



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"DETERMINACION DE SAPONINAS, TANINOS Y
ACCION ANTIBIOTICA EN ALGUNAS PLANTAS
SILVESTRES MEXICANAS"

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

p r e s e n t a :

MIRIAM MUÑOZ RIVERA



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.

TESIS 1979.

NO. M.C. ~~6~~ 254

ECHA _____

PROG _____



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. Ninfa Guerrero de Callejas
VOCAL	Prof. Angela Sotelo López
SECRETARIO	Prof. Emilio Barragán Hernández
1er. SUPLENTE	Prof. Salvador Baduí Dergal
2do. SUPLENTE	Prof. Miguel Hernández Infante

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

División de Estudios Superiores, Facultad de Química, U.N.A.M.

SUSTENTANTE

MIRIAM MUÑOZ RIVERA

ASESOR


M. en C. ANGELA SOTELO LOPEZ

A MI MADRE

A MI PADRE

POR SU CONSTANTE ESTIMULO

A MIS HERMANOS

A MI SOBRINO

A MIS MAESTROS

A LA FACULTAD DE QUIMICA

CON SINCERO AGRADECIMIENTO A

LA M. en C. ANGELA SOTELO LOPEZ,

POR SU APOYO, INTERES Y PACIENCIA.

A MIS HORRIBLES AMIGOS.

EL LADO OPACO DE LAS COSAS

ES LO QUE ENGRANDECE

LA LUZ QUE REFLEJAN.

C O N T E N I D O

OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	2
GENERALIDADES	4
Saponinas	4
Compuestos Polifenólicos	12
Taninos	15
Antibióticos	23
PARTE EXPERIMENTAL	28
RESULTADOS	44
DISCUSION	52
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56

O B J E T I V O S

- 1.- Determinar la presencia y concentración de saponinas y taninos en un número de plantas silvestres mexicanas.
- 2.- Determinar la actividad antibiótica que poseen las mismas plantas.

I N T R O D U C C I O N

Nuestro mundo se sumerge cada vez más en la eterna pesadilla que significa la desnutrición. Ella es causada por un número de circunstancias que se inter-relacionan mutuamente, tales como:

- a) La explosión demográfica.
- b) La mala distribución de la riqueza y de los recursos naturales.
- c) El raquítico apoyo económico que reciben la agricultura y la ganadería de los países subdesarrollados.

Como los alimentos de buena calidad nutricional son de origen animal y están al alcance de solo unos cuantos debido a su elevado costo, se ha pensado en la posibilidad de que existan vegetales que puedan sustituirlos. Para seleccionarlos, se toman en cuenta los siguientes parámetros:

- a) Disponibilidad.
- b) Cantidad y calidad de la proteína.
- c) Porcentaje de digestibilidad.

Sin embargo, existen factores tóxicos que son capaces de impedir el máximo aprovechamiento del material o de alterar el metabolismo del que los ingiere, y a cuya presencia no se ha dado suficiente importancia (1). Entre estas sustancias están: las hemaglutininas, los inhibidores de tripsina, los glucósidos cianógenicos, las saponinas, los taninos y compuestos polifenólicos en general, etc.

→ Saponinas y taninos, que son los que se estudian en este trabajo, disminuyen la absorción de compuestos como: la vitamina B₁₂ (23, 24) y compuestos nitrogenados (29, 33). Impiden la acción de enzimas (10) y/o deprimen el apetito.

Por otro lado, se ha visto que algunas saponinas y ciertos polifenoles actúan como antibióticos (19, 46, 47).

Saponinas y polifenoles se localizan en muchas plantas alimenticias o en forrajes como: espinacas, betabel, espárragos, castañas de la India, soya (1), nopales, hojas de té (5); sorgo (45), alfalfa (1), tréboles (3) y otros forrajes (4).

G E N E R A L I D A D E S

Existen plantas que tienen un papel importante en la dieta de amplios sectores de la población mundial o que se utilizan en la alimentación de animales. Sin embargo, su consumo generalmente se ve limitado por la presencia de factores tóxicos. Hay otras, que son silvestres y tienen una buena proporción de compuestos protéicos y/o energéticos, pero con todo ello, no son comestibles. Esto se debe a la dificultad de eliminar las sustancias tóxicas, sin alterar a los demás componentes, o porque no se sabe exactamente cuales son éstas, para así atacarlas.

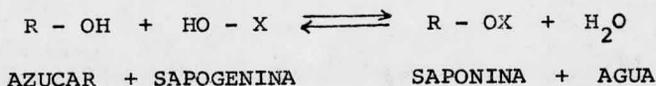
De entre las sustancias tóxicas mencionadas en el capítulo anterior, se hace una ligera revisión de las que a este trabajo interesan:

- a) Saponinas
- b) Compuestos polifenólicos
- c) Taninos

S A P O N I N A S

Son glucósicos en los cuales una cadena de azúcares es-

tá unida a una aglicona o sapogenina.



La aglicona o sapogenina puede ser alcohol o fenol.

Clasificación y distribución.

De acuerdo con la estructura que tenga la aglicona, las saponinas se clasifican en:

- a) Esteroidales, (C₂₇).- Son las más comunes. Son solubles en alcohol.
- b) Triterpenoides, (C₃₀).- Los carbohidratos que las constituyen son: hexosas principalmente, D-glucosa y D-galactosa; pentosas, D- y L-arabinosa y D-xilosa; metilpentosas, L-ramnosa; y ácidos urónicos, D-ga lacturónico y D-glucurónico. Son solubles en agua.

Saponinas esteroidales.

Se encuentran en familias de monocotiledóneas, particularmente Dioscoreáceas y Liliáceas. Son importantes por su relación con las hormonas sexuales.

Saponinas triterpenoides.

Son raras en monocotiledóneas, pero abundantes en las

dicotiledóneas: Caryophyllaceae, Sapindaceae, Polygalaceae, Sapotaceae.

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal (en hojas, raíces, tallos y flores) y hasta la fecha se han identificado al menos 400 especies, perteneciendo a más de 80 familias diferentes.

Entre las plantas comunes que contienen saponinas se incluyen: espinacas, betabel, espárragos, soya y alfalfa (1). También en tréboles (2,3) y otros forrajes (4). Estudios realizados por Hein, 1959, citado por Liener, demuestran que la distribución y contenido en las plantas depende de la temperatura del medio ambiente y por lo tanto, de la estación.

También se han encontrado saponinas en el veneno de las serpientes, en las estrellas de mar y en el pepinillo de mar (6).

Características.

Entre las propiedades que caracterizan a estos compuestos están: sabor amargo, forman espuma en soluciones acuosas, hemolizan eritrocitos, son muy tóxicos para los peces y anfibios y forman compuestos con el colesterol y otros hidroxisteroides. Existe una gran variación, si se comparan saponinas de diferente fuente. Así, las saponinas de la soya no

forman complejos con el colesterol y otras como las de una variedad de trébol no son tóxicas hacia los peces y no hemolizan (6). También se ha de tener muy en cuenta que en una misma planta pueden encontrarse varios tipos de saponinas y por ende, cada una de ellas poseerá propiedades características o potencias diferentes, aunque compartan una misma acción.

Las propiedades lipofílicas e hidrofílicas de las saponinas, su actividad de superficie y la habilidad de emigrar en medios diferentes, así como la propiedad de combinarse con esteroides, están determinadas por la combinación entre sapogeninas y carbohidratos en la molécula.

Puesto que la mayoría de las caracterizaciones de las saponinas se han hecho en extractos crudos, más que en un material puro, es posible que ciertas propiedades que son atribuidas a una saponina, sean debidas a materiales acompañantes. Por lo tanto, las propiedades que antes se citaron y que se usan comúnmente para identificarlas y caracterizarlas, solo deben ser indicadores.

Possible función que desempeñan.

Nord y Van Atta (7), vieron que las saponinas son capaces de inhibir la germinación de las semillas. Por su parte, Mishustin y Pedersen, et al (6), observaron que la saponina

de la alfalfa inhibe la germinación de las semillas de algodón y de lechuga.

Como algunas saponinas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y protozoarios patógenos, se piensa que constituyen uno de los mecanismos de defensa de las plantas.

Es posible que las saponinas sean material de reserva. Esto explicaría su presencia en las partes reproductoras de ciertas plantas como: el árbol Joshua, Yuca brevifolia (semillas) y otras especies de Yuca y Agave.

Significancia nutricional.

Varias propiedades antinutricionales y fisiológicas se han atribuido a las saponinas. Inhiben el crecimiento de pollos, deprimen la producción de huevo, causan flatulencia en rumiantes (8), etc.

