafeínas impuras", obtenidas por los diversos procedimientos de evaluación aplicados a la yerba mate, usando el procedimiento colorimétrico.

Procedimiento de Grandval-Lajoux modificado

Cuadro Nº 50

Muestras Nº	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (s/proced. colorimétrico)	
1	virgen	0.999	97.463	0.974
2	cultivo	0.931	97.915	0.912

Procedimiento de Hasselmann y Lopes da Cruz

Cuadro Nº 51

Muestras Nº	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (s/proced. colorimétrico)	
1	virgen	0.960	94.118	0.904
2	cultivo	0.904	95.535	0.864

Procedimiento de Cortez

Cuadro Nº 52

Muestras Nº	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (s/proced. colorimétrico)	
1	virgen	1.226	96.006	1.177
2	cultivo	1.160	96.269	1.117

Procedimiento de Ugarte

Cuadro Nº 53

Muestras Nº	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
		% s/sust.seca	Pureza (s/proced. colorimétrico)	
1	virgen	1.090	93.051	1.014
2	cultivo	1.052	93.336	0.982

Resultados analíticos generales, obtenidos en la determinación del grado de pureza, aplicando el procedimiento colorimétrico, a las "cafeínas impuras", aisladas por los diversos procedimientos de evaluación, usados para yerba mate.

Cuadro Nº 54

Procedimientos.	Muestras	Tipos	Cafeína impura		Cafeína pura
			% s/sust.seca	(s/proced.) (colorimétrico)	% s/sust.seca
Grandval-Lajoux modificado	Nº 1	virgen	0.999	97.463	0.974
Hasselman y Lopes da Cruz	"	"	0.960	94.118	0.904
Cortez	"	"	1.226	96.006	1.177
Ugarte	"	"	1.090	93.051	1.014
Grandval-Lajoux modificado	Nº 2	cultivo	0.931	97.915	0.912
Hasselman y Lopes da Cruz	"	"	0.904	95.535	0.864
Cortez	"	"	1.160	96.269	1.117
Ugarte	"	"	1.052	93.336	0.982

=====

CUADRO N° 55

Cuadro analítico general de los valores obtenidos, mediante la aplicación de los procedimientos de evaluación de cafeína en café y de los valores de sus respectivos grados de pureza, determinados mediante la aplicación de los procedimientos de Kjeldahl y colorimétricos.

Procedimientos	Muestra N°	Tipo	Humedad % O.A.	Cafeína impura % s/sust.húmeda	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
					% s/sust.seca	Pureza (S/% N.) (Kjeldahl)		% s/sust.seca	Pureza (seg./proced.) (colorimétrico)	
Savini	1	Tostado	3.55	1.120	1.162	86.091	1.000	1.162	90.231	1.048
Fendler y Stuber	"	"	"	1.060	1.099	96.126	1.056	1.099	97.160	1.068
Scotti	"	"	"	1.350	1.399	62.436	0.873	1.399	70.965	0.993
Power y Chesnut	"	"	"	1.100	1.140	96.519	1.100	1.140	98.312	1.121
Cortez	"	"	"	1.260	1.306	91.987	1.201	1.306	94.616	1.236
Ugarte	"	"	"	1.230	1.275	88.811	1.132	1.275	92.413	1.178
Savini	2	verde	9.05	1.020	1.121	87.106	0.976	1.121	85.210	0.955
Fendler y Stuber	"	"	"	0.974	1.071	93.334	0.999	1.071	90.520	0.969
Scotti	"	"	"	1.200	1.319	73.981	0.974	1.319	68.356	0.902
Power y Chesnut	"	"	"	1.010	1.111	98.320	1.092	1.111	93.860	1.043
Cortez	"	"	"	1.170	1.286	93.200	1.199	1.286	91.561	1.177
Ugarte	"	"	"	1.110	1.220	91.716	1.119	1.220	90.020	1.098
Savini	3	Tostado	4.09	0.970	1.011	87.923	0.889	1.011	90.843	0.918
Fendler y Stuber	"	"	"	0.940	0.980	93.105	0.912	0.980	97.461	0.955
Scotti	"	"	"	1.281	1.336	65.346	0.873	1.336	68.763	0.919
Power y Chesnut	"	"	"	1.040	1.084	95.712	1.036	1.084	97.519	1.057
Cortez	"	"	"	1.210	1.262	92.144	1.163	1.262	94.217	1.189
Ugarte	"	"	"	1.160	1.209	89.592	1.083	1.209	92.006	1.112
Savini	4	verde	9.54	0.900	0.995	89.041	0.886	0.995	88.331	0.879
Fendler y Stuber	"	"	"	0.852	0.942	95.169	0.896	0.942	92.424	0.871
Scotti	"	"	"	1.110	1.227	69.772	0.856	1.227	64.922	0.797
Power y Chesnut	"	"	"	0.935	1.034	96.020	0.993	1.034	92.720	0.959
Cortez	"	"	"	1.140	1.260	92.210	1.161	1.260	90.068	1.135
Ugarte	"	"	"	1.100	1.216	91.815	1.116	1.216	89.066	1.083

