

2 Ej. No. 67



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA
DETERMINACION CUANTITATIVA DE
SAPONINAS EN PLANTAS**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

T E S I S

**Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a :

CLARA LUZ MANSUR MACIAS

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

OBJETIVO	1
INTRODUCCION	2
GENERALIDADES	3
Definición, composición química y clasificación de las saponinas	3
Distribución de las saponinas	5
Características de las saponinas	6
Importancia y usos	6
Aislamiento de saponinas	7
Efectos biológicos de las saponinas	7
Efecto hemolítico	8
Efecto en el crecimiento	10
Efectos en sangre y niveles de colesterol en tejidos	12
Flatulencia en rumiantes	13
Inhibición de la actividad enzimática	14
Inhibición de la actividad del músculo liso ...	14
PARTE EXPERIMENTAL	16
Determinación inicial del método	16
Variables manejadas para ajustar el método inicial ..	19
Método ajustado	31
COMPROBACION EXPERIMENTAL DEL METODO	34
Resultados	36
Determinación de la unidad de medida	36
Resultados en unidades de hemólisis obtenidos de las plantas	39
DISCUSION	40
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFIA	46

METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA DETERMINACION

CUANTITATIVA DE SAPONINAS EN PLANTAS.

OBJETIVO

DETERMINAR EL CONTENIDO DE SAPONINAS EN PLANTAS, UTILIZANDO LA PROPIEDAD QUE TIENEN ESTAS SUSTANCIAS DE HEMOLIZAR LA SANGRE, PROPONIENDO PARA ESTO UN METODO QUE ES FACILMENTE REPRODUCIBLE Y QUE NOS CUANTIFIQUE EL CONTENIDO DE SAPONINAS.

INTRODUCCION

Las consideraciones que se tomaron en cuenta para la búsqueda de este método fueron las siguientes:

- 1.-Importancia de las saponinas como agentes tóxicos, ya que son capaces de hemolizar los glóbulos rojos de la sangre, además de otros efectos biológicos que tienen en animales.
- 2.-Dificultad en reproducir los métodos ya existentes por la imprecisión de estos para cuantificar el contenido de saponinas en plantas.

El método para la cuantificación de saponinas propuesto en este trabajo, es un método colorimétrico en el cual el % de hemólisis producido por una determinada cantidad de extracto de saponinas es medido como densidad óptica (D.O) y relacionado a una curva - estándar, la cual se obtiene graficando diferentes concentraciones de NaCl y la densidad óptica que se obtiene en un fotocolorímetro debido a las diferentes coloraciones que se obtienen del efecto hemolítico gradual que tiene una solución de NaCl sobre los glóbulos rojos de la sangre.

De aquí se parte para obtener una unidad arbitraria para la medición del contenido de saponinas de los extractos que se obtienen al hervir a reflujo una cantidad de la planta con etanol.

I. GENERALIDADES:

I.I. Definición, composición química y clasificación de las saponinas:

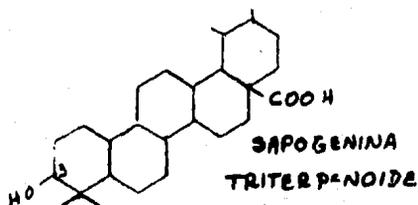
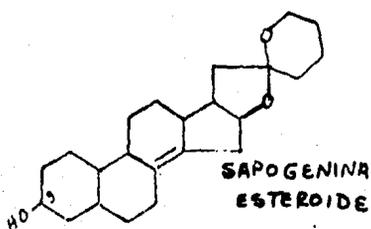
Las definiciones existentes sobre saponinas difieren fundamentalmente en el grado de detalle con el que se explica su naturaleza.

La definición que se expresa aquí se considera la más completa, obtenida de diferentes fuentes bibliográficas y se define como "glucósidos formados por una aglicona o sapogenina y diversos azúcares". La unión entre el azúcar y la aglicona se lleva a cabo en el carbono # 3 de la aglicona por un enlace heterocídico.

Los azúcares que forman las saponinas son pentosas especialmente d y l-arabinosa, d-xilosa, l-ramosa y quinovosa y también hay hexosas como d-glucosa, d-galactosa y ácidos d-glucurónico y d-galactourónico.

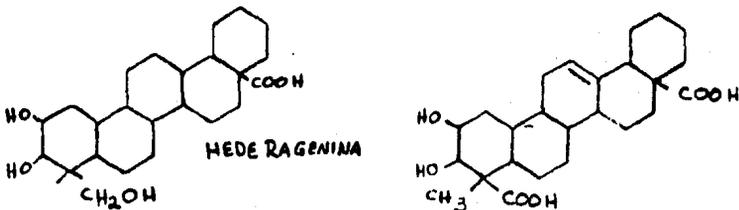
Esta porción glucídica puede constar de 1 a 5 moléculas de azúcar sencillo y en algunos casos la aglicona está combinada no con azúcar sino con un ac. urónico.

Por otra parte las agliconas o sapogeninas pueden ser del tipo esteroidal o triterpenoide.

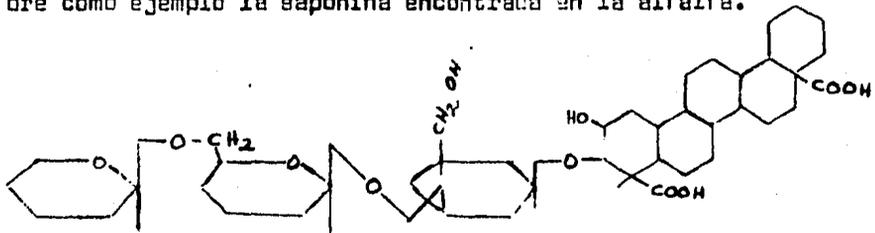


Las saponinas se encuentran en una extensa variedad de plantas; las que se encuentran en leguminosas son generalmente de tipo triterpenoide y generalmente son pentacíclicas. Existen diferentes estructuras aún dentro de una misma planta, la que más ha sido estudiada son las dos variedades de alfalfa y se ha observado que contienen hasta 25 saponinas diferentes tanto en composición química como en cantidad.

Gestetner aisló una saponina de la alfalfa biológicamente activa, el ac. medicagenico 3-O-triglicosido y observó la diferencia estructural de otra saponina de la alfalfa llamada hederagenina, la primera tiene actividad hemolítica y la segunda no, y su diferencia estructural es un grupo COOH en el carbon 23 del ac, medicagenico en vez de un grupo CH₂OH en la hederagenina.



Para mostrar lo que sería la estructura de una saponina pondré como ejemplo la saponina encontrada en la alfalfa.



la cual está compuesta por una cadena de azúcares (hexosas) y la saponina aglicona.

Bibliografía usada en este subcapítulo: 1, 2, 3, 4.

I.2. Distribución de las saponinas.

Las saponinas se han encontrado en diversas partes de vegetales, tales como raíces, tubérculos, hojas, flores, semillas y frutos.

Las saponinas triterpenoides son más abundantes en la naturaleza ya que las plantas presentan con frecuencia cantidades considerables de este tipo de saponinas. Abundan en las familias de las dicotiledoneas, especialmente en las careofiláceas, sapindáceas, fituláceas, poligaláceas, sapotáceas, quenopodiáceas, ranunculáceas, berberidáceas, papavaráceas, lináceas, cigofiláceas, rutáceas, mirtáceas compuesta, etc.

Las saponinas esteroides son menos abundantes en la naturaleza y se encuentran en las familias de las monocotiledoneas, especialmente en las diocoreas, amarilidáceas y liláceas. Como plantas representativas de estas familias se menciona la diocorea sp., el agave, la yucca y trillium.

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas de importancia en la agricultura y en particular en leguminosas utilizadas como forraje (Ejemplo: alfalfa).

A continuación se señalan algunas de las cantidades de saponina triterpenoide encontrada en plantas.

Planta	% saponina triterpenoide
Raíz de Primula	5 - 10
Raíz de Regaliz	2 - 12
Corteza de Quilaya	10 (Saponina Comercial)
Semilla de Castaño de Indias	13

La bibliografía usada en este subcapítulo es la siguiente: 2,4,5.