Schaible (9), vió que en la dieta para pollos, la alfalfa debe constituir del 2 - 5%, ya que concentraciones más altas inhibirían la ganancia de peso. El factor responsable de esto, son las saponinas.

Las saponinas de la soya son descompuestas por la microflora intestinal (ciego) de pollos, ratas y ratones.

Las saponinas y saponinas de soya no son absorbidas y por lo tanto, no pasan a la corriente sanguínea.

Sollmann (6), encontró que la dosis letal de algunas saponinas es menor de 100 mg./Kg. de peso, pero la muerte es causada por la inflamación del aparato digestivo, más que por la absorción y acción sistemática de la saponina.

Se ha observado que las saponinas de la alfalfa y de la soya inhiben a ciertas enzimas, como por ejemplo: la alfa-quimotripsina, las proteasas del *Tribolium* y la colinesterasa. Esta inhibición es no-específica y se ve suprimida por la presencia de cualquier otra substancia protéica (10).

Hemólisis.

La membrana celular de los eritrocitos está constituida por esteroides, fosfolípidos y proteínas. E. Schlösser (11), observó que quince saponinas y seis sapogeninas formaron complejos con el colesterol, pero no con lecitina ni con albúmina. Esto implica que el punto de ataque en la hemólisis con saponinas, es el colesterol de la membrana de los eritrocitos.

Schmidt-Thome (12), estudiando esta reacción, encontró que se necesita una mínima cantidad de saponinas que rodeen a la membrana para que se produzca la hemólisis. Este científico, explicó que las moléculas de saponina se unen al co-

lesterol, dando lugar a la formación de canales en la membrana y/o desnaturalización.

La velocidad de hemólisis varía marcadamente con diferentes saponinas. A su vez con una saponina dada, la velocidad de la reacción será diferente, dependiendo de la clase de eritrocito a probar, obteniéndose un valor menor con el de humano y mayor con el de cordero.

De acuerdo con lo anterior, el que una saponina sea incapaz de hemolizar implicará que carece o tiene menos afinidad por el colesterol. Por otro lado, el hecho de que una planta tenga sustancias hemolíticas, no prueba que contenga saponinas. Sin embargo, Jocs y Ruysen (13), afirman que no todas las saponinas hemolíticas forman colesteroides. Esto es verdadero para las saponinas ácidas o triterpenoides.

Más recientemente, Gestetner (14), utilizando saponinas de alfalfa y diferentes esteroides, comprobó que la capacidad hemolítica y antimicrobiana que presentan estos glucósidos es el resultado de la interacción que tienen con el colesterol de las membranas.

Shany (8), demostró que las saponinas de la raíz de la alfalfa son agentes hemolíticos más fuertes y más tóxicos a *Tribolium castaneum* (larva) que las del resto de la planta.

Ahora bien, comparando la actividad hemolítica con otras

propiedades, se han obtenido diversos resultados. Algunos investigadores no han encontrado relación entre la actividad hemolítica, la dosis letal en ratones y el efecto inflamatorio que algunas saponinas presentan. Lindahl, también reportó la no correlación entre hemólisis y otros efectos fisiológicos de las saponinas de la alfalfa (6). No obstante, Awe, et al y Vacek, et al (13), demostraron que hay correlación entre producción de espuma, tensión superficial, actividad hemolítica y toxicidad.

Gestetner (16), demostró que la toxicidad de las saponinas es debida principalmente a la fracción de saponina, cuya aglicona está constituida por ácido medicagénico y que su acción puede ser inhibida por colesterol y beta-sitosterol. Esto se explica por la habilidad de los esteroides para formar compuestos insolubles en agua con las saponinas.

U s o s .

Se les utiliza en la elaboración de bebidas suaves, cervezas, shampoos, jabones y extinguidores de fuego. También se usan para bajar la tensión superficial de emulsiones fotográficas.

Las que se hallan en los tubérculos de varias especies de Dioscorea, son fuentes importantes de materia prima para

la síntesis de hormonas (progesterona y cortisona) y otros productos esteroideos.

COMPUESTOS POLIFENOLICOS.

Propiedades.

Los radicales fenólicos al igual que los alcohólicos son el sitio de formación de puentes de hidrógeno. Así, este tipo de uniones determina el comportamiento, tanto físico, como químico de estas sustancias. Son solubles en agua. Forman complejos con los metales, en especial con el fierro y el aluminio, dando coloraciones oscuras. Esta propiedad se utiliza para identificarlos. La estabilidad de los complejos está en función de la estructura de los grupos involucrados; así, los formados con o-dihidroxicarbonilos, son más estables que aquellos en los que participan o-difenoles. Por ello, los quelatos formados por fierro y flavonoles tienen mayor estabilidad que los constituidos por fierro y fenoles.

Muchas sustancias fenólicas se encuentran en las plantas en forma de glucósidos. El contenido total de flavonoides de varios frutos cítricos se incrementa con la maduración y por otro lado, el sabor amargo producido por taninos, disminuye.

minuye.

Acción como inhibidores.

Se ha visto que inhiben enzimas pectolíticas y celulolíticas, pero sus productos de oxidación son generalmente más activos. Por lo tanto, todo aquello que estimula oxidasas y peroxidasas, incrementa la inhibición. Este es un mecanismo de defensa que las plantas utilizan para inactivar exoenzimas de microorganismos patógenos (18).

Muchas plantas contienen compuestos polifenólicos de varios tipos y su presencia frecuentemente se ha asociado con la resistencia a ciertas enfermedades. Estas suposiciones, se basan en la correlación que existe entre el obscurecimiento (originado por la oxidación de compuestos polifenólicos) y la resistencia a la infección. Por ejemplo, Byrde (19), de mostró que las manzanas tratadas con glutatión no se obscurecen y son sensibles a las esporas de Sclerotinia fructigeria.

Dormancia.

El hecho de que las semillas ya maduras, sean latentes a la germinación cuando están dentro del fruto, en el que la temperatura es ideal, el oxígeno no es limitante y parecería que estuvieran rodeadas de agua, solamente se puede explicar en términos de Inhibición Osmótica o de Factores Inhibidores.

Entre los inhibidores químicos se encuentran los siguientes: cloruro de sodio, donadores de complejos de cianuro, ácidos orgánicos, sustancias donadoras de amonio, lactonas insaturadas (especialmente cumarina), aldehídos, aceites esenciales, alcaloides y compuestos polifenólicos. Estas sustancias pueden estar no solo en las semillas, sino en las hojas, raíces y otras partes de la planta. Todas ellas juegan un importante papel ecológico al inhibir la germinación de semillas en la vecindad de la planta madre.

Clasificación.

- I.- Fenoles simples.- Derivados de los ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinámico. Incluye flavonoles y flavonoides deactivados.
- II.- Flavonas no tánicas.- Monómeros de antocianina, catequinas y leucoantocianinas.
- III.- Taninos condensados o no hidrolizables .- Polímeros y copolímeros de catequinas y leucoantocianinas.
- IV.- Taninos hidrolizables.- Poliésteres de un azúcar o alcohol polihídrico y un ácido fenólico o carboxílico (generalmente gálico o elágico).

Dado el interés de este trabajo, se hablará sólo de Taninos.

T A N I N O S .

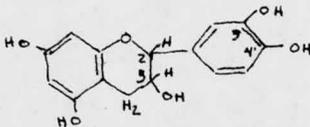
Propiedades.

El término "tanino" suele usarse como sinónimo de ácido tánico.

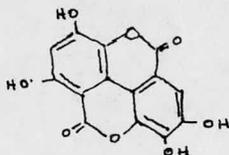
→ Los taninos, en cuanto a estructura constituyen un grupo heterógeno de compuestos que comparten propiedades bien definidas, además de las que ya poseen por presentar radicales fenólicos. Sus pesos moleculares varían de 500 - 3000. Tienen habilidad para precipitar alcaloides. Se combinan con proteínas, celulasas y pectinas. Su astringencia característica es causada por la precipitación de las glucoproteínas de la saliva, lo que reduce su propiedad lubricante.

Taninos no hidrolizables (tipo no éster).

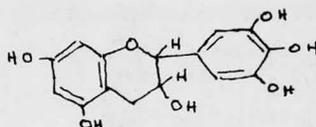
→ Contienen núcleos polifenólicos unidos entre sí por enlaces C-C ó C-O-C. El ácido elágico es constituyente de numerosos taninos. Algunos pertenecen al grupo de catequinas que se pueden representar por la L-epicatequina y por la catequina del té.