CUADRO N° 56

Cuadro analítico general de los valores obtenidos, mediante la aplicación de los procedimientos de evaluación de cafeína en té y de los valores de sus respectivos grados de pureza, determinados mediante la aplicación de los procedimientos de Kjeldahl y colorimétrico.

Procedimien tos	Muestra Nº	Tipo	Humedad % O.A.	Cafeína impura % s/sust.húmeda	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
					(S/% N.) % s/sust.seca Pureza(Kjeldahl)	(seg./proced.) (colorimétrico)				
Andrew y Bailey	1	Negro	7.83	3.005	3.260	97.036	3.163	3.260	96.321	3.140
Power y Chesnut	"	"	"	2.933	3.182	91.116	2.899	3.182	92.766	2.952
Uglov y Schapiro	"	"	"	2.788	3.024	98.813	2.988	3.024	99.006	2.994
Cortez	"	"	"	3.275	3.553	92.513	3.287	3.553	91.812	3.262
Ugarte	"	"	"	3.214	3.487	90.869	3.169	3.487	89.915	3.135
Andrew y Bailey	2	negro	6.25	2.870	3.061	96.566	2.956	3.061	98.215	3.006
Power y Chesnut	"	"	"	2.716	2.897	94.621	2.741	2.897	94.819	2.747
Uglov y Schapiro	"	"	"	2.641	2.817	99.201	2.794	2.817	97.978	2.760
Cortez	"	"	"	3.120	3.328	93.913	3.125	3.328	94.512	3.145
Ugarte	"	"	"	3.054	3.258	92.315	3.008	3.258	93.114	3.034

CUADRO N° 57

Cuadro analítico general de los valores obtenidos, mediante la aplicación de los procedimientos de evaluación de cafeína en yerba mate y de los valores de sus respectivos grados de pureza, determinados mediante la aplicación de los procedimientos de Kjeldahl y colorimétricos.

Procedimien- tos	Muestra N°	Tipo	Humedad % O.A.	Cafeína impura % s/sust.húmeda	Cafeína impura		Cafeína pura s/sust.seca	Cafeína impura		Cafeína pura % s/sust.seca
					% s/sust.seca	Pureza { S/% N. } (Kjeldahl)		% s/sust.seca	Pureza { seg./proced. } (colorimétrico)	
Grandval-La- joux modifi- cado.	1	virgen	3.26	0.967	0.999	96.051	0.960	0.999	97.463	0.974
Hasselmann y Lopes da Cruz	"	"	"	0.929	0.962	95.216	0.914	0.960	94.118	0.904
Cortez	"	"	"	1.186	1.226	95.613	1.172	1.226	96.006	1.177
Ugarte	"	"	"	1.055	1.090	92.315	1.006	1.090	93.051	1.014
Grandval-La- joux modifi- cado	2	cultivo	3.21	0.901	0.931	96.869	0.902	0.931	97.915	0.912
Hasselmann y Lopes da Cruz	"	"	"	0.875	0.904	94.913	0.858	0.904	95.535	0.864
Cortez	"	"	"	1.123	1.160	95.921	1.112	1.160	96.269	1.117
Ugarte	"	"	"	1.019	1.052	91.969	0.968	1.052	93.336	0.982

C A P I T U L O I V

Consideraciones generales

Conclusiones

Consideraciones generales

El estudio analítico de algunos de los principales procedimientos de evaluación de la cafeína, practicado en tres productos vegetales distintos, con comprobación ulterior de su pureza, nos permite hacer las siguientes consideraciones respecto de cada uno de dichos procedimientos:

I) Consideraciones relativas a los procedimientos de evaluación de cafeína, aplicados al café verde o tostado.

