

2ej' 125

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



**METODOS USADOS PARA LA
DETERMINACION DE
SAPONINAS**

**TRABAJO MONOGRAFICO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ANGEL URIBE LAMAS**

MEXICO, D. F.

1987



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 está 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.

I N D I C E

- I. INTRODUCCION
- II. GENERALIDADES
- III. METODOS DE ANALISIS
- IV. CONCLUSIONES
- V. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

Existe una gran variedad de plantas que juegan un papel importante en la alimentación humana y otras tantas que se usan para la alimentación de animales. Sin embargo, muchas veces su consumo se ve limitado por la presencia de ciertas sustancias de naturaleza química que las hacen potencialmente nocivas y a cuya presencia no se le ha dado suficiente importancia.

Entre dichas sustancias se encuentran las saponinas, éstas se localizan en muchas plantas alimenticias y en forrajes como: espinacas, betabel, espárragos, castañas de la india, soya (1), nopales, hojas de té (2), sorgo (3), alfalfa (4), agave (5), trébol (6), etc. También se han encontrado en el veneno de las serpientes, en las estrellas de mar y en el pepinillo de mar (7).

La mayoría de los efectos biológicos causados por las saponinas se deben a su capacidad de disminuir la tensión superficial y a su habilidad para formar complejos con esteroides y proteínas; debido a esto, se está estudiando la posibilidad de utilizarlas en la dieta para reducir el nivel de colesterol en el suero e hígado (4,8). Además, se sabe que no son tóxicas al nivel permisible cuando son ingeridas por el hombre, ya que la propiedad espumante de algunas bebidas como la cerveza, se debe en parte a la presencia de saponinas (8).

La función de las saponinas en las plantas aún se desconoce, pero parece que algunas de ellas sirven como reserva de carbohidratos, mientras que otras, parecen ser desechos metabólicos o posibles factores de resistencia de las semillas al ataque de los insectos (4).

Por todo lo anterior, el propósito de este trabajo es haceer una revisión acerca del conocimiento de las saponinas, dando particular interés a los métodos usados para su determinación.

II. GENERALIDADES .

El conocimiento y estudio de las saponinas ha tenido un incremento notable en los últimos tiempos debido principalmente, a su posición de precursoras para la síntesis de hormonas esteroidales. Muchas y muy variadas son las plantas que las contienen y su conocimiento data de muchos años atrás.

El término "saponina" (del Latín sapon=jabón), fue empleado por primera vez en el año de 1811, por el Químico Bucholtz (9) para designar sustancias de naturaleza heterocíclica; neutras o ácidas, que presentaban como carácter común, la formación de soluciones "falsas", que por agitación producían una espuma persistente.

En México los Aztecas designaban a éstas sustancias con la palabra "amolli", utilizándolas para lavar con magníficos resultados, ya que no alteraban los colores de las telas. -- Ellos ya hacían la distinción de "amoles bravos", los que provocaban picazón y "amoles mansos", los que no producían ningún efecto cutáneo (10).

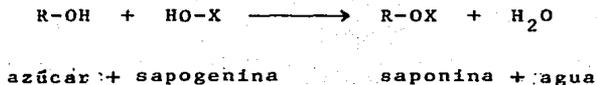
II.a) ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS SAPONINAS

Las saponinas son sustancias en su mayor parte amorfas y sus soluciones coloidales al producir espuma, reducen fuerte--

mente la tensión superficial, por lo que pueden estabilizar - las emulsiones de grasas y aceites, siendo difícil romperlas. En general son inoloras, de difícil cristalización, de sabor acre persistente y con propiedades estornudatorias muy marcadas, irritan los ojos y la piel cuando se frota, presentan - la cualidad de hemolizar los glóbulos rojos de la sangre aún a altas diluciones, son tóxicas para los peces y anfibios y - forman complejos con el colesterol y otros hidroxiesteroides.

Son solubles en agua; en alcohol se disuelven casi totalmente, aumentando su solubilidad con el grado de hidratación - y temperatura. Al enfriarse las saponinas se precipitan. En los disolventes orgánicos como el éter de petróleo o sulfúrico, benceno, cloroformo y sulfuro de carbono, son insolubles. En ácido sulfúrico concentrado, las soluciones de saponinas - producen una coloración que varía del rojo al violeta. Las soluciones de saponinas en alcohol reaccionan con soluciones alcohólicas de colesteroína, formando precipitados característicos (11).