I.3. Características de las saponinas.

Entre las características más importantes encontradas en la bibliografía de las saponinas, se encuentran las siguientes: son sustancias blancas, amorfas, sabor amargo e irritante, muy solubles en agua y alcoholes de bajo peso molecular. En agua forman soluciones coloidales que al ser agitadas producen intensa espuma, actúan como sustancias tóxicas cuando se inyectan en el torrente sanguíneo, por su acción hemolítica, disminuyen la tensión superficial, forman complejos con proteínas y lípidos (Ej. colesterol.), son tóxicos para los animales de sangre fría

Note: bibliografía usada es6

I.4. Importancia y Usos

Las saponinas producen importantes efectos biológicos. Las de tipo esteroidal son importantes por su relación con compuestos tales como las hormonas sexuales, cortisona, vit. D y heterosidos cardiacos.

Las sapogeninas naturales difieren en composición química de los heterosidos cardiacos tan solo por su configuración en 3,5,25.

Las sapogeninas esteroides tienen gran aceptación para la síntesis parcial de cortisona y hormonas sexuales, ya que la síntesis total de estos es larga y costosa, por lo que se prefiere la utilización de esteroides naturales.

Las saponinas son empleadas también como aditivos para alimentos y bebidas. Se ha empleado en U.S.A. extractos de Quillaja saponaria, que contiene saponinas como correctores de sabor.

A causa de su capacidad para formar espuma duradera se emplean las saponinas en la cerveza y otras bebidas.

Las saponinas también son usadas para emulsionar las grasas, como deterosivos en la industria, en la composición de jabones de afeitar, champues, líquidos extintores de incendios, etc.

Fuente: 3,4,6,7.

I.5. Aislamiento de saponinas

Las saponinas son sustancias muy polares y es posible extraerlas en frío o en caliente con agua o alcoholes de bajo peso molecular.

Las plantas contienen más de una saponina y su purificación es por lo general difícil, incluso las estructuras de algunas de ellas, aunque han sido estudiadas ampliamente, no se han establecido por completo.

Recientemente se ha demostrado que las saponinas de tipo esteroide se forman a partir del colesterol.

Para la obtención de las saponinas se hace una hidrólisis de la materia prima, la cual puede hacerse con sus propias enzimas naturales, con enzimas de origen microbiológico o por una hidrólisis ácida con ac. clorhídrico o ac. sulfúrico.

Bibliografía usada4,5.

I.6. Efectos biológicos de las saponinas

En este subcapítulo se describen los efectos biológicos que tienen las saponinas, especificando cada uno de ellos.

4.6.a. Efecto hemolítico

Este es uno de los más característicos de las saponinas el cual se toma como base en la mayoría de los métodos para la determinación cuantitativa de saponinas. Este trabajo también utiliza este efecto como base de medición.

La actividad hemolítica de las saponinas se atribuye a su interacción con el colesterol de la membrana, aunque se ha observado que ciertas proteínas hemolíticas, así como las saponinas, participan comúnmente en el mismo sitio de la membrana del eritrocito y este sitio es el colesterol.

Shany observó que el tratamiento de la membrana con uno de estos agentes previene la unión del otro.

La experimentación realizada hasta ahora ha permitido determinar relaciones entre diferentes variables y el grado de hemólisis generado por las saponinas, fundamentalmente se ha demostrado que los concentrados de saponinas pierden gran parte de su actividad hemolítica por calentamiento.

La alfalfa es la planta que más ha sido estudiada en cuanto a efectos de las saponinas contenidas en ella, a partir del estudio de las saponinas de esta planta y sus efectos hemolíticos se han hecho determinaciones importantes:

- Se afirma que el Ac. Medicagenico, que es una aglicona

contenida en la alfalfa es el responsable de la relativamente alta actividad hemolítica de esta planta(1,9)

- Jones mostró que existen diferentes cantidades de saponinas dentro de la planta de alfalfa, se comprobó que existe diferente grado de hemólisis entre el extracto de la hoja de alfalfa y el tallo de la misma. Se cree que la actividad hemolítica en la saponina de la alfalfa se debe en su mayor parte al contenido de ac. medicagenico, pero también a la proporción azúcar/sapogenina. La saponina encontrada en la alfalfa (*Medicago Sativa*) es muy similar a la encontrada en la soya, ya que la diferencia es de dos grupos carboxilos, pero se explica su inactividad hemolítica de la soya, por la proporción azúcar/sapogenina, siendo más alta en la alfalfa (5:1) que en la soya (1:1) (1).

Existe también otra teoría acerca de la no lisis de globulos rojos por parte de las saponinas de la soya y es que su actividad se ve inhibida por una proteína que se encuentra en la misma soya (seroalbumina). También otros estudios demuestran que el calentamiento de la saponina de la soya provoca que su actividad hemolítica se reduzca. (8)

Ewart clasifico la susceptibilidad de los eritrocitos a las saponinas de un numero de especies como sigue: Conejillo de Indias, Caballo Ferro, ratas, conejo hombre, cerdo cabra, oveja, ganado vacuno (1).

1.5.b. Efectos en el crecimiento.

El mecanismo bioquímico de depresión del crecimiento causado por saponinas no ha sido identificado pero se cree que pueda ser el resultado de una inhibición enzimática celular (1).

También se sugiere que la depresión de crecimiento se deba a la inhibición de enzimas digestivas, lo cual haga - que disminuya la digestibilidad de ciertos nutrientes (9).

Se ha observado que la inhibición de crecimiento se puede ver contrarrestada por varios agentes como son:

- Taninos: Contrarrestan el efecto inhibitorio que causan las saponinas. Una mezcla saponina-tanino elimina la toxicidad de ambos.
- Adición de colesterol a la dieta de animales monogástricos.

1.6.b.1. Efectos de crecimiento en plantas y semillas.

Se ha informado que las saponinas tienen efectos en el crecimiento de plantas y semillas.

Dependiendo del tipo de saponinas se ha visto que hay inhibición en cereales, por ejemplo la saponina encontrada en alfalfa (Var. Medicago Lupulina) inhibía el crecimiento del trigo, cebada, avena y centeno y utilizando las mismas concentraciones de saponina pero con diferente variedad (Var. Medicago Media) se afectó el crecimiento de cebada, avena, asimismo inhibieron parte del crecimiento de centeno, pero no afectó al trigo.

Marchain mostró que las saponinas de la alfalfa inhibían

la germinación de la semilla de algodón, detectando que actuaban sobre la superficie, no en el embrión de la semilla. También demostró que hay decremento en la respiración de la semilla cuando esta está en contacto con la saponina, ya que hay cambios estructurales de la membrana que hace que se vea afectada la permeabilidad al oxígeno.

1.5.b.2. Efecto en el crecimiento de hongos y otros microorganismos.

Horber (1974) demostró inhibición en el crecimiento de *Trichoderma Viride* usando las saponinas de la alfalfa y observó asimismo que otros quince microorganismos son también sensitivos a estas saponinas, lo cual puede ser benéfico, ya que se protege a la alfalfa (raíz y tallo) del ataque de microorganismos del suelo. (1)

Algunos investigadores sugieren que el efecto fungicida de las saponinas se debe a su interacción con el colesterol de la membrana del microorganismo.

Gestenter mostró que el ac. medicagenico (aglicona o saponina) es responsable en parte del efecto antifungal, pero que existen otras estructuras que contribuyen a este efecto. (9)

Se demostró que el efecto antifungal puede ser contrarrestado mediante la adición de colesterol y de 7-dihidrocoesterol pero no por ergosterol, en el medio de cultivo.

1.5.b.3. Efectos de crecimiento en monogástricos y rumiantes

Las saponinas que han sido estudiadas para la demostración de efectos de crecimiento en monogástricos y rumiantes ha sido la alfalfa, y se ha demostrado que 0.1 % de saponina de alfalfa es suficiente para causar depresión del crecimiento en pollos.