Se observa en principio que de todos los procedimientos estudiados tres son los que se destacan sobre los demás.

Primeramente el de Francisco Cortez que es el que da mayor porcentaje de extracción, aunque de menor pureza que el de Power y Chesnut; pero llevando a ambos residuos a cafeína 100%, ya sea por su contenido de nitrógeno o por la evaluación colorimétrica, se vé que el procedimiento de Cortez es superior al oficial norteamericano para café.

Da también buenos resultados el procedimiento de Ugarte, pero como ya lo hemos indicado en su oportunidad, la delicada técnica del proceso, es la que en realidad, no lo indica como muy aceptable.

En orden decreciente de eficacia le siguen los procedimientos de Fendler y Stuber; Savini; y Scotti.

II) Consideraciones relativas a los procedimientos de evaluación de cafeína al té negro.

Aquí también se observa que se destaca sobre los demás el procedimiento de Cortez; da un elevado porcentaje de extracción, que reducido a cafeína 100%, sigue siendo superior a los otros aquí estudiados.

Le sigue en orden de méritos el procedimiento oficial norteamericano, vale decir el de Andrew y Bailey; que obtiene un residuo más puro pero de menor cantidad, que el obtenido por el procedimiento de Cortez.

El procedimiento de Ugrow y Schapiro es el que obtiene, el residuo de cafeína más puro; pero tiene el inconveniente de ser escaso.

Se obtienen también resultados comparables, bastante buenos, con la aplicación del procedimiento de Ugarte.

El procedimiento de Power y Chesnut aplicado al té; ya no es tan aconsejable como para café.

III) Consideraciones relativas a los procedimientos de evaluación de cafeína, aplicados a yerba mate, de los tipos virgen y de cultivo.

Lo anteriormente dicho respecto del procedimiento de Cortez, se cumple también aquí.

Le sigue en orden de exactitud el procedimiento de Ugarte que obtiene un residuo con menor pureza y más escaso.

Buenos resultados se obtienen con el procedimiento de Grandval-Lajoux modificado, adoptado por la Oficina Química Nacional; siendo éste el que da el residuo de cafeína más puro.