L-epicatequina



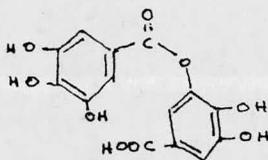
Acido elágico



Catequina del té

Taninos hidrolizables (tipo éster).

Por saponificación producen ácido gálico y en algunos casos el azúcar es glucosa. E. Fischer, vió que el componen te característico es el ácido digálico.



Acido digálico

Se emplean en la fabricación de tintas y en la aplicación de ciertos colorantes básicos al algodón. Los tejidos impregnados con tanino, se tratan con tartrato de antimonio, que fija el polioxiácido a la fibra.

Distribución.

➤ Se encuentran ampliamente distribuidos entre los vegeta

→ les. Se les halla en las familias: Rosaceae, Leguminosae, Mirtaceae, Geraniaceae, Castaneaceae y Rubiaceae. Todas son fanerógamas. Las Crucíferas y Papaveráceas están totalmente desprovistas de taninos. Las plantas leñosas y los órganos subterráneos de las Herbáceas vivaces son generalmente ricos en taninos.

Oser (20), vió que las nueces del Quercus de mayor contenido en taninos, son las de mayo a septiembre. Parece ser que se acumulan en ciertos órganos durante el desarrollo de la planta y que su concentración decrece con el porcentaje de humedad.

Estudios realizados por Bözidar (18), en alfalfa de diferentes edades y en diferentes estaciones del año, sobre el contenido de polifenoles, indican que a mayor edad, baja el nivel de taninos en toda la planta (de 3.05 - 2.47%); que en las hojas existen en una mayor proporción que en el tallo; y que la cantidad total de taninos baja a lo largo del año:

de 2.09 - 1.66% en el tallo

de 3.57 - 3.19% en hojas y

de 2.97 - 2.38% en la planta completa

Posible función que tienen en la planta.

- a) Protección
- b) Reserva
- c) Desecho vegetal
- d) Cromógeno respiratorio

Interacción con proteínas.

En la célula, los taninos generalmente se encuentran asociados a vacuolas, protegiendo al protoplasto de la desecación, putrefacción y destrucción por microorganismos. Esto explica el que se acumulen en células situadas cerca de heridas o infecciones (21).

→ La propiedad de los taninos de combinarse con proteínas y otros polímeros es importante, por la inhibición enzimática que producen. Loomis y Battaille (22) indican que en estas reacciones se involucran tres tipos de enlaces químicos:

- a) Puente de hidrógeno del radical fenólico con: -NH, -CO, -OH.
- b) Enlaces iónicos formados por el grupo aniónico del tanino (fenoles ionizados o carboxilos) y el catiónico de las proteínas como el épsilon-amino de la lisina.

- c) Enlaces covalentes formados por la unión entre quinonas (que pueden ser parte del compuesto tánico o ser producto de la oxidación de éste) y los grupos reactivos de proteínas u otros polímeros.

Aspectos nutricionales relacionados con los taninos.

En esta parte se hace una revisión de los trabajos realizados por varios autores con respecto al tema.

→ Debido a que los taninos precipitan a las proteínas, el valor biológico del alimento consumido, disminuye en el tracto intestinal.

→ Carrera (23, 24), encontró que el ácido tánico administrado oralmente a ratas, disminuye la absorción de vitamina B₁₂, como consecuencia de la formación en el estómago e intestino de un complejo entre el tánico, vitamina B₁₂ y glucoproteínas. Esto, reduce la cantidad de vitamina libre y por lo tanto, baja el coeficiente digestivo de utilización de ella.

→ Peaslee (25), observó que los ratones jóvenes (de 7.0 - 11.3 g.) son más susceptibles a los efectos de la alimentación con ácido tánico en concentraciones de 5 - 8% en la dieta. Y como la inhibición del aumento de peso fué acompañada de hiperactividad de la MSH (hormona estimulante de los mela

nocitos) de la pituitaria, concluye que el tanino actúa posiblemente a nivel de hipotálamo. Glick y Joslyn (26), obtuvieron los mismos resultados.

→ Haciendo estudios comparativos del efecto que tienen diferentes fenoles sobre el crecimiento de pollos, Rayudu (27), demostró que el ácido tánico lo inhibe en mayor proporción que el ácido gálico; no así, Joslyn (28), reportó que el gálico al 5% en una dieta para ratas, causa mayor depresión en la ganancia de peso, que el tánico en la misma concentración, no obstante que éste último presenta un mayor índice de mortalidad.

Rayudu observó que el ácido tánico causa hígado graso en mayor proporción que el gálico. Glick y Joslyn no están de acuerdo con esto (26).

Glick y Joslyn (29), encontraron que las ratas alimentadas con taninos y otros compuestos fenólicos excretan más nitrógeno fecal que los controles. Además, hicieron las siguientes observaciones:

a) A mayor concentración de tánico, corresponde un PER más bajo y por lo tanto, mayor cantidad de N_2 fecal será excretado y el crecimiento se deprime. (30, 31, 32).

b) Otro factor que tiene el mismo efecto sobre el desa-

rollo, es la baja ingesta ocasionada por el sabor, astringente que el tanino imparte a la dieta.

Con respecto a esto, el mismo investigador (28), demostró que al aumentar la concentración de ácido tánico, gálico o D-catequina, la ingesta decrece proporcionalmente. Así, cuando alguno de estos compuestos fenólicos está al 6% en la dieta, se registra el 60% de consumo con respecto al control.

→ La deficiencia de tiamina, uno de los problemas nutricionales en Tailandia, se ha relacionado con el hábito de beber té y masticar hojas fermentadas de té. Hilker (33), indica que los taninos pueden ser los responsables de tal deficiencia debido a la alta concentración en que aparecen en esta planta (1 - 30%) (34). Kositawattanakul, et al (35), vieron que el ácido ascórbico previene la modificación de la tiamina por el ácido tánico y la respuesta es mejor cuando la concentración de ascórbico se incrementa. Por otro lado, parece que la forma oxidada del tanino es el verdadero inhibidor.

→ Tamir y Alumot (18), encontraron que los taninos aislados de las semillas verdes de algarrobo inhiben significativamente a las enzimas: tripsina, lipasa y alfa-amilasa.

Armstrong, et al (36) y Cummings y Axtell (37), observaron que los pollos alimentados con sorgo "resistente a los pájaros", exento de pericarpio, crecieron más rápido que aque-

llos que consumieron el grano entero.

West (38) al emplear sorgos de alto contenido en taninos encontró que el efecto reductor del crecimiento en pollos no es causado por la baja palatabilidad. Peterson (39), observó ingestas menores cuando utilizó sorgos "pajareros", es decir, "resistentes a los pájaros", como alimento.

Corrección del efecto tóxico.

Varios trabajos han señalado la completa o parcial eliminación de los efectos del ácido tánico con diversas suplementaciones. Potter y Fuller (40) y Rayudu (27), al estudiar el efecto del ácido tánico en raciones para pollos de engorda, encontraron que el producto de la hidrólisis del tánico es el ácido gálico, el cual es excretado. Al mismo tiempo, vieron que la adición de grupos metilo provenientes de metionina y colina, tienden a hidrolizar los taninos. Chang y Fuller (30), han reportado que suplementaciones con colina y metionina a dietas para pollos, eliminan completamente la inhibición del crecimiento, producida por los taninos presentes en el grano de sorgo. Mientras tanto, Connor, et al (32), dicen que los donadores de metilos no eliminan completamente el efecto depresor. Cummings y Axtell (37), obtuvieron buenos resultados al suplementar dietas de sorgo "pajarero" con

lisina. Lease y Mitchell (37), encontraron que al aumentar la cantidad de proteína y hierro en dietas para ratas, disminuye la toxicidad del ácido tánico presente. A resultados similares llegaron Armstrong, et al (41) cuando incrementaron el nivel de proteína y metionina en dietas para aves. Ellos mismos afirma que la polivinilpirrolidona adicionada a las dietas que contienen taninos, mejora el desarrollo de las aves

Manson, et al (42), reportó que el contenido de taninos en sorgo, disminuye con el ensilado.

Stephenson, et al (43) y Talmadge, et al (44), están de acuerdo en que la coloración de la cubierta del sorgo no es un indicador del verdadero valor nutritivo que puede tener este grano.

ANTIBIOTICOS

Propiedades.

El término antibiótico se aplica usualmente a sustancias orgánicas que matan o inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos, como bacterias, hongos o protozoarios.