Las saponinas son compuestos anfifílicos, en los cuales - los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos) están enlazados a un grupo no polar (la sapogenina), el cual puede ser - ya sea un esteroide o un triterpeno, aunque la mayoría de las sapóninas que han sido identificadas son triterpenoides.



Las saponinas aparecen casi exclusivamente en plantas, - los únicos organismos que se conocen que contienen saponinas - son ciertas especies de estrellas de mar (12). De la amplia - variedad de plantas que contienen saponinas, solamente unas po - cas son usadas como alimento humano, debido posiblemente al sa - bor amargo que las caracteriza.

Existe una gran variación, si se comparan saponinas de di - ferente fuente. Así, las saponinas de la soya no forman com - plejos con el colesterol y otras como las de una variedad de - trébol no son tóxicas hacia los peces y no hemolizan (7). Tam - bién se ha de tener muy en cuenta que en una misma planta pue - den encontrarse varios tipos de saponinas y por ende, cada una de ellas poseerá características o potencias diferentes aunque compartan una misma acción. Considerando a la soya como un - ejemplo típico, se han identificado 5 saponinas, (fig. 1) - que se encuentran enlazadas a tres monosacáridos, los cuales - pueden ser combinaciones de cualquiera de los siguientes com - puestos: galactosa, arabinosa, raminosa, glucosa, xilosa o áci - do glucorónico (13).

Las propiedades lipofílicas e hidrofílicas de las saponi-

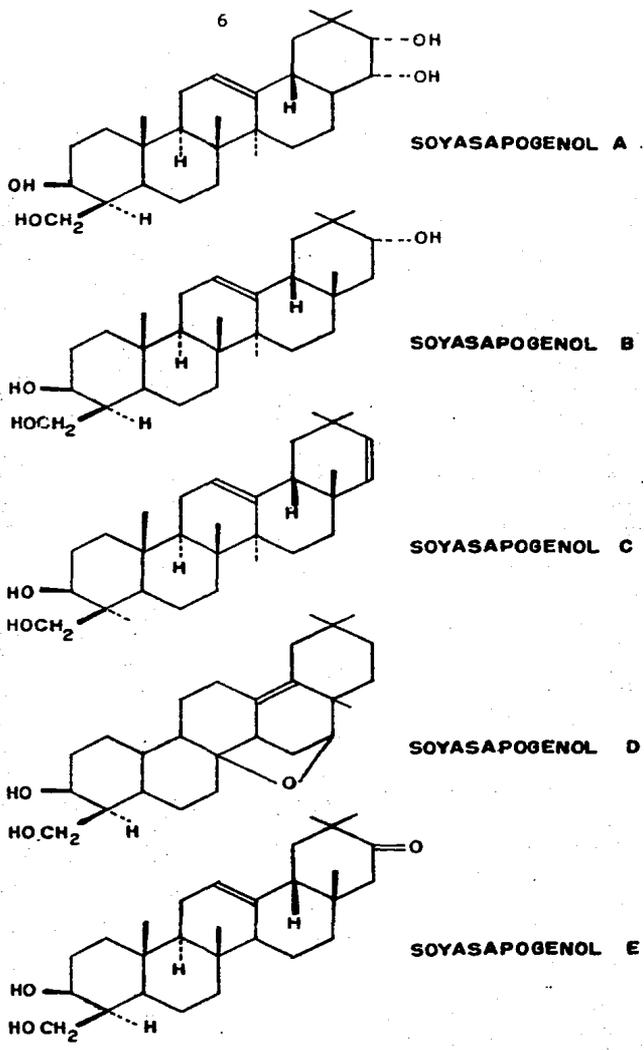


FIG.1 SAPOGENINAS DE LA SOYA

nas, su actividad de superficie y la habilidad de emigrar en - medios diferentes, así como la propiedad de combinarse con esteroides, están determinados por la combinación de las sapogeninas y carbohidratos en la molécula.