Le sigue en orden de méritos el procedimiento de Hasselmann y Lopez da Cruz.

~~~~~

### Conclusiones

El estudio teórico experimental que hemos realizado para determinar el grado de exactitud de los procedimientos analíticos corrientes en los laboratorios, enunciados en el curso de este trabajo, para la valoración de la cafeína en café, té y yerba mate, nos permite extraer las siguientes conclusiones:

1º) El procedimiento que da el más alto porcentaje de cafeína pura -a 100%- es el debido al químico brasileño Francisco Fleusino Cortez, y si se tiene en cuenta que su técnica es muy sencilla; y la operación cómoda y práctica, puede estimarse como el procedimiento de elección para cualquiera de los tres alimentos estimulantes estudiados.

2º) Que los distintos procedimientos indicados aplicados a la misma muestra dan cifras dispares para el porcentaje de cafeína pura; al perder así el carácter de comparabilidad dichos datos analíticos, es indispensable que en los reglamentos oficiales, particulares, pliego de condiciones, etc., bromatológicos:

a) se especifique, cuando se indique cifras mínimas de cafeína, el procedimiento para valorarla;

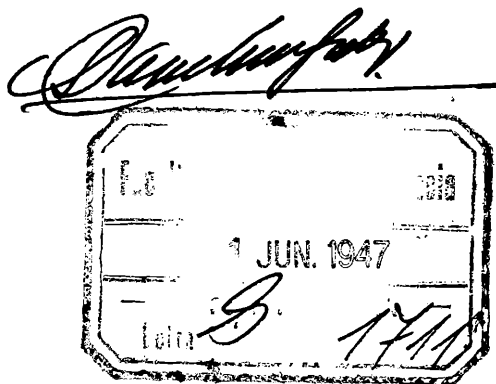
b) que se adopte oficialmente, por las razones expuestas, como procedimiento oficial para valorar la cafeína en café, té o yerba mate, el de Francisco Fleusino Cortez.

3º) Si bien la aseveración hecha por Uglow y Schapiro de que la cafeína obtenida por el procedimiento ideado por los mismos es purísima -prácticamente 100% de pureza- ha sido confirmada por nosotros (que hemos aislado por ese procedimiento los residuos cafeínicos de mayor pureza, en su aplicación para la evaluación de cafeína en el té), sus datos, muy bajos, no permiten aconsejarlo por el momento.

4º) Merece hacerse resaltar la conformidad y comparabilidad de los resultados analíticos obtenidos para conocer la pureza de la cafeína extraída del té y yerba mate, cuando se aplica los procedimientos nombrados (Kjeldahl y colorimétrico), como así también la menor conformidad en lo que respecta al café.

Nos proponemos en un trabajo posterior, tratar de determinar cuales son las sustancias interferentes que producen esta anomalía:-

V. B.  
*[Signature]*



La Plata, junio 11 de 1947

De acuerdo con lo dispuesto en el Art. 88 inciso e) del Reglamento en vigencia, designase a los señores profesores Dres. Vicente Colabraro, Juan G. Romano Yalour, Santiago A. Celst, Leonor Sarlo Villagas de Bellini y con la presidencia del señor prof. Dr. Alfredo A. Sanguinetti, constituyan la comisión que deberá estudiar el presente trabajo de tesis, dentro del término de veinte días a partir de la fecha.

*Calvo Sanguinetti*

La Plata

ju 1947

Reunido el Jurado para determinar la aceptación o rechazo del trabajo de tesis presentado por el ex-alumno del doctorado en Química, señor Oscar O. Gatti, titulado "Estudio comparativo de algunos procedimientos de evaluación de cafeína en café, té y yerba mate" tema oportunamente anotado, por unanimidad de votos, acuerda aprobarlo.

El Dr. Santiago A. Celst en su imposibilidad de asistir a este acto, remite por escrito su opinión acerca del trabajo, en el sentido de que el mismo puede ser aceptado.

Acto seguido se procede a discutir la calificación que el trabajo merece, resolviendo calificarlo con la nota de

La Plata, Agosto 19 de 1947

Reunido el Jurado para determinar la aceptación o rechazo del trabajo de tesis presentado por el ex-alumno del doctorado en Química, señor Oscar O. Gatti, titulado "Estudio comparativo de algunos procedimientos de evaluación de cafeína en café, té y yerba mate" tema oportunamente anotado, por unanimidad de votos, acuerda aprobarlo.

Los Dres. Celst y Polbraro en la imposibilidad de asistir a este acto, remiten por escrito sus opiniones acerca del trabajo, en el sentido de que el mismo puede ser aceptado.

Acto seguido se procede a discutir la calificación,

que el trabajo merece, resolviendo calificarlo con la nota  
de Distinguido. —

*[Handwritten signatures]*  
J. M. P. —  
F. M. P. —  
F. M. P. —

## C A P I T U L O      V