Cuando se habla de antibiótico, se da por hecho que son sustancias altamente activas, aún en concentraciones muy bajas y su acción es específica hacia diferentes microorganismos.

mos. Sin embargo, la actividad y la especificidad son relativas y es extremadamente difícil, en muchos casos, decidir si una sustancia reportada en la literatura debería ser llamada antibiótico, en lugar de antiséptico o desinfectante.

El estudio sistemático de plantas superiores con el objeto de descubrir antibióticos en sus tejidos, es de origen relativamente reciente. Sin embargo, estas investigaciones, inspiradas generalmente por el deseo de encontrar nuevas sustancias tóxicas a microorganismos patógenos, siguió naturalmente de la vieja práctica de usar plantas y extractos de éstas como fármacos para curar enfermedades humanas.

RELACION ENTRE SAPONINAS, TANINOS Y EFECTO ANTIBIOTICO

Como se ha venido mencionando anteriormente, existen taninos y saponinas que inhiben el crecimiento de microorganismos. Esto podría dar lugar a una interpretación equívoca sobre el efecto antibiótico observado en algunas plantas, cuando éste fuera la consecuencia de altas concentraciones de uno de estos dos compuestos.

Enseguida se hace una revisión de algunos trabajos realizados al respecto.

Efecto antibiótico de saponinas.

Bruno Wolters (46, 47), encontró que la lanatonina y la parillina tenían efecto antifúngico, causando un 100% de inhibición de *Sclerotinia fructícola*, *Claviceps purpúrea*, *Trichotecium roseum*, *Piricularia oryzae*, *Polyporus versicolor* y *Fomes officinalis*. La gracillina y la dioscina inhibieron en un 100% el crecimiento de *Sclerotinia fructícola* y *Claviceps purpúrea*, pero aceleraron el de la *Alternaria solani*. Todos estos inhibidores son esteroides. *Polistictus* es inhibido completamente por saponinas esteroidales, pero solo debilmente por las triterpenoides. Se observó el efecto contrario con respecto a *Coniophora* y *Aspergillus*. La acción fungistática de varias especies, se observó a concentraciones a menudo bajas en relación con el contenido real de saponina.

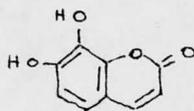
Efecto antibiótico de compuestos polifenólicos.

Se ha sugerido que los polifenoles reducen la actividad de las enzimas pectolíticas y en esta forma contribuyen a la resistencia del huésped. Entre las sustancias que tienen esta acción, se encuentra el ácido clorogénico. Se ha demostrado que ciertas variedades de papa que son resistentes a *Streptomyces scabies*, *Phytophthora infestans* y *Verticillium alboatrum*, tienen más altas concentraciones de ácido clorogénico que aquellas variedades susceptibles.

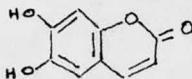
Boakye-Yiadom y G. H. Konning (48), encontraron que de las plantas de la familia Connaraceae de Ghana, solo cuatro poseen actividad antimicrobiana y ellas son: *Brysocarpus coccineus*, *Cnestis ferruginea*, *Jaundea pinnata* y *Manotes longiflora*.

Sus extractos resultaron poseer amplio espectro de actividad, ya que inhibieron tanto bacterias gram positivas, como gram negativas. Observaron que hay una mayor cantidad de sustancias activas en la raíz que en el tallo, y en éste que en las hojas.

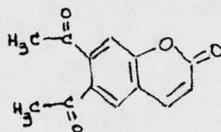
Jurd, et al (49), estudiando las propiedades antimicrobianas de diversas cumarinas y sus derivados, encontraron que la dafnetina (Ia) inhibe completamente el crecimiento de cuatro bacterias gram positivo y cinco gram negativo, sin alterar el de levaduras y hongos.



Ia



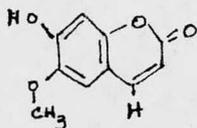
IIa



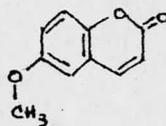
IIc

La actividad de la aesculetina (IIa) fué similar al de la dafnetina, es decir, inhibió fuertemente a una bacteria

gram positivo y a dos especies gram negativo, pero no afectó el crecimiento de hongos. Dafnetina, aesculetina y sus derivados activos metílicos (Ia, IIc, VIIb) fueron efectivos solo a concentraciones de 250 - 500 ppm y a un rango de pH de 4 a 7.



IIIa



VIIb

La dafnetina, la 7,8-dihidroxicumarina (Ia) y su isómero, así como la aesculetina y la 6,7-dihidroxicumarina (IIa), se encuentran libres en las especies de Euforbia y Fraxinus. Trazas de scopoletín (IIIa) se encuentran en tejidos de plantas sanas de la familia solanacea, como por ejemplo: tabaco y papa. Sin embargo, su concentración se incrementa significativamente alrededor de las lesiones causadas por cierto virus.

En 1962, Grebus et al (mencionado por L. Jurd) vieron que la dafnetina es activa contra Staphylococcus aureus y Escherichia coli, en una concentración de 200 ppm y contra P. aeruginosa en 500 ppm. Además, no inhibe a Bacilo subtilis.

PARTE EXPERIMENTAL

1.- MATERIALES

1.1 Muestras empleadas

→ Las plantas que se utilizaron para este estudio proceden de diferentes regiones de la República y la mayoría son leguminosas.

En la tabla N° 1 se mencionan las muestras en las que se realizó la prueba cualitativa para saponinas.

Se determinaron taninos y poder antibiótico en las muestras que se presentaron saponinas y también en aquellas que interesaban porque prometían ser buenas fuentes de alimentos.

1.2 Preparación de las muestras.

Las muestras se molieron en un molino Arthur H. Thomas C.O. a 60 mallas.

Se extrajo la grasa de aquellas muestras que contienen más del 17%.

2.- METODOS

2.1 Determinación de saponinas

2.1.1 Cualitativa (Prueba de Espuma).

TABLA 1

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO
Acacia	Delonix regia
Jinicuil	Inga sp.
Alampepe	Entada scandens
Algarrobo	Acacia pennatula
Alverjón	Canavalia ensiformis
Arbol de pan	Arectocarpus altilis
Barbasco	Dioscorea sp.
Capomo	Brosimum alicastrum
* *	Cassia fruticosa
* *	Cassia tora
Cebollín	Tigridia pavonia
* *	Caesalpinia glabra
Cedrillo	Guarea excelsa
Chupabaya	Mucuna argyrophylla
* *	Cocoluba barbadensis
Cornezuelo	Acacia cornigera
* *	Crotolaria vitellina
Frijol botil	Phaseolus coccineus
Frijol castellano	Phaseolus vulgaris
Frijol colón	Phaseolus vulgaris
Frijol colorado de suelo	Phaseolus vulgaris
Frijol de la vega	Phaseolus vulgaris
Frijol del monte	Phaseolus lunatus
Frijol de vara	Phaseolus vulgaris
Frijol escumite	Phaseolus acutifolius
Frijol ives	Phaseolus vulgaris
Frijol negro de enredo	Phaseolus vulgaris
Frijol negro de suelo	Phaseolus vulgaris
Frijol patashete	Phaseolus lunatus
Frijol patashte	Phaseolus vulgaris
Frijol pataste	Theobroma bicolor
Guapinolo	Hymenaea courbaril
Guázumo	Ulmifolia sterculiaceae
Guinolo	Acacia coeliacantha

Huizache
Hule
Maguacata
→ Maíz
Mezquite
Nescafé
Orejuelo
Pajulul
Palo de gusano
Palo fierro
Parota
Pata de vaca
Saca manteca
Tocolixtle
Tepeguaje
* *

Acacia farnesiana
Castilla elastica
Pithecellobium flexicaule
Zea mays
Prosopis juliflora
Stizolobium cinerium
Cymbopetalum penduliflorum
Protium copal
*
Pithecellobium undulatum
Enterolobium cyclocarpum
Bauhinia purpurea
Solanum verbascifolium
Hampea nutricia
Lysiloma acapulensis
Tovarice diffusa

-
- * Se desconoce el nombre científico
* * Se desconoce el nombre común

Material

Balanza analítica

Vortex-Genie

Fundamento

Como las saponinas tienen la particularidad de disminuir la tensión superficial, la formación de espuma en soluciones acuosas se utiliza para detectar su presencia.

Procedimiento

Se coloca 0.1 g. de muestra molida (malla 60) en un tubo de ensayo. Se adicionan 5 ml. de agua y se agita durante un minuto en un Vortex a la máxima velocidad posible. A los 15 minutos de reposo se observa la altura de la espuma y se mide.

2.1.2 Cuantitativa

El método utilizado aquí es una modificación del de Monroe E. Wall (17).