La respuesta de la cantidad de saponinas sugerida es más sensitiva en aves de corral que en otros monogástricos como se muestra en el cuadro(*)

Animal	saponina ingerida (%)	Depresión de crecimiento
Rata	2 a 3	+
Conejos	2	-
Conejillo de indias	2	-
Pollos	0.1 a 0.2	+

El efecto depresor del crecimiento por consumo de alfalfa en pollos puede ser controlado suplementando la dieta con 1% de colesterol. (11, 12)

En rumiantes, no se observa efecto depresor de crecimiento.

Las semillas de soya no tienen ningún efecto retardante del crecimiento en ratas, ratones y gallinas. (3)

1.6.c. Efectos en sangre y niveles de colesterol en tejido.

Se ha observado que en animales monogástricos, alimentados con saponinas de la alfalfa o dieta con saponinas, se observa una reducción del colesterol en tejidos, mien

* Tomado de fuente bibliográfica (2)

tras que en rumiantes, el efecto es pequeño.

Se mostró que las saponinas forman complejos insolubles con el colesterol, lo cual hace suponer que administrando una dieta con saponinas disminuya el colesterol de la sangre, porque de esta manera se evite su reabsorción. Esto ha sido probado en pollos, ratas y monos (13, 14).

Malinow sugiere que las saponinas pueden constituir un instrumento de terapéutica importante para combatir la colesterolemia en humanos, esta conclusión está amparada en el hecho de que la saponina de la alfalfa es tolerada por ratas y monos, además de que el hombre tiene mucho tiempo consumiéndolo pequeñas cantidades de saponinas en diversas plantas. (14)

1.6.d. Flatulencia en rumiantes.

Los trabajos realizados por Mangon y Mc. Artur (1964, 1966, 1969, 1970) sobre la flatulencia en rumiantes puede resumirse como sigue: (2)

1. Presencia de agentes inflamatorios en la ingestión de forraje (saponinas).
2. Vigorosa producción de gas en el rumen
3. pH ácido favorable para la flatulencia.
4. Disminución de agentes antifatulentos naturales.
5. Presencia de cationes relacionados con la flatulencia.

Se han observado otros efectos relacionados con la flatulencia:

- Inhibición en la eructación.
- Efectos directos en el sistema nervioso central.

1.5. Inhibición de la actividad enzimática.

Las saponinas están relacionadas con el metabolismo energético, desde el punto de vista enzimático esto puede - dar la explicación para los síntomas de toxicidad que - presentan los animales monogástricos por la ingestión de plantas que contienen saponinas.

Tiene más importancia el efecto inhibitor de enzimas relacionadas al ciclo del ac. cítrico, lo cual puede tener efectos en la eficiencia de la utilización de nutrientes y en el crecimiento de animales (1).

Se demostró que las saponinas contenidas en la soya inhibían la actividad proteolítica de la larva *Tribolium Castaneum* (in vitro), también inhibían la actividad - de tripsina y quimotripsina (8).

Further explicó que las saponinas son la causa de la inhibición respiratoria, lo cual fué también demostrado - por Cheeke en 1970, estableciendo que la saponina inhibía in vitro la oxidación del succinato (intermediario del ciclo de krebs) en ratas. (1)

Estos efectos en la actividad enzimática del metabolismo celular dan una explicación de los efectos nocivos en - crecimiento.

1.6.f. Inhibición de la actividad del músculo liso.

Sobre este efecto se tiene poca información, aunque en general está relacionado con algunos de los efectos antes mencionados causados por saponinas.

Lo más importante demostrado en relación con este efecto

es lo observado por Lindeh en 1957 en el sentido de que una administración intrarumial, así como intravenosa de saponina da como resultado una reducción en la movilidad del rumen (2).

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.a. DETERMINACION INICIAL DEL METODO.

El metodo inicial está basado en las técnicas usuales para la cuantificación de saponinas (13, 21) en los cuales se utilizan saponinas semipurificadas en la curva estandar de un método colorimétrico.

Las variaciones iniciales propuestas para el diseño de un nuevo método, fueron probadas durante la experimentación hasta encontrar los procedimientos más adecuados para la determinación de saponinas.

Las primeras variaciones hechas a los metodos encontrados a partir de fuentes documentales fueron las siguientes:

1. Tipo de extracción utilizada para obtener el extracto de saponina.
2. Utilización de una sustancia como es el NaCl en solución para obtener una curva estandar (graficando hemólisis contra concentración de NaCl) en el método colorimétrico, en la cual se pueda interpolar el valor de hemólisis producido por el extracto de saponinas de una determinada planta, proponiendo unidades arbitrarias para su medición, lo cual permite, - que el método sea fácilmente reproducible
3. Se propone una serie de diluciones del extracto de saponinas para su cuantificación evitando de esta manera estar concentrando o diluyendo el extracto para obtener una lectura en el fotocolorímetro.

Con estas variaciones hechas a los metodos obtenidos de fuentes bibliograficas el método inicial se resume así:

FUNDAMENTO

La técnica inicial está basada en la propiedad que tienen las saponinas de hemolizar los globulos rojos de la sangre, por la interacción de las saponinas con el colesterol de la membrana del eritrocito, lo cual provoca una salida del pigmento hemoglobina, el cual se lee en el espectrofotómetro por la coloración roja que produce.

El NaCl utilizado en esta técnica puede producir el mismo efecto de hemólisis dependiendo de las concentraciones utilizadas.

Preparación de los extractos de saponinas obtenidas de diferentes plantas.

En un cartucho de celulosa para extracción de grasas son puestos 2 grs. de la planta secada y molida finamente. A continuación se hierve a reflujo con 40 ml de etanol al 80% en un aparato para extracción Goldfish durante 30 min. El extracto ya frio se afora a 50 ml.

Preparación de los eritrocitos.

Se desfibrinan 10 ml de sangre con perlas de vidrio. La sangre ya desfibrinada es lavada con solución de NaCl al 0.9 % (solución isotónica) y centrifugada con el fin de eliminar la hemoglobina libre que haya por los globulos rojos que se hanzaron con el manejo de la sangre. La sangre es lavada y centrifugada las veces necesarias hasta que el sobrenadante este claro e incoloro, lo cual indica ausencia de hemoglobina libre.

El paquete de eritrocitos obtenido se diluye 1:4 en solución salina 0.9% con agar al 0.06% .

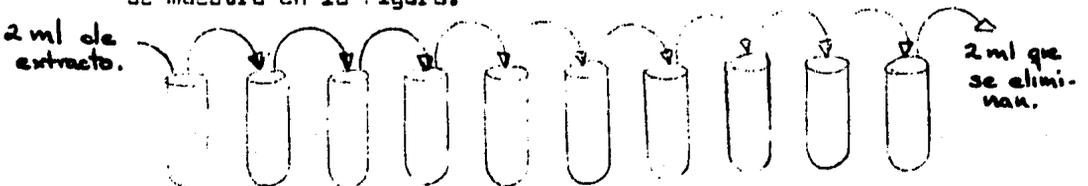
Procedimiento para cuantificar las saponinas presentes en los extractos.

Preparación de la curva estandar: A once tubos que contienen concentraciones de NaCl que van desde 0.1 a 0.9 % NaCl se adiciona 1 ml de la suspensión de globulos diluidos 1:4 y 2 ml de agua desionizada, se agita suavemente y se deja en reposo durante 30 min. Se centrifuga a 2000 rpm durante 15 min. y se lee la hemoglobina libre en el espectrofotómetro a 540 nm, en el espectro visible. El tubo que contiene 0.9 % de NaCl se toma como testigo.

Cuantificación de las saponinas contenidas en los extractos.

Se preparan una serie de diluciones con el extracto de la siguiente manera:

Se ponen diez tubos o más que contengan 2 ml de agua desionizada. Se adiciona al primer tubo 2 ml del extracto de saponinas, se agita bien y se toma de este tubo 2 ml de esta dilución que se pasan al segundo tubo que contiene también 2 ml de agua desionizada, se mezcla bien y se toman 2 ml de la dilución que se pasan al tercer tubo y así sucesivamente como se muestra en la figura.



Los tubos contienen 2 ml de agua desionizada.