La dificultad de separación de estas mezclas de complejos y la obtención de materiales puros, es uno de los mayores problemas en el estudio de las propiedades de las saponinas. Su naturaleza anfifílica hace que dominen sus propiedades físicas en solución.

Por ser tensoactivas y actuar como agentes emulsificantes, se aprovechan para fines tecnológicos tales como elaboración de detergentes, shampoos y bebidas carbonatadas (14).

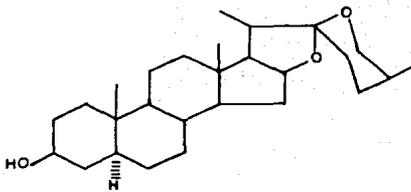
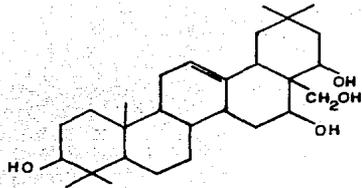
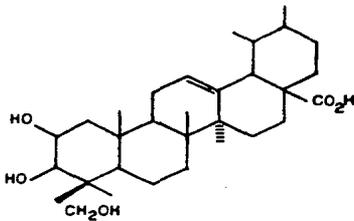
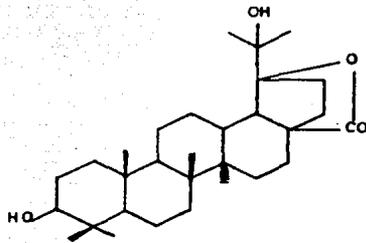
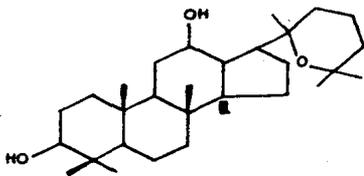
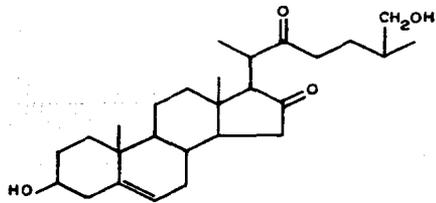
Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona llamada genéricamente sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroide tipo colano como en la esmilagenina (a), o de triterpeno tipo α -amirina como en la chichipegenina (b) tipo β -amirina, como en el ácido asiático (c); tipo lupeol, como en la estallogenina (d); o de tipo tetracíclico como en el panaxodiol (e). Con excepción de la criptogenina (f), el sistema espiroacetal [anillos E y F de (a)] es una característica general de las sapogeninas esteroideas y es variable el número de insaturaciones, hidroxilos, grupos cetóni-

cos y otros grupos oxigenados, como lo ejemplifican la hecogenina (g), diosgenina (h) y digitogenina (i).

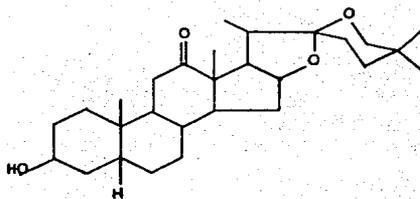
Las agliconas triterpenoides están también representadas por el ácido queretaroico (j) y la dumortierigenina (k) (ver - fig. 2). El enlace glicósido siempre se forma con el oxígeno del carbono 3. Se conocen más de 200 saponinas esteroidales, - localizadas en las monocotiledóneas (lileáceas, amarilidáceas y dioscoreáceas, principalmente, como excepción en sacrofula-- rriaceas) y otras tantas saponinas triterpenoides, aisladas -- principalmente en dicotiledóneas.

Ambos grupos de saponinas se han aislado en diversos órga nos vegetales; así, la sarsaponina se ha encontrado en las raf ces de la zarzaparrilla mexicana; la idosina en los tubérculos de la Dioscorea tokaro; otras saponinas han sido aisladas en - las hojas de agaves y hasta en las flores y semillas, como en la Yucca schottii o en los frutos de la Sapindus Saponaria.