~~~~~

BIBLIOGRAFIA

~~~~~

- (1) Savini (G.).- Ann.de Chim. anal. appl. XIII, 217-20, (1913)
- (2) Fendler (G) y Stuber (W).- Zeit. Unters. Nahr. v.Genussm.- XXVIII, 9-20, (1914)
  - a) Ann. de chim. anal. appl. XX, 15, (1915)
  - b) Ann. des falsifs VIII, 107, (1914)
  - c) Journ. of. Society of Chem. Industry. 802, (1914)
  - d) Official and tentative methods of analysis of the Association of official Agricultural chemist, 217, (1945)
- (3) Power (F.B.) y Chesnut (V.K.).- Journ of American Chem. Society. XLI, 1298-306, (1919)
  - a) Ann. de chim. anal. appl. 183, (1920-
  - b) Official and tentative methods of analysis of the Association of official Agricultural chemists.- 217, (1945)
- (4) Scotti (G).- Boll, chim. farm.- LXXVII, 403-5, (1938)
- (5) Ugarte (T).- An. de la Soc. Quim. Arg.; Bs.As., VIII, 413, (1920-
  - a) Journ. of pharm. chim.-XXIV,378-9, (1921)
- (6) Cortez (F.F.).-Terceiro Congresso Sul Americano de chimia.Actas e Trabalho. 7a. seccao.volumé VI pág.214
  - a) Rev.Soc.Brasil.quim.- IV,105, (1933)
- (7) Andrew (R.E.) y Bailey (E.M.).-Conn.Agr.Expte.Sta.Bull.-227-256-8(1921)
  - a) Analyst XLVI, 405.
- (8) Uglow (W.A.) y Schapiro (A.M.).- Leningrad.Med.Inst.Untersuch.Lebensm. LV, 149-55, (1928)
- (9) Grandval (A) y Lajoux (L).- Ministerio de Hacienda Oficinas Químicas modificado. Nacionales. Leyes, Decretos y Resoluciones. Fascículo V, pág.82, (1933)
  - b) Ceriotti A.-Yerba mate-Deficiones,composicion química, ensayos sumarios,análisis químicos, caracteres de apreciación,normas oficiales. pág.18, (1936)
- (10) Hasselmann (J) y Lopes da Cruz (A).-Rev.alimentar (Rio de Janeiro)IV, 31-7-8, (1940)
- (11) Lendrich (K) y Nottbohm (E).-Zeit. Unter. Nahr. v.Genussem.-XVII, 241-65, (1909)
- (12) Palet (L.P.J.).- Ann. de chim. anal. appl.- XXIII, 26, (1918)
- (13) EEkhourt (F.C.van).-Chem. Weekblad.- XXVII, 189-91, (1930)
- (14) Herrero Ducloux (E) y Heredia (C.E.).-Estudio crítico de métodos de valoración de cafeína en yerba mate.Actas y Trabajos del Primer Congreso Nacional de Medicina. Bs.As.,V,221, (1916)
- (15) Garino (M) y Guglielmelli (L).-Valoración de la cafeína en yerba mate. Actas y Trabajos del Primer Congreso Nacional de Medicina.Bs.As.- V,225,(1916)
- (16) Burmann (J).- Ann. desfalsifs.- IV, 99-101, (1911)
  - a) Bull. Soc. Chim.- VII, 239 (1911)
  - b) Pharm. Centralb.- LI, 878, (1910)
- (17) Virchow (C).- Chem. Zgt.- XXIV, 1037, (1911)
  - a) Zeit. Unter. Nahr. v.Genussm.- XXII,179, (1911).

- (18) Adam (F).- Arch. chem. Mikros.- III, 212-15, (1919)
- (19) Katz (E).- Berichte. d. Deutschen. Pharm. Ges.- XX, 250, (1902)
- (20) Costes (G).- Ann. de chim. Anal. appl.- XVII, 246-9, (1912)
  - a) Ann. des falsifs.- VI, 305, (1912)
- (21) Lukas (J).- Chem. Listy.- XVIII, 4-8,38-42,68-72, (1924)
- (22) Gobert (S).- Ann. des falsifs.- XIX, 586-94, (1926)
- (23) Bonifazi (G).- Mitt. Lebensm. Hyg.- XVII, 307-15, (1926)
  - a) Ann. de chim. Anal. appl.- IX, 33-8, (1927)
- (24) Vautier (E).- Ann. de chim. anal. appl.- XXIII, 207, (1918)