Una vez hechas las diluciones se añaden a cada tubo 5 ml de solución salina 1.25 % y 1 ml de la suspensión de globulos rojos, se deja reposar 30 min, posteriormente se centrifuga a 2000 rpm. durante 15 min. y se lee el porcentaje de transmitancia en el espectrofotometro a 540 nm.

Nota.- Se hace la conversión de porcentaje de transmitancia a Densidad Optica en todos los casos.

II.b. Variables manejadas para ajustar el método inicial:

Los parametros que se variaron dentro del método se fueron ajustando uno por uno hasta obtener un resultado optimo en cada uno de ellos.

A continuación se describiran los parametros y la forma como se ajustaron.

1. El primer cambio que se propone es en la preparación de los eritrocitos. El método inicial propone una defibrinación de la sangre lo cual sirve para evitar la coagulación. Se considera que este método no es el más eficiente ya que si la agitación con perlas de vidrio no es constante y suave, puede coagularse la sangre o hemolizarse los eritrocitos.

Por estas razones se propone usar un anticoagulante, citrato trisodico que fué usado en una tecnica de cuantificación de saponinas, que actua como secuestrante de calcio y de esa manera evita la coagulación. La preparación de este anticoagulante es la siguiente:

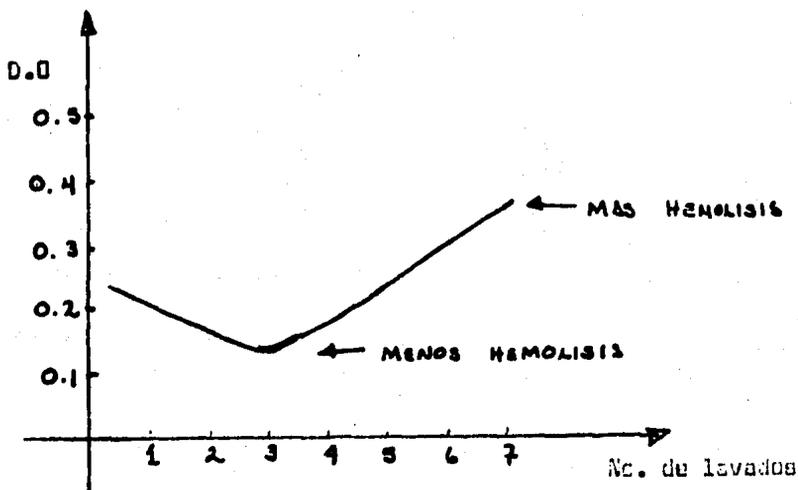
Citrato trisodico	2.2 gr	} 100 ml
Ac. Citrico	0.9 gr	
Dextrosa	2.45 gr	

Usar 15 ml por cada 100 ml de sangre

2. En la preparación de los glóbulos rojos, el método inicial propone una serie de lavados para eliminar los globulos rojos que fueron hemolizados. A la sangre se adicionaba aproximadamente 10 ml de NaCl 0.9 % , se agitaba y centrifugaba. El sobrenadante contenía una determinada cantidad de hemoglobina libre debido a los glóbulos rojos que se hemolizaron con el manejo. Para establecer la cantidad de hemoglobina que quedaba libre despues de varios lavados, en el sobrenadante que quedaba se media la densidad optica, se hacian después nuevos lavados y a cada uno de los sobrenadantes se le media su densidad óptica. Originalmente se pensó que se iba a obtener un valor constante de D.O. pero no sucedió así, sino que el valor de D.O iba aumentando gradualmente a partir del tercer tubo (se toma D.O = 0 en donde no hay hemolisis) lo cual se explica debido a que después de varios lavados los eritrocitos que dan sensibles y son facilmente hemolizados con el solo manejo.

FIGURA # 1

Sensibilidad de los globulos rojos con respecto al numero de lavados con NaCl 0.9 %



3. Ajuste del rango de concentración de NaCl con el que se -
trabajaría para lo cual se hizo na curva estandar con diferen
tes concentraciones de solución salina para obtener las lectu
ras de D.O. en el espectrofotómetro.

Para no hacer la descripción de cada peso se presenta el siguien
te resumen en la tabla No. 1

TABLA # 1

Tubo	5 ml % NaCl	ml Susp. de globulos. dilución 1:4	ml Agua Desionizada	% T	Densidad Optica
1	0.1123	1	2	1.5	1
2	0.191	1	2	1.3	1
3	0.27	1	2	1.5	1
4	0.3487	1	2	1.5	1
5	0.4275	1	2	2.0	1
6	0.506	1	2	8.0	1
7	0.585	1	2	82.0	0.086
8	0.6637	1	2	97.0	0.013
9	0.7425	1	2	97.0	0.013
10	0.8212	1	2	97.0	0.013
11	0.9	1	2	100.0	0.0 Tes tigo.

Según la tabla, la hemólisis total se presenta desde el tubo número uno, pero para poder obtener la medición de hemólisis como D.O., se ve que es significativa en los tubos 6 y 7 por lo que para obtener un valor gradual de D.O. que nos represente una hemólisis gradual se deben tomar concentraciones de NaCl que estén dentro de ese rango.

La siguiente prueba se realizó dentro del rango que nos daba una lectura gradual de D.O., la cual se muestra en la tabla No. 2 .

TABLA # 2

Tubo	% NaCl (5 ml)	ml de agua desionizada	ml de sus- pensión de eritrocitos dilución 1:4	% T	D.O
1	0.5062	2	1	2.0	Mayor de 1
2	0.545	2	1	18.5	0.733
3	0.5535	2	1	17.5	0.757
4	0.5692	2	1	42.0	0.377
5	0.5605	2	1	60.5	0.2185
6	0.6007	2	1	75.0	0.125
7	0.6165	2	1	88.5	0.0535
8	0.624	2	1	92.0	0.036
9	0.9	2	1	Testigo	0.0

Se hicieron varias curvas estándar iguales a las de la tabla No. 2 pero se observó que los valores de D.O. a una misma concentración de NaCl tenían variaciones muy grandes, cuando las de-

más condiciones se mantenían constantes. Se pensó que esta situación podría deberse a que el paquete de eritrocitos quedaba unas veces más compacto que otras, por lo que se propuso hacer una dilución que fuera medible para que la concentración de eritrocitos fuera constante.

La dilución que se hacía originalmente quedaba muy concentrada por lo que al poner el tubo en el espectrofotómetro no dejaba pasar la luz y por lo tanto se obtenía una lectura equivocada de 0 % de T, lo cual no nos daba la indicación necesaria. En consecuencia se realizó una dilución mayor, tomando un número arbitrario dentro del rango del espectrofotómetro que fué de 26.0 ± 0.5 % T a 750 nm. por lo que para obtener esta lectura había que diluir la sangre con solución salina 0.9 % con agar al 0.08 %. Por cada ml del paquete ya compacto se adicionaban aproximadamente 80 ml de la solución de NaCl 0.9% con agar al 0.08%. De esta manera se realizaron nuevas curvas estándar en las cuales las variaciones presentadas no fueron tan grandes dentro de una misma concentración de NaCl. Los resultados se muestran en la tabla No. 3.

TABLA # 3

tubo	% NaCl (5 ml)	Agua desioniza da (ml)	ml de susp. de eritrocí tos. 26 % T	Diferentes curvas estand.		
				0.0	0.0	0.0
1	0.4968	2	3	0.462	0.4755	0.441
2	0.522	2	3	0.319	0.3925	0.377
3	0.5472	2	3	0.229	0.226	0.244
4	0.5724	2	3	0.161	0.155	0.1775
5	0.597	2	3	0.041	0.108	0.0995
6	0.6228	2	3	0.009	0.041	0.004
7	0.9	2	3	0.0	0.0	0.0

5.- Hasta este momento, 1 ml del paquete de globulos que fué lavado y centrifugado era diluido en aproximadamente 80 ml de solución salina 0.9 % con agar al 0.08 %. Esta solución con agar, tenía la ventaja que los eritrocitos podían trabajarse sin mucho cuidado y no había hemolisis en ellos, el problema que existía ahora era el manejo de esta suspensión ya que el agar tapaba las pipetas y la medición de los 3 ml de esta suspensión para hacer la curva estándar no podía ser tan exacta o había que repetir muchas veces la misma operación en los tubos hasta que quedara exacta.