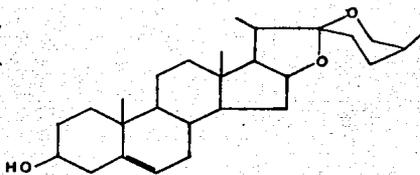
Las saponinas son sustancias muy polares y es posible ex- traerlas en caliente o frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Los materiales lipoides presentes en estos extrac- tos se separan con benceno. Al concentrar la solución alcohó- lica se separan las saponinas y después se cristalizan en mez- clas de alcohol-agua. Para obtener sapogeninas se pueden hi- drolizar las saponinas con sus enzimas naturales, con enzimas

**a. ESMILAGENINA****b. CHICHIPEGENINA****c. ACIDO ASIATICO****d. ESTALLOGENINA****e. PANAXADIOL****f. CRIPTOGENINA****FIG.2 FORMAS ESTRUCTURALES DE LAS SAPOGENINAS**

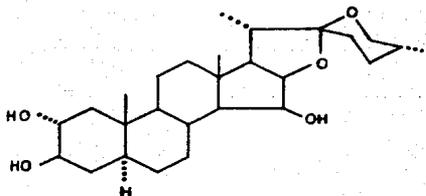
10



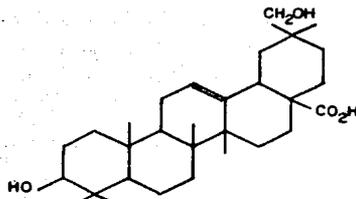
g. HECOGENINA



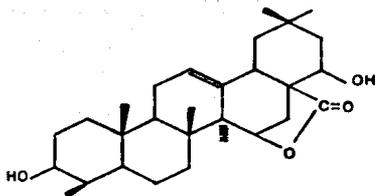
h. DIOSGENINA



i. DIGITOGENINA



j. ACIDO QUERETAROICO



k. DUMORTIERIGENINA

FIG.2 FORMAS ESTRUCTURALES DE LAS SAPOGENINAS (CONT.)

de origen microbiológico o hidrolizarlas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico (éste último se prefiere en el caso de saponinas insaturadas). Después, se extraen las saponinas, -- que son poco polares, con benceno, éter de petróleo o acetona y se recristalizan.

La presencia de las saponinas se averigua con las pruebas de la espuma y la de hemólisis. La identificación de los carbohidratos se efectúa mediante el uso de la cromatografía en papel, pruebas químicas, hidrólisis enzimáticas y cromatografía en fase de vapor de sus derivados trimetilsilados (15).

II.b) PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y NUTRICIONALES DE LAS SAPONINAS.

Las saponinas aparecen en numerosos remedios herbáceos; -- tanto de la cultura oriental como occidental, por ejemplo el -- orozuz, la zarzaparrilla y el ginsén (16). En general se ha -- observado que tienen propiedades expectorantes y antiinflamato -- rias pero probablemente la propiedad más importante, es que -- una dieta a base de saponinas reduce la concentración de coles -- terol en el plasma de los animales (17-21). Esta hipótesis se -- afirmó, en base a que algunas saponinas forman complejos inso -- lubles con el colesterol y de esta forma se inhibe la absorción -- a nivel intestinal aunque se ha demostrado en otros trabajos, -- que la disminución de la concentración del colesterol en plas -- ma se puede producir sin necesidad de que se forme un complejo

con la saponina (22). Otra afirmación; quizá la más probable, es que las saponinas inducen la absorción de ácidos biliares - por una dieta a base de fibras (23). Según parece, la absorción de saponina incrementa la pérdida de ácidos biliares por excreción fecal y esta disminución parece estar balanceada por una - conversión de colesterol en ácidos biliares en el hígado (24).

En la mayor parte de los vegetales que tienen un efecto - en la disminución del colesterol y en los animales se ha demostrado la presencia de saponinas (ver tabla 1) (25). También se ha demostrado que la hipercolesterolemia de los conejos sometidos a una dieta semisintética se reduce más cuando el componente protéico de la dieta es de origen vegetal. Examinando la lista de proteínas de Carrolls (tabla 2) se observa que aquellas - que tienen un efecto marcado en la disminución del colesterol - provienen de plantas que contienen saponinas. Así evidencias - acumuladas derivadas de los ensayos alimenticios incluyendo animales y humanos (ver tabla 1) sugieren que las saponinas (como un componente en los alimentos de origen vegetal) pueden ser un medio importante para disminuir la concentración de colesterol plasmático; ya que el incremento en la incidencia de alteraciones cardíacas coinciden con una disminución en el consumo de legumbres ricas en saponinas. Por otra parte, antes de proceder a hacer recomendaciones y pruebas alimenticias con humanos con el fin de considerar a las saponinas como un profiláctico para reducir el riesgo de afección cardíaca es necesario conocer al-