  - a) Mitt. Lebensm. Hyg.- IX, 54-7, (1918)
- (25) Hilger y Juckenack.- Mitt. Lebensm. Hyg.- IV, 49-50, (1897)
  - a) Chem. Centralb.- IV, 145-54, (1897)
  - b) Autenrieth (G).- Reconocimiento de venenos y me  
dicamentos activos.-pág.281,Barcelona,  
(1908)
- (26) Gadamer y Wantig - Lendrich y Murfield.- Zeit. Unter. Nahr. u.  
Genussm.-XVI, 647, (1908)
- (27) Hefelmann.- Ibid. Ibid.- XVII, 553, (1909)
- (28) Foster (A) y Riechelmann (R).- Zeit. f. öffentl. chem.-III,129,(1897)
- (29) Graf (L).- Mitt. Lebensm. Hyg.- IV, 88, (1897)
- (30) Tatlock y Thomson.- Journ. Soc. Chem. Ind.- XXIX, 138, (1910)
  - a) Zeit. Unter. Nahr. u. Genussm.-XXI,569,(1911)
- (31) Wolf (H).- Zeit. f. öffentl. che.- XII, 186, (1906)
- (32) Trillich (H) y Göckel (H).- Chem. Centralb.- I, 1248, (1897)
- (33) Celli (A).-Manuale Dell'Igienista. vol.I,pág.580-81,Torino, (1911)
- (34) Hanús y Chossenskii.- Zeit. Unter. Nahr. Genussm.- 313, (1906)
- (35) Chevallier (A) y Baudrimont (E).- Dictionnaire des alterations etc  
falsifications des sustances alimentaires.-2º vol.,  
Paris, (1895)
- (36) Bourrey (G) y Marquet (E).- Traité d'analyse chimique.-pág.715,París,  
(1908)
- (37) Balland (A).- Les aliments (analyse-expertise-valeur alimentaire)  
2º vol.,París, (1907)
  - a) Journ. de Pharm. et de chim.- XX, 543,(1904)
- (38) Gerard (E) y Bonn (A).- Traité pratique d'analyse des denrées alimen  
taires.- pag.297, París, (1904)
- (39) Köning (I).- Chemie Zusammensetzung der Menschlichen Nahrungs-und  
Genussmittel.- Tomo I, pag. 991, Berlin, (1903)
- (40) Keller (C.C.).- Berichte. d. Deutschen.Pharm. Ges.- VII, 105, (1897)
  - a) Chem. Centralb.- I, 1134, (1897)
- (41) Siedler.- Berichte. d. Deutschen. Pharm. Ges.- VIII, 8, (1898)
  - a) Zeit. Unter. Nahr. u. Genussm.- I,422,(1898)
- (42) Beitter.- Berichte. d. Deutschen. Pharm. Ges.- XI, 339, (1901)
- (43) Gadamer (J).- Arch. Pharm.- 237-58, (1899)
  - a) Chem. Centralb.- I, 713, (1899)
- (44) Wantig.- Arb. a. d. Kais. Ges. Amte.- XXIII, 315, (1906)
  - a) Zeit, Unter. Nahr. u. Genussm.- XII,430,(1906)

- (45) Hartwich y Du Pasquier.- Apoth. Ztg.- XXIV, 109, (1909)  
a) Zeit.Unter.Nahr. u. Genussm.- XX,100,(1910)
- (46) Reinsch.- Zeit. Unter. Nahr. u. Genussm.- XV, 702, (1908)
- (47) Grandval (A) y Lajoux (L).- Rev. Inter. falsifs.- I, 168, (1893)  
modificado  
a) Pharm. Centralb.- XXXIV, 702, (1893)
- (48) Keller-Siedler.- Manuel Suisse des denrées alimentaires. 2a. ed. pág.  
164.
- (49) Girard (M).- Analyse des matieres alimentaires, et recherche de Leurs  
falsifications. pág. 553, París, (1904)
- (50) Tasilly (E).- Ibid, Ibid.- pág. 557
- (51) Phillippe (E).- Mitt. Lebensm. Hyg.- VI,177-91,233-47, (1915)  
a) Ann. des falsifs. Paris, (1916), Nos.88,  
89,96,98 (Extracto de los trabajos del autor  
por Gobert)  
b) Corti (D).- Tesis. Cafés del comercio.  
F. de Q. y F. La Plata, pág. 115, (1924)
- (52) Gobert (S).- Ann. des falsifs.- XXI, 517-8, (1928)