Se empezó a trabajar con una solución salina menos concentrada en agar (al 0.04 %) para no eliminar por completo la ayuda que proporcionaba el agar y resultó que el manejo de la suspensión de glóbulos rojos fué más sencilla, aunque la protección que tenían los eritrocitos disminuyó, ahora había que trabajarlos con más cuidado.

Las curvas estándar que se obtuvieron variando esta solución salina con agar no fueron diferentes a las anteriores ya que la D.O obtenida a una concentración de NaCl era similar al promedio obtenido de la tabla No. 3.

Como se mencionó en la técnica inicial, la extracción de las saponinas de la planta se lleva a cabo con etanol al 80 %. Se utilizan 2 ml de este extracto para hacer la cuantificación de saponinas.

Hasta ahora, en la curva estándar se han introducido casi todos los parámetros usados ya en la técnica para la cuantificación de saponinas.

El alcohol al 80 % proveniente del extracto no se ha puesto para la realización de la curva estándar, en vez de los 2 ml de etanol al 80 % usados en la técnica donde se hace la cuantificación de saponinas se utilizaron 2 ml de agua desionizada.

Lo que se trata de determinar es la influencia que tiene el etanol al 80 % en la hemólisis de los eritrocitos causada por las diferentes concentraciones de NaCl.

De los resultados que se obtienen se deduce el el alcohol tiene un efecto protector de los eritrocitos, ya que la hemólisis total que se presenta en la curva estándar utilizando 2 ml de agua desionizada proveniente del extracto, se presenta a una concentración de 0.5 % de NaCl, mientras que utilizando 2 ml de etanol al 80 % la hemólisis total se presenta al 0.4 % de NaCl.

En la tabla No. 4 y tabla No. 5 se muestran los resultados obtenidos.

TABLA # 4

CURVA ESTANDAR UTILIZANDO AGUA.

tubo	(5 ml) % NaCl	ml de agua	ml. susp eri- trociticos 26 % T	D.O
1	0.4968	2	3	0.4755
2	0.522	2	3	0.3925
3	0.5472	2	3	0.226
4	0.5724	2	3	0.155
5	0.597	2	3	0.108
6	0.6220	2	3	0.041
7	0.9	2	3	0.000

TABLE # 5
CURVA ESTANDAR UTILIZANDO ETANOL AL 80 %

tubo	(5 ml) % NaCl	ml de etanol al 80 %	ml de susp de eritrocitos ajust. 26 % T	D.O
1	0.4212	2	3	0.4085
2	0.4464	2	3	0.469
3	0.4716	2	3	0.426
4	0.4968	2	3	0.194
5	0.522	2	3	0.119
6	0.547	2	3	0.122
7	0.572	2	3	0.097
8	0.9	2	3	0.0

Esto se hace a un tiempo constante de contacto de los eritrocitos con el NaCl de 30 min., centrifugando a 2000 rpm. durante 15 min.

7.- El siguiente punto a corregir fué el porcentaje del disolvente que se utiliza para la extracción de una muestra de leguminosa llamada GUINOLO para lo cual se hizo lo siguiente:

2 g de Guinolo se extrajeron sus saponinas con 40 ml de etanol al 30, 50 y 80 %, se hirvieron a reflujo durante 30 min. en un aparato Gold-Fish (Labconco) y el extracto se aforó a 50 ml y se encontró lo siguiente (Tabla no. 6)

TABLA # 6

GUINOLO EXTRAIDO CON ETANOL AL 30 %

tubo	Dilución	ml de NaCl 1.26 %	ml. de susp. de eritrocitos	O.D
1	Sin diluir	5	3	0.222
2	1:1	5	3	0.013
3	1:2	5	3	0.009
4	1:4	5	3	0.009

GUINOLO EXTRAIDO CON ETANOL AL 50 %

tubo	Dilución	ml de NaCl 1.26 %	ml. de susp. de eritrocitos	O.D
1	Sin diluir	5	3	0.319
2	1:1	5	3	0.046
3	1:2	5	3	0.027
4	1:4	5	3	0.027

GUINOLO EXTRAIDO CON ETANOL AL 80 %

Tubo	Sin diluir	ml de NaCl 1.26 %	ml. de susp. de eritrocitos	O.D
1	Sin diluir	5	3	0.5155
2	1:1	5	3	0.100
3	1:2	5	3	0.032
4	1:4	5	3	0.027

según los cuadros anteriores la extracción es más eficiente con etanol al 30 % ya que se considera que entre más saponina haya, será mayor el grado de hemólisis.

En las condiciones en que se trabajó se considera que los 3 ml de suspensión de globulos, hemolizados totalmente dan una lectura en el espectrofotómetro de 0.47 a 0.52 de D.O., así que tomando la dilución del extracto 1:1 en los tres tipos de extracción se vé que en la extracción con etanol al 80 % el valor obtenido de D.O. (0.103) es mayor que el obtenido en etanol al 30 y 50%.

3. Una vez que se tiene la concentración ideal del disolvente para extraer las saponinas de una planta (Etanol al 80 %), se procede a determinar el tiempo de extracción o sea el tiempo en que se hierve a reflujo la muestra en el etanol al 80 % , para lo cual se hace lo siguiente:

A 2 g de muestra (Leguminosa Palo de Fierro) se añaden 40 ml de etanol al 80 % y se hierve a reflujo por 2 hrs., se enfría el extracto y se afora a 50 ml. Del extracto se toman 2 ml y se hacen diluciones. A cada tubo con la dilución se añaden 5 ml de NaCl 1.25 % y 3 ml de la suspensión de glóbulos rojos, se mezclan suavemente y se dejan en reposo 30 min., se centrifugan durante 15 min. a 2000 rpm. y se lee el sobrenadante a 540 nm, tomando como testigo un duplicado de este proceso sin añadir a cada tubo la suspensión de glóbulos rojos y en vez de eso añadir 3 ml de agua desionizada.

Este proceso se repite variando el tiempo de extracción y los resultados obtenidos se muestran en la table no. 7

TABLA # 7

DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE EXTRACCION DE SAPONINAS

Tubo	dilución	ml de NaCl 1.26 %	ml. susp. glóbulos	2hrs. ex tracción D.O	3hrs. ex tracción D.O	4hrs. ex tracción D.O.	6hrs. ex tracción D.O.	20hrs. extrac. D.O
1	1:1	5	3	0.523	0.523	0.538	0.523	0.523
2	1:2	5	3	0.509	0.533	0.523	0.523	0.523
3	1:4	5	3	0.523	0.523	0.523	0.538	0.538
4	1:8	5	3		0.523	0.523	0.538	0.538
5	1:16	5	3		0.2426	0.402	0.523	0.538
6	1:32	5	3		0.061	0.0995	0.114	0.1092
7	1:64	5	3		0.013	0.056	0.046	0.046

Nota: Las lecturas superiores 0.5 D.O. corresponden a hemólisis total.

En la dilución 1: 32, ya no hay cambio en D.O. a partir de las 4 hrs. de extracción, por lo que se propone que el tiempo de extracción para las saponinas contenidas en plantas sea precisamente de 4 hrs, de esta manera se asegura que en ese tiempo todas las saponinas contenidas en plantas son extraídas.

9. Una vez que se ha obtenido el tiempo de extracción se propone obtener el tiempo de contacto de los glóbulos rojos con el NaCl para que se lleve a cabo la hemólisis completa de los eritrocitos con el NaCl presente en el agua y de esa manera poder medir la hemólisis total producida por las saponinas de los extractos de las plantas.

Lo que se hizo fué lo siguiente:

Se tomaron 5 ml de NaCl a una misma concentración de NaCl y se pusieron en un tubo de centrifuga, se adicionaron 2 ml de etanol al 80 % y 3 ml de la suspensión de glóbulos rojos, esto se llevó a cabo por triplicado, para así obtener un promedio del valor de densidad optica que produce la hemólisis de eritrocitos, se dejaron 30 minutos en contacto, se centrifugaron 15 minutos a 2000 rpm y se leyó el sobrenadante a 540 nm. De esta prueba se hicieron otras a diferentes tiempos de contacto (cada 30 minutos). En la tabla # 8 se muestran los resultados obtenidos:

TABLA # 8

D.O. A DIFERENTES TIEMPOS DE CONTACTO A UNA MISMA CONCENTRACION DE NaCl.