TABLA I

PLANTAS O PRODUCTOS DE PLANTAS REPORTADOS
PARA DISMINUIR LOS NIVELES DE COLESTEROL EN PLASMA

Materia vegetal (* Indica aquellos que son conocidos y contienen saponinas)	Animal de Experimentación	Referencia
* Alfalfa (<u>Medicago sativa</u>)	Conejo	(Horlick et. al. 1967)
* Avena	Pollo	(Fisher & Griminger 1967)
* Avena Industrializada	Hombre	(de goot et. al. 1963)
* Garbanzos (<u>Cicer arietinum</u>)	Hombre	
* Frijol garbanzo (<u>Phaseolus mungo</u>)	Hombre	
* Garbanzo verde (<u>Phaseolus radiatus</u>)	Hombre	(Mathur et. al. 1968)
Haba (<u>Dolichus biflorus</u>)	Hombre	
Garbanzo rojo (<u>Cajanus cajan</u>)	Hombre	
Frijoles (<u>Phaseolus vulgaris</u>)	Hombre	(Luyken et. al. 1962)
Paja de trigo	Conejo	(Moore, 1967)
Salvado de arroz	Rata	
Pectina	Hombre	(Keys et. al. 1961; Jenkins et. al. 1975)
Goma de mascar	Rata	(Riccardi & Fahrenbach, 1969)
Goma de mascar	Hombre	(Jenkins et. al. 1975)
Carageenan	Rata	(Riccardi & Fahrenbach, 1969)
* Proteína de soya texturizada	Hombre	(Sirtori et. al. 1977)
* Soya aislada	Conejo	(Carrull, 1677; Belton & Truswell, 1978)
* Lecitina de soya	Hombre	(Simons, 1978)

Datos tomados de "Saponins in food" (14)

TABLA 2
 EFECTOS DE PROTEINAS DE DIFERENTES FUENTES
 SOBRE LOS NIVELES DE COLESTEROL LIBRE PLASMATICO DE
 CONEJOS SOMETIDOS A UNA ALIMENTACION BASAL SEMISINTETICA^a

FUENTE PROTEINA	COLESTEROL DEL PLASMA (mg/ml) ^b
Huevo entero	235
Leche desnatada	230
Lactoalbúmina	215
Caseína	204
Pescado	166
Bistek de res	160
Bistek de puerco	110
Clara de huevo	105
Nabo silvestre	91
Gluten de trigo	80
Cacahuates ^c	80
Semilla de algodón	76
Semilla de sésamo ^c	70
Proteína de soya aislada ^c	67
Semilla de girasol ^c	53
Chícharo ^c	41
Frijoles Faba ^c	30

^a De Carroll (1977)

^b Promedio de 4-6 animales

^c Planta que contiene saponina

Datos tomados de "Saponins in food" (14)

go acerca de su toxicidad crónica. El Index Merck reporta que algunas saponinas son prácticamente no tóxicas al hombre por ingestión oral (26). Los extractos de plantas tales como el orozuz y la zarzaparrilla son permitidos como saborizantes de alimentos en Australia (National Health and Medical Research Council, 1976) Reino Unido y la U.S.A. (1).

La quillaia; una preparación comercial de saponina a base de la corteza del quillay (Quillaia saponaria) es permitida y reconocida como alimento de confianza en Reino Unido y la U.S.A. (1). (Los niveles usados en la U.S.A. se dan en la tabla 3) y en Reino Unido el extracto de Quillaia es permitido en bebidas suaves en no más de 200 p.p.m. como emulsificantes y estabilizadores en el acta de regularización de alimentos (Satutory Instrument 1975 No. 1486). Es notoria una incertidumbre acerca de la seguridad de las saponinas, ya que mientras en Alemania Oriental la Quillaia está prohibida como aditivo de alimento (1) así como en España y Marruecos (1). Reino Unido y la U.S.A., no tienen una legislación para controlar ninguna clase de saponinas. La toxicidad oral de un número de plantas se dan en la tabla 4. La dosis letal varía desde 25 a 3000 mg/Kg. de peso corporal.