Material

Espectrofotómetro Coleman Jr.

Balanza analítica

Centrífuga

Vortex-Genie

Reactivos

*Sol. Patrón de Saponina triterpenoide (400 ug/ml. en etanol al 80%)

Sol. de cloruro de sodio 0.9% en agua (Sol. salina)

Suspensión de eritrocitos 1:4 en solución salina

Cloruro de sodio 0.9% con 0.08% de agar

Etanol al 80%

*(Este reactivo fue adquirido en la casa Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. U.S.A., y se utilizó como patrón de comparación en vista de que no fue posible conseguir otro de más alta pureza).

Fundamento

Las saponinas triterpenoides tienen la propiedad de unirse al colesterol que rodea a los eritrocitos, disminuyendo la tensión superficial de la membrana y provocando como consecuencia su ruptura. Como el glóbulo contiene hemoglobina, ésta queda en libertad y pasa a disolverse en el líquido en el que estaban suspendidos los eritrocitos. La hemoglobina por ser de color rojo absorbe a 540 nm.

Preparación de los extractos

De 2 a 3 g. de muestra se hierven a reflujo con aproximadamente 20 ml. de etanol, agitando durante 25 minutos. Se enfría la mezcla, se filtra cuantitativamente, se lava el residuo y se

afora a 25 ml. utilizando el mismo disolvente.

De cada extracto así obtenido, se utilizan 0.4 ml. como máximo. Los extractos usados se diluyen o concentran para hacer la determinación.

Preparación de eritrocitos.

10 ml. de sangre (en este caso se utilizó sangre de conejo por la facilidad de obtenerla) se agita con perlas de vidrio con el objeto de desfibrinarla. Se hace lo más cuidadosamente posible para que no se hemolice demasiado. Enseguida, se adicionan 10 ml. de solución salina y se centrifuga a 2000 rpm. y a 18°C. Se decanta el líquido sobrenadante. El paquete de eritrocitos obtenido se resuspende en solución salina y se centrifuga nuevamente. Este proceso se repite hasta que el sobrenadante esté claro, lo que indica que ya no hay hemoglobina libre. Con el paquete, se hace una dilución 1:4 utilizando solución salina con agar.

Procedimiento.

- 1.- Se colocan 0.2 ml. de la suspensión de glóbulos en un tubo de ensayo, sin que resbalen por las paredes.
- 2.- Se adicionan 5 ml. de solución salina a cada tubo.
- 3.- Se añaden volúmenes de etanol que van de 0.00ml. a 0.40 ml. de acuerdo a la cantidad de extracto problema que se utilice. La suma de ambas alícuotas debe ser

igual a 0.40 ml.

4.- Se adicionan los problemas. El volumen que se utilice, será aquel cuya hemólisis se localiza en el centro de la curva estándar. Esto quiere decir, que antes de la determinación propiamente dicha, se harán pruebas tentativas para decidir si se concentra o se diluye el extracto original.

5.- Una vez que se adicionaron los extractos, se agitan rápidamente y se dejan reposar por 10 min. a temperatura ambiente. Es importante hacer notar que el tiempo de agitación debe ser igual para todos los tubos, ya que es un factor decisivo para el rompimiento de las células.

6.- Se centrifugan los tubos y el sobrenadante se lee a 540 nm. contra el blanco para obtener A. Se hace un duplicado de cada muestra.

7.- Debido a que la mayoría de los extractos presentan color, es conveniente restar su absorción de la correspondiente a la hemoglobina. Para ello, se procede como en la parte anterior, pero omitiendo los eritrocitos y adicionando agua en su lugar. Se lee contra agua para obtener B.

8.- Como: $D.O. \text{ de la hemoglobina libre} = A - B$

La D. O. resultante se interpola en la curva estándar

correspondiente.

Curva estándar de saponinas.

Se procede de la misma forma que para los extractos, sólo que sustituyendo estos por la solución patrón. Se trabaja en un rango de 40 - 60 ug. (0.1 - 0.4 ml.). Está por demás decir que las condiciones para la curva y probelmas deben ser exactamente iguales.

→ 2.2 Determinación cuantitativa de Taninos

Se utilizó el método de Price y Butler (45).

Material.

Baño maría con agitación

Centrífuga

Espectrofotómetro Coleman Jr.

Reactivos.

Sol. de cloruro de sodio 0.2 M.

Cloruro férrico 0.1 M. en ácido clorhídrico 0.1 N.

Ferricianuro de potasio 0.08 M

*Sol. de ácido tánico (20 ug/ml.)

*(Este reactivo fue adquirido en la casa Merck de México, S.A.).

→ Fundamento.

Esta prueba se basa en la reducción del ión férrico a ión ferroso, por taninos y polifenoles, seguida de la formación de un complejo de ferrocianuro-ferroso, conocido como azul de Prusia.

→ Extracción de taninos y polifenoles.

50 mg. de muestra se agitan con agua durante 20 min. a temperatura ambiente. Se afora a 50 ml. para después centrifugar. Se guarda el extracto en congelación.

Extracción de polifenoles no tánicos.

Se procede como en el punto anterior pero sustituyendo el agua por una solución de cloruro de sodio 0.2 M. para precipitar taninos.

Procedimiento.

- 1.- En tubos de ensayo se colocan de 1 - 2 ml. de extracto acuoso. / En ocasiones se deberán hacer diluciones previas.
- 2.- Se adiciona agua, de tal manera que el volumen de ésta, sumado con el anterior den 5 ml. en total.
- 3.- A cada tubo se le adicionan 0.3 ml. de FeCl_3 .
- 4.- Se agita y se agregan 0.3 ml. de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.
- 5.- Se agitan y al cabo de 10 min. se leen a 720 nm. contra

un blanco que ha estado en idénticas condiciones. Las lecturas se hacen en un lapso máximo de 10 min., debido a que después aparece un precipitado. Cada muestra se trabaja por duplicado.

- 6.- Se interpola esta absorbancia en la curva estándar para obtener los microgramos de polifenoles totales.
- 7.- Se repite la determinación empleando el extracto salino para obtener la concentración de polifenoles no tánicos.
- 8.- De la sustracción de las dos lecturas se obtienen los microgramos de taninos de cada muestra.

Curva estándar de ácido tánico.

Se procede de la misma manera utilizando de 0 a 24 ug. de ácido tánico en cada tubo.

2.3 Determinación de Actividad Antibiótica.

El método para Penicilina y Bacitracina son de la FDA (50, 51) y para Tricomocina es una variación del CFR (52).

Material.

Baño de agitación

Centrífuga

Cilindros

Autoclave

Parrilla

Estufa incubadora

Reactivos.

Buffer de fosfatos al 1%, pH 6

Mezcla de dimetilsulfóxido-metanol-agua (2:3:5)

Medio Bacto-Penassay Seed agar B 263 DIFCO

Medio Bacto-Penassay Base agar B 270 DIFCO

Estándar de Bacitracina (63.2 U/mg.)

Estándar de Penicilina (1613 U/mg.)

Estándar de Tricomocina (9195 U/mg.)

Medios N^o 1 y N^o 2

Caldo glucosado

Etanol

Sarcina subflava ATCC7468

Sacharomyces cereviceae

Staphylococcus aureus

A continuación se da la composición de los Medios 1 y 2, así como del Caldo Glucosado, los cuales se preparan de acuerdo a las instrucciones del manual DIFCO (53).

Medio N^o 1

10.0 g. de peptona

5.0 g. de extracto de levadura (0127-01)

2.5 g. de extracto de carne (0126-02)
10.0 g. de cloruro de sodio
10.0 g. de dextrosa
25.0 g. de agar
El agua necesaria para hacer un litro

Medio N° 2

20.0 g. de dextrosa
5.0 g. de Bacto-peptona (0118-01)
1.5 g. de extracto de levadura (0127-01)
20.0 g. de agar
El agua necesaria para obtener un litro

Caldo Glucosado

20.0 g. de dextrosa
1.0 g. de extracto de levadura (0127-01)
El agua necesaria para hacer un litro

Fundamento.

Cuando una solución de antibiótico se hace difundir a través de un medio inoculado con el microorganismo susceptible adecuado, dará lugar a un halo de inhibición, que será proporcional a la concentración de la solución.

15 - 5 ml
 20g - 100 ml
 d 20% de extracto ?

Preparación de los extractos.

La muestra de 1 g. se agita durante 5 min. con 5 ml. de buffer de fosfatos y otro gramo con 5 ml. de mezcla de DMS- METOH-AGUA.