Tubo	NaCl %	ml Etanol 80%	ml susp. Glóbulos	30' D.O	60' D.O	1:30' D.O	2 hrs. D.O	2:30' D.O	3 hrs D.O
1	0.522	2	3	0.066	0.1238	0.222	0.2448	0.2592	0.2965
2	0.522	2	3	0.066	0.1032	0.1926	0.268	0.345	0.346
3	0.522	2	3	0.071	0.0945	0.1905	0.284	0.357	0.367
Blanco	0.9	2	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
\bar{X} prom.				0.067	0.1071	0.2017	0.2656	0.3204	0.3365

Cont. Tabla # 8

Tubo	3:30' D.O
1	0.310
2	0.3225
3	0.2965
Blanco	0.01
\bar{X} prom.	0.313

Se saca la desviación estandar y se grafica para ver a que tiempo no hay cambio significativo. Se puede ver en la grafica No. 1 que a las 2:30 Hrs., ya no hay diferencia significativa en el grado de hemólisis.

II.c. Metodo Ajustado:

Después de haber descrito las variaciones al método inicial, se presenta a continuación, el método ya ajustado, con las condiciones optimizadas.

2 g de la planta secada y molida finamente, son puestos en un -- cartucho de celulosa para extracción de grasas, se hierve a reflujó con 40 ml de etanol al 80 % en un aparato para extracción GOLD-FISH (Labconco) durante 4 hrs. El extracto se afora a 50 ml.

- Preparación de los eritrocitos.

10 ml de sangre se reciben en un matraz que contenga 1.5 ml de citrato trisódico como anticoagulante, la sangre es lavada con solución de NaCl 0.9 % (solución isotónica) y se centrifuga por tres veces de la misma forma.

Después del último lavado, se retira el sobrenadante y el paquete de eritrocitos se resuspende en solución de NaCl 0.9 % con agar al 0.04 % (por cada ml del paquete de eritrocitos ya compacto se adicionan aproximadamente 80 ml de la solución salina con agar.)

Se mezcla suavemente y en una celda de 10 x 75 mm especial para espectrofotómetro se adiciona la suspensión de eritrocitos y se lee lo que registra el espectrofotómetro a 750 nm (espectro infrarrojo). Esta lectura debe ser de 25.0 ± 0.5 % de Transmisión. En caso de no ver así se adiciona más solución salina con agar hasta obtener esta transmisión.

- Procedimiento para cuantificar las saponinas presentes en los extractos.

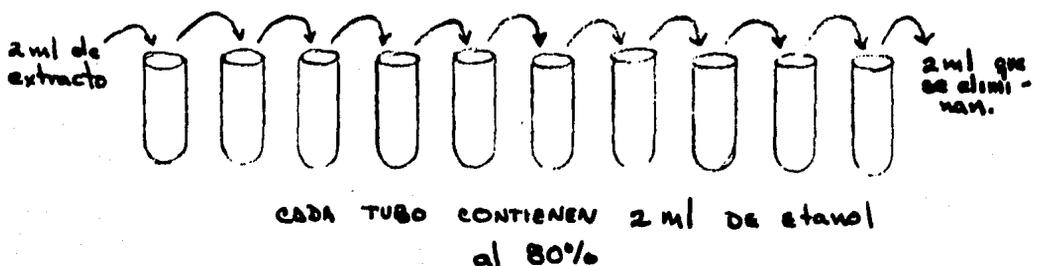
PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR:

A 8 tubos de ensaye, se adiciona solución de NaCl para obtener concentraciones de NaCl del orden de 0.4968, 0.522, 0.5472, 0.5724, 0.597, 0.6228, 0.648 y 0.9, a obtener un total de 5 ml de estas soluciones en cada tubo. Posteriormente se adicionan 2 ml de etanol al 80 % y se agita, despues se adicionan 3 ml de la suspensión de globulos ajustada. Se mezcla suavemente y se deja en reposo durante 2:30 hrs., después de ese tiempo se centrifuga 15 min y se lee la hemoglobina liberada en el espectrofotómetro a 540 nm (espectro visible). El tubo que contiene 0.9 % de NaCl se toma como testigo.

Cuantificación de las saponinas contenidas en los extractos:

Se prepara una serie de diluciones con el extracto de la siguiente manera:

Se ponen 10 tubos o más que contengan 2 ml de etanol al 80 %. Al primer tubo se adicionan 2 ml del extracto de saponinas y se mezcla bien, se toma 2 ml de este primer tubo y se pasan al 2o. tubo que contiene también 2 ml de etanol al 80 %, se agita bien y se toman nuevamente 2 ml de esta 2a. dilución y se pasan al 3er. tubo y así sucesivamente como se muestra en la figura.



Una vez hechas las diluciones se añaden 5 ml de la solución salina 1.26 % y 3 ml de la suspensión de glóbulos rojos ajustada a 26.0 ± 0.5 % de transmitancia, se agita suavemente y se deja reposar durante 2:30 hrs, se centrifuga después de ese tiempo a -- 2000 rpm durante 15 min y se lee el % de transmitancia en el espectrofotómetro a 540 nm.

III.- COMPROBACION EXPERIMENTAL DEL METODO

Para demostrar que el método funciona con cualquier tipo de planta que contenga saponinas, ya sea en grandes o pequeñas cantidades, se utilizaron 12 plantas y frutos, los cuales fueron secados a 50^oC y molidos finamente.

Las muestras utilizadas en este estudio se refieren a continuación en la tabla No. 9

TABLA # 9

NOMBRE DE LAS PLANTAS UTILIZADAS

Nombre común	Nombre científico
Semilla de Parota	Enterolobium Cyclocarpum,
Disiple	Senna Occidentalis L.
Alfalfa	Medicago Sativa
Barbasco	Dioscorea Composita
Leg. de Pto. Escondido	Senna Reticulata Willd
Yucca	Yucca Gloriosa
Mauto	Lysiloma Divericata
Maguey Pulquero	Agave Atrovirens
Retama	Senna Multiglandulosa
Guinze	Phaseolus Lunatus L
Tomatillo	Physalis Ixocarpa
Soya	Glicine Max

Con estas plantas se llevó a cabo la experimentación del método propuesto anteriormente

Para cuantificar el contenido de saponinas de la muestra se utiliza el espectrofotómetro, aparato cuyo fundamento y manera como funciona se explica a continuación:

El principio básico de los métodos de absorción consiste en comparar el grado de absorción o transmitancia de la energía radiante a una longitud de onda particular con una solución del material a cuantificar y una serie de soluciones patrón.

La selección de la longitud de onda se hace de tal manera que el material que interesa cuantificar absorba la luz a dicha longitud de onda, por lo que la absorción sufrirá un efecto mínimo por parte de las sustancias de interferencia.

La absorbancia es linealmente proporcional a la concentración del constituyente absorbente.

El espectrofotómetro funciona haciendo incidir diferentes frecuencias de radiación sobre un prisma, que las dispersa, produciendo el espectro de las longitudes de onda. Al ser seleccionada una longitud de onda determinada, la radiación dispersa incide sobre una superficie que tiene una rendija que solo deja pasar sobre la muestra la banda de emisión deseada.

La muestra absorbe una porción de la luz y el resto que no es absorbido incide sobre un detector, en donde se transforma en una señal eléctrica que se manda a un amplificador.

La absorbancia depende de la longitud de onda de la radiación y de la naturaleza del material absorbente.

La longitud de onda a la que se presenta una absorbancia máxima depende de la energía involucrada en una determinada transición electrónica.