Las saponinas que pasan a través del tracto digestivo pueden provocar severas lesiones de envenenamiento gastrointestinal (4). Cuando las saponinas entran al torrente sanguíneo pueden producir daños letales (la dosis letal intravenosa puede -

TABLA 3

CONCENTRACION PROMEDIO DE LA SAPONINA DE QUALLAIA
USADA EN ALGUNOS COMESTIBLES DE LOS ESTADOS UNIDOS*

Comestible	P.P.M.
Bebidas	95
Helados, nieves	0.12
Caramelos	18
Jarabes	6.8

* (National Academy of Sciences, 1965)

TABLA 4

TOXICIDAD ORAL DE ALGUNAS SAPONINAS^a

Fuente de Saponina	Animal	Dosis	Dosificación (mg/kg)	Referencia
<i>Sapindus saponindus</i>	Ratón	LD	3000	(Spector, 1956)
	Ratón	LD	1000	(Spector, 1956)
<i>Agrostemma githago</i> (common corn cockle)	Rata	LD ₅₀	50	(Vogel & Marek, 1962)
	Conejo	LD	56-62	(Spector, 1956)
	Perro	LD	20-25	(Spector, 1956)
<i>Saponaria vaccaria</i>	Ratón	LD ₅₀	960	(Abubakirov et. al.1960)
<i>Aesculus hippocastanum</i> (horse chestnut)	Rata	LD ₅₀	50	(Abubakirov et. al.1960)
<i>Hedera helix</i> (ivy)	Rata	LD ₅₀	100	(Abubakirov et. al.1960)
<i>Gypsophila paniculata</i>	Rata	LD ₅₀	50	(Vogel & Marek, 1962)
<i>Cyclamen europaeum</i>	Rata	LD ₅₀	160	(Vogel & Marek, 1962)
<i>Digitalis purpurea</i> (fox glove)	Rata	LD ₅₀	50	(Vogel & Marek, 1962)
	Ratón	LD	90	(Spector, 1956)

^a Versión condensada de datos recopilados por George (1965) (1)

ser mil veces más baja que la dosis letal oral (1). El resultado es, daño del hígado, hemólisis de los glóbulos rojos, deficiencia respiratoria, convulsiones y coma (27). La irritación del tracto gastrointestinal por alguna otra causa puede aumentar la susceptibilidad de los animales a la intoxicación con saponinas (28) y se ha sugerido que la ingestión continua de dosis subletales de saponinas pueden llevar a la corrosión del intestino o cirrosis hepática. Deberían evitarse alimentos que contengan saponinas ya sea de origen natural o artificial. Los efectos de la dosis subletales han sido investigadas para las saponinas de la alfalfa y la soya (4,29,30).

Las saponinas de la alfalfa son probablemente una causa de la impanítis de los rumiantes (29). También se ha demostrado que las saponinas bajan la proporción de crecimiento de las ratas (31) y de los pollos, además de que reduce la producción de huevo en las gallinas (4,30). Las saponinas de la soya en cambio, no tienen efecto sobre la proporción de crecimiento de los pollos (4) u otros animales (4,32). Hay también reportes, los cuales muestran efectos no adversos del consumo de otras saponinas a niveles subletales:

1.- Ewart (4) encontró que los conejillo de indias podían ser alimentados de plantas ricas en saponinas por más de 10 meses sin daño aparente. (Las plantas fueron Atalaya, hemi, glauca, Senecio, Jacobaca de Australia Central y Nueva Zelandia, -

respectivamente, estas plantas fueron investigadas porque se suponía que podrían intoxicar a las ovejas y al ganado).

2.- Oser (33) alimentó ratas durante 12 meses con dietas control y dietas conteniendo 0.05% de saponinas de quillaia o hasta 3% de saponina de la *Yucca Mohavensis* (una planta desértica de California). Las saponinas no tuvieron efectos adversos con respecto al crecimiento, utilización de alimento, hemograma, glucosa sanguínea o en el análisis de orina. Tampoco se notaron hallazgos histológicos en el post-mortem.