Se centrifugan en frío y el líquido sobrenadante se utiliza para colocarlo en cilingros de Oxford el mismo día de su preparación.

Microorganismos de prueba.

Sarcina subflava para bacitracina

Staphylococcus aureus para penicilina

Sacharomyces cereviceae para tricomicina

Preparación del inóculo para la determinación de penicilina y bacitracina.

La resiembra del microorganismo correspondiente se prepara con medio Seed agar, inclinado, 24 horas antes de la determinación. Se incuba a una temperatura de 35 - 37°C y después de 16 a 24 hrs. se suspenden las células en 5 ml. de agua estéril. De esta suspensión se hacen diluciones para obtener una de 1:100 (v/v). A cada 30 ml. de medio Seed agar a 48 - 50°C, se adicionan 1.5 ml. de inóculo. De este medio inoculado, se colocan 4 ml. en cajas de Petri que ya tendrán 21 ml. de medio Base

agar gelificado.

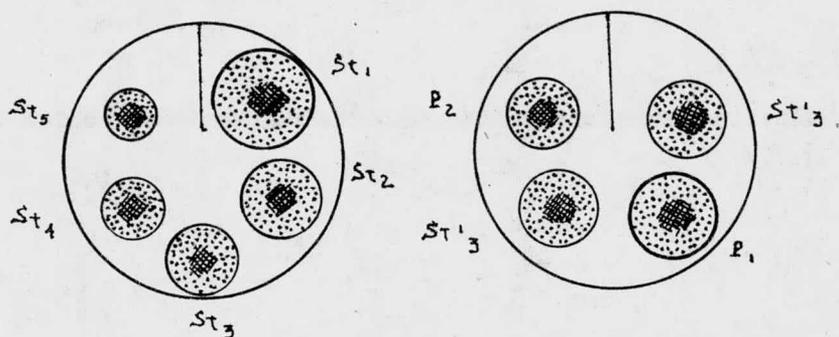
Preparación del inóculo para la determinación de tricomicina.

Se resiembró el microorganismo en tubos con medio N° 1 inclinado, 24 horas antes de la determinación. Se incubó por 16-24 horas a una temperatura de 35 - 37°C. Transcurrido este tiempo, se colocan unas azadas en 10 ml. de caldo glucosado y se deja fermentar a la misma temperatura durante 3 - 6 hrs. A cada 30 ml. de medio N° 1 a 50°C, se adicionan 2.5 ml. de caldo fermentado. Por último, en cajas de Petri que contengan 21 ml. de medio N° 2 estéril y sólido, se colocan 4 ml. del medio inoculado.

Procedimiento.

El procedimiento seguido en los tres casos es el mismo.

- 1.- Se preparan cinco placas con cada microorganismo para la curva estándar correspondiente y cinco por cada problema.
- 2.- Una vez colocados los cilindros y las soluciones como se ilustra en la figura N° 1, se incuban las placas a 35 - 37°C, durante 16 a 24 horas.
- 3.- Después de este tiempo, se mide el halo de inhibición resultante.



St_n = Diámetro del halo en mm.

$$[St_3] = [St'_3]$$

Figura N° 1

Curvas estándar de antibiótico.

El rango de concentraciones para cada antibiótico es:

Bacitracina: de 0.1 U/ml. a 0.5 U/ml.

Penicilina: de 0.05 U/ml. a 0.60 U/ml.

Tricomocina: de 0.2 U/ml. a 0.7 U/ml.

Cálculos.

Con la siguiente fórmula estadística (54) se obtiene la curva de regresión:

$$\frac{3St_1 + 2St_2 + St_3 - St_5}{5} = ST_1$$

$$\frac{3St_5 + 2St_4 + St_3 - St_1}{5} = ST_5$$

La curva estándar se traza uniendo ST_1 con ST_5

Cálculos.

- a) Cuando el valor promedio del St'_3 es mayor que el valor promedio del St_3 :

$$\begin{array}{l} St'_3 - St_3 = x \\ \text{diámetro} \\ \text{problema} \end{array} - x = A * (\text{diámetro que se interpola en la} \\ \text{curva de regresión})$$

- b) Cuando el valor promedio del St'_3 es menor que el de St_3 :

$$\begin{array}{l} St_3 - St'_3 = x \\ \text{problema} \end{array} + x = A *$$

R E S U L T A D O S

En la Tabla No. 3 se muestran los resultados totales de este estudio. En la primera columna aparece el número que cada planta tiene de acuerdo a la Tabla No. 2 y en la segunda, se indica la parte utilizada para el análisis. En esta columna, la palabra "completa" significa: vaina con semilla; "semilla", implica la semilla entera y "cáscara" indica la cubierta de la propia semilla. (testa)

La tercera columna da el resultado del análisis cualitativo para saponinas. La columna que sigue, corresponde a la concentración de saponinas. La cuarta columna indica la cantidad de polifenoles totales en 100 g. de muestra. La que sigue, solo corresponde a taninos y la última, da las Unidades de antibiótico a que corresponde la inhibición que presenta un gramo de muestra.

Enseguida se hace un análisis de los resultados obtenidos:

De las plantas utilizadas para la determinación de saponinas, solo el 35.5% contiene una concentración medible de éstas.

TABLA 2

NO.	NOMBRE COMUM	NOMBRE CIENTIFICO
1	Acacia	Delonix regia
2	Jinicuil	Inga sp.
3	Alampepe	Entada scandens
4	Algarrobo	Acacia pennatula
5	Barbasco	Dioscorea sp.
6	Botil No. 0.01	Phaseolus coccineus
7	Botil No. 101	Phaseolus coccineus
8	Botil colorado	Phaseolus coccineus
9	Botil romerillo	Phaseolus coccineus
10	* *	Callophilum brasiliensis
11	* *	Caesalpinia glabra
12	* *	Cassia tora
13	Cedrillo	Guarea excelsa
14	Chupabaya	Mucuna argyrophylla
15	Frijol colorado de suelo	Phaseolus vulgaris
16	Frijol colorado de la vega	Phaseolus vulgaris
17	Frijol de vara	Phaseolus vulgaris
18	Frijol negro de enredo	Phaseolus vulgaris
19	Frijol patashete	Phaseolus lunatus
20	Guázumo	Ulmifolia sterculiaceae
21	Guinolo	Acacia coeliacantha
22	Maguacata	Pithecellobium flexicaule
23	Nescafé	Stizolobium cinerium
24	Orejuelo	Cymbopetalum penduliflorum
25	Palo de gusano	*
26	Palo fierro	Pithecellobium undulatum
27	Parota	Enterolobium cyclocarpum
28	Pata de vaca	Bauhinia purpurea
29	Saca manteca	Solanum verbascifolium

* Se desconoce el nombre científico.
 * * Se desconoce el nombre común.

T A B L A 3

CONTENIDO DE SAPONINAS, POLIFENOLES, TANINOS Y SUBSTANCIAS CON ACTIVIDAD ANTIBIOTICA.

No. de Muestra	Parte	Cual. Sap.	<u>g. Sap.</u> 100 g. M.	<u>g. Polif. T</u> 100 g. M.	<u>g. Tánico</u> 100 g. M.	<u>U. Antib.</u> g. M.
1	completa	-		1.76	1.03	
1	vaína	-		1.82	1.14	
2	semilla	+	0.44			
3	"	+	0.79	4.38	2.16	
4	completa	+	0.02			
4	semilla	+	trazas	0.73	0.28	
5	rizoma	+	21.10	0.32	0.00	
6	semilla	+	0.09	1.06	0.75	
7	"	- - -	- - -	0.34	0.00	
8	"	+	0.02	0.46	0.00	
9	"	+	0.03			
10	"	-		0.60	0.00	0.44 B.

TABLA 3 (continuación)

No. de Muestra	Parte	Cual. Sap.	g. Sap. 100 g. M.	g. Polif. T 100 g. M.	g. Táxico 100 g. M.	U. Antib. g. M.
11	semilla	-		2.58	0.88	0.84 +B.
12	"	-		0.76	0.00	2.00 +B. 2.50 +P.
13	semilla	-		0.38	0.09	0.33 B.
14	Endosp.	- - -	- - -	12.95	6.47	
15	semilla	+	0.02	0.30	0.08	
16	"	+	0.01	0.29	0.02	
17	"	+	0.10			
18	"	+	trazas	0.52	0.20	
19	"	+	0.02	- - -	- - -	
20	"	-		- - -	- - -	2.00 B. 2.60 +B.
21	completa	+	0.22	- - -	- - -	
22	semilla	+	0.03	0.35	0.08	

TABLA 3 (continuación)

No. de Muestra	Parte	Cual. Sap.	<u>g. Sap.</u>	<u>g. Polif. T</u>	<u>g. Tánico</u>	<u>U. Antib.</u>
			100 g. M.	100 g. M.	100 g. M.	g. M.
23	semilla	+	0.01	6.15	0.00	
24	cáscara	-		1.14	0.45	24.60 B.
25	completa	+	0.94	- - -	- - -	
26	semilla	+	0.65	0.24	0.00	
26	cáscara	+	0.86	0.64	0.00	
27	completa	+	- - -	0.46	0.00	
27	semilla	+	0.03	- - -	- - -	
27	Endosp.	+	0.01	0.16	0.00	
27	cáscara	+	1.74	0.81	0.03	
28	semilla	-		0.66	0.00	154.00 B. 140.00 P.
29	fruto	-		0.95	0.30	0.33 B.