- (53) Bonn (A) y Desgrez (CH).- Ann. des. falsifs.- XXIV, 546-7, (1931)
- (54) Borgnann (K).- Apoth. Ztg.- LXXI, 56, (1931)
- (55) Jesser (H).- Chem. Ztg.- LVI, 842-3, (1932)
- (56) Fisher (R).- Scientia. Pharm.- X, 102-3, (1939)
- (57) Kidd (J.D.), Nanji (H.R.) y Edwards (F.W.).- Analyst.- LXVI,240,(1942)
- (58) Delga (J).- Ann. Pharm. franc.- I, 72-5, (1943)
- (59) Herail (J).- Traité de Matieré Médicale pharmacographie. pág.633,(1927)
- (60) Georges.- Journ. Pharm. chim.- IV, 58, (1896)
- (61) Dekker.- Zeit. Unters. u. Nahr. u. Genussm.- VI, 843, (1903)  
a) Issoglio (G).- La chimica degli alimenti.  
pág. 806, (1927)
- (62) Wilson (C.L.).- Ann. introduction to microchemical methods. pág.140
- (63) Parnas y Wagner.- Biochem. Z.- CXXV, 253, (1921)
- (64) Nico (R).- Tesis. Datos sobre los protidos séricos. F. de Q. y F. La  
Plata. pág. 86, (1938)
- (65) Golberg y Banfi.- Rev. Soc. Arg. Biol.- XI, 440, (1935)
- (66) Polonovsky y Boulanger.- Bull. Soc. Chim. Biol.-XVII, 944, (1935)
- (67) Goin (F.A.).- Actas y Trabajos del V Congreso Nacional de Medicina  
Bs.As., T.7, 618, (1934)  
b) An. Asoc. Quim. Arg.- XXIV, 18, (1936)

---

(68) Marangoni (H).-Determinación de cafeina en té, café y yerba mate (Estudio comparativo del método rápido de Cortez). Archivos de Farmacia y Bioquímica de Tucumán. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Publicación N° 338, pag. 135, T II N° 2. Tucuman 1945.

OTRAS OBRAS MODERNAS CONSULTADAS

- (69) -ALLEN'S. Comercial Organic Analysis.London 1937.-
- (70) -BERL-LUNGE-D'ANGS. Métodos de análisis químico industrial  
1945.-
- (71) -BRIDGEN(M).MATTICE(M). Food and Beverages Analysis.Philadel-  
phia 1942.-
- (72) -CASARES LOPEZ (R). química de los alimentos.-Madrid 1942.-
- (73) -COMENGE(M). Análisis de los alimentos .-Madrid 1936.-
- (74) -COX (H.E.) The Chemical Analysis of Foods.London 1946.-
- (75) -ISSOGLIO(G). La Chimica degli alimenti.Torino 1927.-
- (76) -KLING (A). Methodes actuelles d'expertises employées au  
Laboratoires Municipal de Paris.-
- (77) -LEACH(A.E.) and WINTON(A.L) Food inspection and Analysis.-  
New York.1931.-
- (78) -MAESTRE IBANEZ (M) Analysis de alimentos .Madrid 1931.
- (79) -MUSPRAT . Enciclopedia de Química Industrial.-
- (80) -PELLERIN (G). Guide pratique de l'experte chimiste en  
denrées alimentaires .-Paris 1928.-
- (81) -SHERMAN (H.C.) Foods Products.New York.-
- (82) -SHRADER (J.H.) Food Control .-
- (83) -THORPE'S DICTIONARY of Applied Chemistry. (1939).-

(84) -ULLMAN (F) Enciclopedia de Química Industrial.-

85) -VILLAVECHIA (G.V.) Trattato di Chimica Analitica applicata . Barcelona 1944.-

(86) -VILLIERS(A).COLLIN(E).FAYOLLE(M). Traite des Falsifications et alterations de substances alimentaires.Paris 1909.-

(87) -WADSMORTH(A.B) Métodos Standard de Laboratorio del Departamento Sanitario del Estado de New York. Buenos Aires.-

(88) -WINTON (A.L.) and WINTON (B.K.) The Analysis of Foods . 1945.-

(89) -WOODMAN (A.G.) Food Analysis .New York and London.1941.-