III 1. RESULTADOS :

Los resultados obtenidos de la experimentación se sintetizan en dos cuadros I y II , los cuales presentan, el primero, 6 curvas estándar obtenidas según el método propuesto y que fueron ajustadas a una línea recta, después de un análisis de regresión, en un eje de coordenadas que representa en las ordenadas el % de NaCl y en las abscisas la densidad óptica, donde se observó que invariablemente las curvas resultantes eran lineales

Para hacer el ajuste de esas 6 curvas estándar, se utilizó la ecuación de la recta $y = mX + b$

y = Valor de las abscisas (D.D.)

m = Pendiente

X = Valor en las ordenadas (% de NaCl)

b = Intercepto

Los resultados de las 6 curvas estándar que se muestran en el cuadro I ya ajustadas, nos sirven para trazar la curva que se muestra en la figura no. 2 y que es el resultado del valor promedio de esas curvas estándar con su respectiva desviación estándar.

En el cuadro II se presenta la densidad óptica a diferentes diluciones originada por la hemólisis que producen los esponinas contenidas en las muestras.

III 2. DETERMINACION DE LA UNIDAD DE MEDIDA.

El hecho de que las curvas estándar resultantes de la experimentación fueron lineales y que se pudiera obtener de estas curvas una sola curva promedio con desviación estándar importante, faci-

Unió la determinación de la Unidad de Medida.

Dentro del rango de NaCl que se trabaja para hacer una curva estándar, se ve que con 0.55 % de NaCl (0.5472 \approx 0.55), se obtiene un valor medio de densidad óptica dentro del rango del espectrofotómetro, por lo que se toma este valor como la unidad de hemólisis, es decir, se va establecer que 0.55 % de NaCl equivalen a una Unidad de Hemólisis (U.H.)

Habiendo definido la unidad arbitraria, se interpola en la curva la densidad óptica obtenida de las muestras problema, tomando el primer punto de densidad óptica que pueda ser interpolado dentro de la curva estándar promedio. En la figura no. 3 se muestra un ejemplo.

Una vez hecha la interpolación se obtiene un valor de % de NaCl producido por la muestra problema y si se definió que:

0.55 % de NaCl equivalen a 1 U.H

X (Valor obtenido de la gráfica) $\frac{\quad}{\quad}$ Y

Esta es una regla de tres inversa debido a la curva que se presenta en la gráfica.

Las unidades de hemólisis así obtenidas se multiplican por la dilución correspondiente de la muestra. De esta manera se obtienen las Unidades de Hemólisis producidas por el extracto problema a esa dilución.

Ahora solo basta referir las Unidades de Hemólisis a los gramos de la planta que se están utilizando para esta cuantificación.

De los 2 g de muestra originales se llevaron a un aforo de 50 ml y de esos 50 ml, solo fueron utilizados 2 ml para hacer las diluciones. Esto se va a representar como sigue y nos indica la

cantidad de muestra que realmente utilize en la determinación.

2 g de muestra _____ 50 ml

X g de muestra _____ 2 ml

Y (Unidades de hemólisis) _____ 0.02 g

Z _____ 1.0 g

Z = Unidades de Hemólisis / g de muestra

Para evitar los pasos anteriores, se presenta a continuación una fórmula para calcular las Unidades de hemólisis por gramo de muestra.

$$\text{Unidades de hemólisis / g de muestra} = \frac{\text{Unidad de Hemólisis} \times \text{Dilución} \times \text{aforo original de la muestra}}{\% \text{ NaCl (Valor interpolado)} \times \text{g de muestra} \times \text{Aliquot}}$$

$$\text{Unidades de hemólisis / g de muestra} = \frac{0.55 \times \text{Dilución} \times 50 \text{ ml}}{\% \text{ de NaCl} \times 2 \text{ g} \times 2 \text{ ml}}$$

III.3. RESULTADOS EN UNIDADES DE HEMOLISIS OBTENIDOS DE LAS PLANTAS.

Los resultados en Unidades de Hemólisis obtenidos de plantas y frutos, así como de dos diferentes saponinas se muestran en la tabla no.9

TABLA No. 9

CONCENTRACION DE SAPONINAS EN 12 PLANTAS UTILIZADAS PARA PROBAR EL METODO

Nombre común	Valor de D.O. para interpolar en la curva	Valor interpolado % NaCl	U.H / g de muestra.
Parota	0.3325	0.50688	108.5
Cisiple	0.385	0.43042	57.2
Alfalfa	0.1196	0.60456	727.8
Barbasco	0.248	0.54468	6462.5
Leg. de Pto escondido	0.3903	0.47916	3673.0
Yucca	0.2824	0.52956	13284.0
Mauto	0.3118	0.51446	855.3
Maquey Pulquero	0.372	0.48924	14339.6
Retama	0.3953	0.47538	462.7
Guinze	0.1692	0.58248	94.4
Tomatillo	0.361	0.49302	1794.9
Soya	0.3881	0.43168	14615.5
Saponina esteroide	0.1926	0.56988	61767.3
Saponina Triterpenoide	0.2904	0.52704	133576.0

IV. DISCUSION

En el presente método se ajustaron las condiciones de algunas variables con el fin de hacer un método más aplicable a diferentes tipos de saponinas, a continuación se hace su discusión.

1. El uso de anticoagulantes en vez de la defibrinación de los glóbulos rojos con perlas de vidrio que se utilizan en el método original (21) mejora considerablemente los resultados de métodos que emplean este sistema, ya que se evita tanto la coagulación como la hemólisis de los glóbulos por efecto de la agitación.
2. En los lavados que se hacían a la sangre para eliminar la hemoglobina libre, se observó que después del tercer lavado, empezaba a aumentar la hemoglobina libre. La explicación que se dió a este fenómeno, fué que los eritrocitos se hacían más sensibles y se rompían más fácilmente debido al excesivo manejo y centrifugación de estos. Por estos motivos se propusieron tres lavados para eliminar la hemoglobina libre, ya que en el tercer lavado el sobrenadante se observa turbio e incoloro.
3. Para ajustar el rango de concentración de NaCl al que era recomendable trabajar, se experimentó a diferentes concentraciones y se tomaron aquellas que dieran una lectura gradual en el espectro fotómetro, lo que indicaba que los eritrocitos se iban hemolizando poco a poco por las diferentes concentraciones de NaCl. El rango de concentración de NaCl en que se trabajó fué aproximadamente de 0.5 a 0.65 por ciento. Como se observa, este rango fué muy pequeño por lo que debía cuidarse de hacer las mediciones con exactitud de cada una de las soluciones que se agregaban.

4. Uno de los pasos más importantes del proceso seguido, fué el ajuste de la suspensión de eritrocitos (25.0 ± 0.5 % de transmitancia) a 750 nm. ya que sin este ajuste se hubieran obtenido lecturas en el espectrofotómetro completamente diferentes a una misma concentración de NaCl de un experimento a otro. Con este ajuste se obtuvo duplicidad en los resultados con poca desviación, debidas a que el material biológico con el que se trabaja puede presentar diversas variaciones relacionadas principalmente con las condiciones físicas del animal, lo cual repercute en la sensibilidad de los eritrocitos.

5. Se considera que la solución de NaCl con agar al 0.04 % que se utilizó para la dilución de la sangre es la más adecuada, ya que puede medirse la cantidad necesaria de esta solución para su uso y además sirve como "colchon" para evitar la hemólisis de eritrocitos con el manejo.

6. Era muy importante que todas las variables que tuviera la preparación de la curva estándar estuvieran involucradas también en la preparación de la muestra para la cuantificación de saponinas y viceversa.

Como la muestra era extraída con etanol al 80 %, era necesario utilizar etanol al 80 % para la preparación de la curva, ya que se observó un efecto protector del etanol en la hemólisis de los eritrocitos.

7. No se probaron diferentes solventes debido a que el solvente utilizado para extraer las saponinas de la planta dió resultados aceptables. No se consideró necesario hacer otras pruebas ya que en varios trabajos consultados se utilizaba etanol para hacer la

extracción de saponinas, por lo que este trabajo solo se probaron diferentes concentraciones de etanol en agua y se encontró que donde había mayor concentración de compuestos hemolíticos era cuando la planta se ponía a reflujo con etanol al 80 %.

8. Otro aspecto muy importante tomado en cuenta para llegar al método final, fué el tiempo de contacto de los eritrocitos con las saponinas de las muestras o a su vez con las diferentes concentraciones de NaCl. Se llegó a la conclusión de que 2:30 hrs. era el tiempo necesario para que se produjera toda la hemólisis de los eritrocitos, causada ya sea por las saponinas o por las diferentes concentraciones de NaCl.