- - - No se Det.
 B Bacitracina
 (Extr, acuoso)

+B Bacitracina (Extr. mezcla)
 P Penicilina (Extr. acuoso)
 +P Penicilina (Extr. mezcla)

En las muestras de *Pithecellobium undulatum* y *Enterolobium cyclocarpum* se observa que existe un mayor contenido de saponinas en cáscara que en el resto de la semilla. Se nota algo similar con respecto a taninos.

De los frijoles estudiados, el de Vara es el que presenta la más alta concentración de saponinas.

Las leguminosas que tienen alta proporción de saponinas hemolíticas son:

<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Cásc.)	-----	1.74 g/100 g.M.
<i>Pithecellobium undulatum</i> (Cásc.)	-----	0.86 "
<i>Entada scandens</i>	-----	0.79 "

En ningún caso se observa que el ácido tánico sea el único compuesto fenólico. Por el contrario, de las muestras con compuestos polifenólicos: el 42.3% no tienen taninos; en el 50.0%, el ácido tánico constituye menos de la mitad ellos y solo en *Delonix regia* y en el *Phaseolus coccineus* (Botil No. 0.01) aparece en mayor proporción.

En la misma Tabla, se observa que la mayor parte de las muestras estudiadas mostraron presencia de taninos. En cambio, pocas fueron las que tienen saponinas.

En la Tabla 4, se puede ver que la mayor parte de los compuestos que inhibieron a *Sarcina subflava* son solubles en

T A B L A 4

ACTIVIDAD ANTIBIOTICA

No. de Muestra	Parte	Extracto	<u>U. Bacitr.</u> g. M.	<u>U. Penic.</u> g. M.
10	semilla	<u>acuoso</u>	0.44	
11	semilla	<u>mezcla</u>	0.84	
12	semilla	<u>mezcla</u>	2.00	2.50
13	semilla	<u>acuoso</u>	0.33	
20	semilla	<u>acuoso</u>	2.00	
		<u>mezcla</u>	2.60	
24	cáscara	<u>acuoso</u>	24.60	
28	semilla	<u>acuoso</u>	154.00	140.00
29	fruto	<u>acuoso</u>	0.33	

Mezcla = DMS- AGUA- METOH

Acuoso = Buffer de fosfatos al 1%, pH 6

agua, al igual que el antibiótico correspondiente. Además, del conjunto de plantas probadas, solo dos son capaces de inhibir a *Staphylococcus aureus* y ellas son: *Bauhinia purpurea* y *Cassia tora*.

D I S C U S I O N

El método para determinar saponinas fué desarrollado en esta tésis, tomando como base el de Monroe, E., et al (17). Hay que decir, que aunque involucra un gran número de variables, como son: contacto de la sangre con las superficies, agitación, procedencia de la sangre, tiempo, etc., que son susceptibles de controlarse, es una técnica rápida, sí se compara con aquella en la que se usan placas de agar-sangre. Tiene la ventaja, de que se pueden determinar saponinas tanto triterpenoides como esteroides y por otro lado, la desventaja de que utiliza mayor cantidad de sangre.

En relación con los valores obtenidos para saponinas, hay que tener en cuenta, que son los que corresponden a las saponinas con actividad hemolítica (6). A su vez, existe la posibilidad de que en estos valores se halle involucrado el efecto hemolítico de otro tipo de glucósido (55). Esto es un tanto difícil de evitar, debido a que diversas clases de glucósidos comparten ciertas propiedades, más no imposible. Se puede proceder, haciendo una serie de extracciones para eliminar materiales indeseables.

Por otro lado, si la presencia de taninos trae como consecuencia la coagulación de la hemoglobina (13), constituye un efecto enmascarante de la actividad hemolítica. Como se observa, este es un factor decisivo en la determinación. Pero cuando en un trabajo la cantidad de muestra a usar es limitante, es imposible hacer depuraciones previas y a lo más que se aspira es a analizar extractos crudos. A pesar de ello en este estudio, las muestras que tienen alto contenido de taninos, presentan hemólisis. Sin embargo, quedaría la duda si la cantidad reportada de saponinas hemolíticas es la verdadera. De cualquier forma, se aconseja eliminar lo más posible las sustancias que representan interferencias en la determinación.

El hecho de que el *Pithecellobium undulatum* y *Enterolobium cyclocarpum* presenten un mayor contenido de taninos y saponinas en la cáscara que en el resto de la semilla, está de acuerdo con la teoría de que estos compuestos protegen a las plantas del ataque por microorganismos e insectos (6, 21).

Continuando con el análisis, se puede observar que no hay correlación entre actividad antibiótica hacia los microorganismos estudiados y concentraciones de saponinas y/o polifenoles. Por ejemplo, la *Bauhinia purpurea* y la cáscara de *Cymbopetalum penduliflorum*, que presentan una alta actividad

antimicrobiana, tienen bajo o nulo contenido de saponinas y polifenoles. Sin embargo, es posible que bajas concentraciones de estas sustancias sean capaces de inhibir a otros microorganismos (46, 47). Por otra parte, el poder antimicrobiano detectado puede ser debido a la presencia de un verdadero antibiótico. Esto no se pudo verificar debido a la gran cantidad de sustancias que interfieren en la medición.

C O N C L U S I O N E S

Las conclusiones que se pueden sacar de este estudio son las siguientes:

Las plantas utilizadas tienen muy bajo contenido de saponinas con capacidad hemolítica, a excepción del *Enterolobium cyclocarpum*, Palo de Gusano, *Pithecellobium undulatum* y obviamente la *Dioscorea* sp.

La *Mucuna argyrophylla* y *Entada scandens* poseen las más altas concentraciones de taninos, cosa que aunada a la presencia de otros factores tóxicos, limita su aprovechamiento en la alimentación.

Con respecto al poder antibiótico buscado en las plantas seleccionadas, hay que hacer notar que en *Bauhinia purpurea* y cáscara de *Cymbopetalum penduliflorum* es alto. Esto es de gran importancia en la industria farmacéutica y requiere un estudio más minucioso.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- George, A. J. "Legal status and toxicity of saponins".
Food Cosmet. Toxicol., 3: 85- 91, 1965.
- 2.- Walter, E. D. "Isolation of a saponin, hederin, and its sapogenin, hederagin, from burclover (Medicago hispida)".
J. Am. Pharm. Assoc., 46: 466-467, 1957.
- 3.- Walter, E. D. "Note on saponins and their sapogenins from strawberry clover". J. Am. Pharm. Assoc., 49: 735-736, 1960.
- 4.- Walter, E. D. "Isolation of oleanolic acid and saponin from trefoil (Lotus corniculatus, var. viking)". J. Pharm. Sci., 50: 173, 1961.
- 5.- Hashizume, A. and Y. Sakato. "Saponin from the leaf of Thea sinensis. I.- Isolation of the saponin from the leaf of Thea sinensis and its properties". Chem. Abstr., 1966, 64, 13019 c.
- 6.- Liener, I. E. "Toxic constituents of plant foodstuffs". Academic Press, Inc. U. S. A., 1969. pp. 169-210.
- 7.- Nord, E. C. and G. R. Van Atta. "Saponin - a seed germination inhibitor". Forest Sci., 6: 350-353, 1960.
- 8.- Shany, S., Y. Birk, B. Gestetner and A. Bondi. "Preparation, Characterization and some properties of saponins from Lucerne tops and roots". J. Sci. Fd. Agric., 21: 131-135, 1970.
- 9.- Schaible, P. J. "Poultry, feeds and nutrition". AVI, Publ

shing Co., Inc. U. S. A., 1970. p. 184.

- 10.- Ishaaya, I. and Y. Birk. Soybean saponins. IV.- "The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzymes". J. Food Sci., 30: 118-120, 1965.
- 11.- Schlösser, E. "Interaction of saponins with cholesterol, lecithin and albumin". Can. Jour. Physiol. and Pharmacol. 47: 487-489, 1969.
- 12.- Schmidt-Thome, J. and F. Prediger. "Hemolysis with saponins". Z. Physiol. Chem., 286: 127-138, 1950.
- 13.- Jones, M. and F. C. Elliott. "Two rapid assays for saponin in individual alfalfa plants". Crop. Sci., 9: 688-691, 1969.
- 14.- Gestetner, Y., Y. Assa, Y. Henis, Y. Tencer, M. Rotman, Y. Birk and A. Bondi. "Interaction of lucerne saponins with sterols". Biochim. Biophys. Acta., 270: 181-187, 1972.
- 15.- Birk, Y., A. Bondi, B. Gestetner and I. Ishaaya. "A thermostable haemolytic factor in soybeans". Nature, 197: 1089-1090, 1963.
- 16.- Gestetner, B., Y. Assa, Y. Henis, Y. Birk and A. Bondi. Lucerne saponins. IV.- "Relationship between their chemical constitution and hemolytic and antifungal activities". J. Sci. Fd. Agric., 22: 168-172, 1971.
- 17.- Monroe, E., C. Wall, E. Roland, M. L. McClennan and M. E. Klumpp. "Detection and estimation of steroidal saponinogenins in plant tissue". Anal. Chem., 24(8): 1337-1341, 1952.
- 18.- Bozidar LJ. Milié. Lucerne saponins. I.- "Content and

composition during growth". J. Sci. Fd. Agric., 23:
1151-1156, 1952. → 1972

- 19.- Salisbury and Ross. "Plant Physiology". Wadsworth Publishing Co., Inc. U. S. A., 1969. pp. 352, 483 y 489.
- ✓ 20.- Casamada, M. "Farmacognosia con Farmacodinamia". Editorial Científico-médica. España, 1968.
- 21.- Fieser & Fieser. "Química orgánica superior". Vol. I. (Traducción). Grijalbo, S. A. España, 1966. p. 896.
- 22.- Loomis, W. D. and J. Battaille. "Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes". Phytochem., 5: 423-438, 1966.
- 23.- Carrera, G., S. Mitjavila. "Effect of tannic acid on vitamin B₁₂ disposability in the rat". Chem. Abstr., 79: 90863s, 1973.
- 24.- Carrera, G. "Mecanism of action of tannic acid on vitamin B₁₂ availability in the intestine". Chem. Abstr., 80: 104687x, 1974.
- 25.- Peaslee, M. "Tannic acid-induced alterations in mouse growth and pituitary melanocyte-stimulating hormone activity". Toxicol. Appl. Pharmacol., 25(4): 507-514, 1973.
- 26.- Glick, Z. and M. A. Joslyn. "Food intake depression and other metabolic effects of tannic acid in the rat". J. Nutr., 100:509-515, 1970.
- 27.- Rayudu, G. V. N., R. Kadirvel, P. Vohra and F. H. Kratzer. "Toxicity of tannic acid and its metabolites for chickens". Poultry Sci., 49: 957-960, 1970
- 28.- Joslyn, M. A. and Z. Glick. "Comparative effects of ga-

- llo-tannic acid and related phenolics on the growth of rats". *J. Nutr.*, 98: 119-126, 1969.
- 29.- Glick, Z. and M. A. Joslyn. "Effect of tannic acid and related compounds on the absorption and utilization of proteins in the rat". *J. Nutr.*, 100: 516-520, 1970.
- 30.- Chang, S. I. and H. L. Fuller. "Effect of tannin content of grain sorghums on their feeding value for growing chicks". *Poultry Sci.*, 43: 30- 36, 1964.
- 31.- Fuller, H. L., S. I. Chang and D. K. Potter. "Detoxication of dietary tannic acid by chicks". *J. Nutr.*, 91: 477-481, 1967.
- 32.- Connor, J. K., I. S. Hirwood, H. W. Burton and D. E. Fuelling. "Some nutritional aspects of feeding sorghum grain of high tannin content to growing chickens". *Austr. J. Expt. Agric. Animal Husb.*, 9:497-501, 1969.
- 33.- Rungruangsak, K., P. Tosukhowong, B. Panijpan and S. L. Vimokesant. Chemical interaction between thiamin and tannic acid. I.- "Kinetics, oxygen dependence and inhibition by ascorbic acid". *Am. J. Clin. Nutr.*, 30: 1680- 1685, 1977.
- 34.- Derichman, W. B. and H. W. Gerarde. "Toxicology of drugs and chemicals". Academic Press, U. S. A., 1974.
- 35.- Kositawattanakul, T., P. Tosukhowong, S. L. Vimokesant and B. Panijpan. Chemical interaction between thiamin and tannic acid. II.- "Separation of products". *Am. J. Clin. Nutr.*, 30: 1686-1691, 1977.
- 36.- Armstrong, W. D., J. C. Rogler and W. R. Featherston. "Effect of pericarp removal on the performance of chicks

- fed bird resistant sorghum grain diets". Poultry Sci., 52: 996, 1973.
- 37.- Cummings, D. P. and J. D. Axtell. "Effect of tannin content of sorghum grain on nutritional quality". Research Progress Report on Inheritance and Improvement of Protein Quality and Content in Sorghum. Purdue University, 1973. pp. 85-111.
- 38.- West, J. W. "Grain sorghums in poultry rations". Grain Sorghum Products Association. Amarillo, Texas, 1961.
- 39.- Peterson, V. E. "A comparison of the feeding value for boilers of corn, grain sorghum, barley, wheat and oats and the influence of the various grains on the composition and taste of broiler meat". Poultry Sci., 48: 2006-2013, 1969.
- 40.- Potter, D. K. and H. L. Fuller. "Metabolic Fate of dietary tannins in chickens". J. Nutr., 96: 187-191, 1968.
- 41.- Armstrong, W. D., W. R. Featherston and J. C. Rogler. "Influence of methionine and other dietary additions on the performance of chicks fed bird resistant sorghum grain diets". Poultry Sci., 52: 1592-1599. 1973.
- 42.- Maxson, E. D., L. E. Clark, L. W. Rooney and J. W. Johnson. "Factors affecting the tannin content of sorghum grain as determined by two methods of tannin analysis". Crop. Science, 12: 233-235, 1972.
- 43.- Stephenson, E. L., J. O. York, D. B. Bragg and C. A. Ivy. "Comparative feeding values of brown and yellow grain sorghum". Feedstuffs, 40(21): 112-114, 1968.
- 44.- Talmadge, S. N., E. L. Stephenson, A. Burgos, J. Floyd and J. O. York. "Effect of tannin content and dry matter digestion on energy utilization and average amino acid availability of hybrid sorghum grains. Poultry

Sci., 54: 1620-1623, 1975.

45.- Price, M. L. and L. G. Butler. "Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain". J. Agric. Food Chem., 25(6): 1268-1273, 1977.

→ 46.- Wolters, B. "The antibiotic action of saponins. III.- "Saponins as plant fungistatic compounds". Planta, 79(1): 77-83, 1968.

47.- Wolters, B. The antibiotic action of saponins.

IV.- "Antibiotic effect of neutral steroid glycosides with and without saponin characteristics". Planta Med., 16(1): 114-119, 1968.

→ 48.- Boakye-Yiadom, K. and G. H. Konning. "Incidence of anti bacterial activity in the Connaraceae". Planta Med., 28: 397-400, 1975.

→ 49.- Jurd, L., J. Corse, A. D. King, Jr., H. Bayne and K. Mihara. Antimicrobial properties of 6, 7-dihydroxy-, 7, 8-dihydroxy-, 6-hydroxy- and 8-hydroxycoumarins. IV.- "Antimicrobial properties of natural phenols". Phytochem., 10: 2971-2974, 1971.

50.- Grove & Randall, F. D. A. 146a. 24 (Penicilina G. Sódica)

51.- F. D. A. 146c - 401-F-1 (Bacitracina)

52.- Code of Federal Regulation, Título 21, parte 436.500. 1976.

53.- DIFCO Manual, of Dehydrated Culture, Media and Reagents for Microbiological and Clinical laboratory Procedures. Detroit, Mich., 1953.

54.- Sotelo, A. and V. Sousa. "Disc microbiological method for the determination of lysine or methionine in protein

hydrolysates". Nutr. Reports International, 14(3):
337-343, 1976.

55.- Heftmann, E. "Steroid Biochemistry". Academic Press.
U.S.A., 1970. p. 40.