No obstante las ventajas descritas anteriormente del método propuesto en este trabajo, es importante señalar que no fué posible encontrar una correlación entre las diluciones y los incrementos de densidad óptica como puede verse en el cuadro no. 2 que permitiera en un momento dado obtener el resultado final con cualquier dilución. La explicación que se dé a esto es que posiblemente el hecho de estar trabajando con estructuras complejas como son los eritrocitos, el comportamiento de estos frente a un factor hemolítico como son las saponinas no sea el mismo que podemos obtener frente a compuestos químicos, por esta razón se decidió de manera arbitraria establecer que se utilizaría siempre para el cálculo el primer dato de densidad óptica que entrara en la curva.

V. CONCLUSIONES

El método propuesto es útil porque se puede diferenciar el contenido de saponinas de las diferentes plantas y detectar pequeñas cantidades de saponinas en ellas.

Es un método fácil de reproducir, rápido para llevarse a cabo y que no requiera de equipo especializado.

El hecho de que se base este método en la hemólisis que es característica principal de las saponinas, no descarta la posibilidad que en algún material vegetal pueda encontrarse otro compuesto que produzca hemólisis y que no se trate de saponinas, aunque estas son las más abundantes y conocidas con esta propiedad.

CUADRO # 1

DATOS PARA 6 CURVAS ESTANDAR OBTENIDOS EN LA EXPERIMENTACION
(CURVAS AJUSTADAS A UNA LINEA RECTA)

Tubo	Concentración de NaCl.	ml de etanol 80%	ml de susp. de glóbulos	I D.O	II D.O	III D.O	IV D.O	V D.O	VI D.O	\bar{x}	Desviación Estándar
1	0.4968	2	3	0.348	0.3739	0.3208	0.3384	0.3187	0.3966	0.3508	0.02
2	0.522	2	3	0.2859	0.3109	0.2789	0.2841	0.2800	0.2298	0.2965	0.01
3	0.5472	2	3	0.2438	0.2479	0.2280	0.2297	0.2412	0.2629	0.2422	0.01
4	0.5724	2	3	0.1917	0.1850	0.1771	0.1754	0.2025	0.1961	0.1879	0.01
5	0.597	2	3	0.1409	0.1235	0.1274	0.1224	0.1647	0.1308	0.1349	0.01
6	0.6228	2	3	0.0876	0.0591	0.0752	0.0668	0.1251	0.0624	0.07	0.02
7	0.648	2	3	0.0355	0.0038	0.0243	0.0124	0.0863	0.0044	0.027	0.02
8	0.9	2	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

DENSIDAD OPTICA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS A DIFERENTES DILUCIONES

Tubo	Dilu- ción	ml de MABI 1.26%	susp. globu- los	Parota	Disiple	Alfalfa	Jarba- co	Leg. de pto. es condido	Yucca	Mauto	Maguey Pulque- re.	Retana	Guinza	Toma- tillo	Soya	Saponi- na es- teroi- de.	Saponi- tritez- penoi- de.
1	1:1	5	3	0.509	Interfa- rencia. color.*	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T
2	1:2	5	3	0.535	*	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T
3	1:4	5	3	0.522	0.385	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	H.T	0.5015	H.T	H.T	H.T	H.T
4	1:8	5	3	0.332	0.1954	H.T	H.T	H.T	H.T	0.491	H.T	0.522	0.1622	H.T	H.T	H.T	H.T
5	1:16	5	3	0.041	0.535	H.T	H.T	H.T	H.T	0.458	H.T	0.529	0.006	H.T	H.T	H.T	H.T
6	1:32	5	3	0.036	0.435	0.4525	H.T	0.5195	H.T	0.434	H.T	0.3258	0.056	0.509	H.T	H.T	H.T
7	1:64	5	3	0.041	-	0.1196	H.T	0.5041	0.517	0.311	H.T	0.2258	0.0435	0.400	H.T	H.T	H.T
8	1:128	5	3	-	-	0.077	0.535	0.5045	0.400	-	H.T	0.2362	-	0.361	0.328	0.432	0.535
9	1:256	5	3	-	-	0.041	0.242	0.2903	0.413	-	0.500	-	-	0.285	0.402	0.192	0.527
10	1:512	5	3	-	-	-	0.076	-	0.2824	-	0.372	-	-	0.214	0.368	0.1196	0.4355
11	1:1024	5	3	-	-	-	0.0435	-	-	-	0.292	-	-	-	0.378	0.1155	0.2904
12	1:2048	5	3	-	-	-	-	-	-	-	0.194	-	-	-	0.27	-	-

1. Liener, I.E.
Toxic constituents of plant foodstuffs.
Academic Press, E.U.A., 1980 p.p. 151-182
2. Cheeke, P.R.
Nutritional and physiological implications of saponins.
Can. J. Anim. Sci., 621-632 (1971)
3. Lindner, E.
Toxicología de los Alimentos
Ed. Acribia; Zaragoza, España. 1980 p.p. 10-14
4. Edward T.G. y Evans W, Ch.
Farmacognosia
Ed. Continental S.A. de C.V., México 1979 p.p. 139-145
5. Domínguez, X.
Métodos de investigación fitoquímica
Ed. Limusa; México., 1974 p.p.
6. Diccionario Enciclopédico Espasa
Espasa-Calpe, S.A. Madrid., 1979
7. Pequeño Larousse de Ciencias y Técnicas
Ed. Larousse, Mexico., 1970
8. Birk, Y., Bondi, A., Gestetner, B.
A thermostable haemolytic factor in soybeans
Nature 197., 1089-1090 (1963)
9. Gestetner, B., Alon, Y., Birk, Y., Bondi, A.
Relation ship between their chemical constitution of hemolytic
and antifungal activities
J. Sci. Food Agric. Sci., 168-172 (1971)

10. Donat, M., Elliott, F.C.
Two rapid assays for saponin in individual alfalfa plants.
Crop. Sci. 9, 681-691 (1969)
11. Malinow, N.R., McLaughlin, P., Kohler, G.O and Livingston, A.L.
Prevention of elevated cholesterolemia in Monkeys by alfalfa saponins.
Steroids 29 (1) ., 105-110 (1977 a)
12. Gestetner, S., Sheny, S. and Asua, Y.
Medicagenic Acid, the factor responsible for hemolytic activity
de Lucerne Saponins.
Experientia 27., 40-41 (1971 b)
13. Aguilar, R., Fuevara, L., Alvarez, J.
Un nuevo método para la determinación cuantitativa de saponinas
y su aplicación a diversas variedades de Quinua Peruana
Acta Científica Venezolana 30., 167-171 (1979)
14. Jager, L.
Diet and Vitamin E doses
Nutr. Diet. 10 (3) ., 215-223 (1968)
15. Saazi, J., Beck, J.
Probability density function of the red cell membrane permeability
coefficient.
Biophys J. 14 (1) ., 33-45 (1974)
16. Segal, R., Manseur, M., Zaitschek, D.V.
Effect of ester groups on the haemolytic action of some saponins
and saponosins.
Biochem. Pharmacol 15., 1411-1417 (1966)

17. Lynch, M.J.
Métodos de laboratorio
Ed. Interamericana., 1972 ; p.p. 743-765
18. Jacobson, C.A.
Alfalfa saponins. Alfalfa investigation VII.
J. Am. Chem. Soc. 41., 640-648
19. Livingston, L., Whitehand, C., Kohler, G.
Microbiological Assay for saponin in alfalfa products.
J. Assoc. of Anal. Chem. 60(4)., 957-960 (1977)
20. Wall, M., Roland, E., Marian, L., Klumpp, M.
Protection and estimation of esteroidal sapogenins in plant tissue.
Anal. Chem. 24 (8)., 1337-1341, (1950)
21. Muñoz Rivera M.
Determinación de saponinas, taninos y acción antibiotica de algunas plantas silvestres mexicanas.
Tesis ., 1979; Q.F.B. U.N.A.M.