3.- Gaunt (34) en un experimento similar al anterior, alimentó ratas durante 13 semanas con dietas que contenían arriba de 4% de saponina de la quillaia. El no encontró anomalías y notó que no había diarrea u otro signo de irritación intestinal.

Desafortunadamente, estos estudios realizados fueron reportados con observación a corto plazo. Un estudio a largo plazo sobre la toxicidad de las saponinas ha sido recientemente reportado por Phillips et. al. (35). La saponina de la quillaia al nivel de 0.5% de la dieta, no tuvo efecto adverso sobre ratas durante un período de 84 semanas (27). Afirman que la saponina de la quillaia es también irritante al tracto gastrointestinal al ser usado internamente y la mayoría de las farmacéuticas advierten contra el uso interno de saponinas (1).

Así, la toxicidad crónica de las saponinas se tendrá que examinar con detalle antes que éstas puedan ser recomendadas - para su consumo en humanos o como medida de la disminución de - los niveles de colesterol del suero, una excepción podría ser, las saponinas consumidas en la forma de un producto alimenticio tradicional, tal como la soya.

Las saponinas y taninos, disminuyen la absorción de com-- puestos como: la vitamina B₁₂ (36,37) y compuestos nitrogenados (38,39). Impiden la acción de enzimas (40) y/o deprimen el ape- tito.

También se sabe que las saponinas actúan como irritante - de las mucosas nasales, ocular y bucofaringea, provocando hipe- remia y exceso de secreción. Se admite asimismo, una acción - glandular refleja transitoria, manifestada por diuresis. Los - nervios síáticos tanto sensitivos como motores, se paralizan - por la acción de las saponinas (41).

Por otro lado, se sabe que algunas saponinas y ciertos po- lifenoles actúan como antibióticos (40,42,43) Nord y Van Atta - (44), vieron que las saponinas son capaces de inhibir la germi- nación de las semillas. Por su parte, Mishustin y Pedersen, et al. (7), observaron que la saponina de la alfalfa inhibe la ger- minación 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 (4).

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

II.c). PLANTAS ALIMENTICIAS QUE CONTEENEN SAPONINAS

Una investigación del Chemical Abstract y revisiones previas de la literatura sobre saponinas reveló solamente 28 especies de plantas, también mencionadas en el Oxford Book of Plants (45), éstas están enlistadas en la tabla 5. De éstas, solamente 17 son usadas en gran cantidad dentro de cualquier arte culinario a nivel mundial. El resto son hierbas y especies, las - cuales no contribuyen significativamente en la ingestión dietética de saponinas.

Las fuentes más importantes de saponinas en la dieta del hombre son las legumbres, tales como: frijol, soya, chícharo, - garbanzos, cacahuates, habas, alubias y lentejas. La producción mundial y el consumo per-cápita de algunos de éstos son dados - en la tabla 6. El frijol soya parece ser la mejor fuente alimenticia de saponinas, son usados en una gran variedad de formas

TABLA 5

CONTENIDO DE SAPONINA EN ALGUNAS PLANTAS ALIMENTICIAS

Planta	Contenido de saponina (% en peso seco)	Referencia
Alfalfa (<u>Medicago sativa</u>) ^a	2-3	(Birk, 1969)
Soya	5.6 ^b	(Birk, 1969; Smith & Circle 1972)
Garbanzos (<u>Cicer arietinum</u>)	3.6	(Applebaum et. al., 1969)
Frijol-garbanzo (<u>Phaseolus mungo</u>)	-	(Basu & Rastogi, 1967)
Avena (<u>Avena sativa</u>)	0.1 - 0.3	(Tschesche & Wulff, 1969)
Berengena (<u>Solanum melongena</u>)	-	(Noble, 1948)
Espinaca (<u>Spinacea oleracea</u>)	-	(Kofler, 1927; Tschesche & Wulff 1969)
Cacahuate	-	(Applebaum et. al., 1969)
Amaranto (<u>Amaranthus spinosus</u>)	-	(Kofler, 1927)
Espárragos (<u>Asparagus officinalis</u>)	-	(Kawano et. al., 1977)
Habas (<u>Vicia faba</u>)	3.7	(Vinkler & Smyslova, 1967)
Fenogreco	-	(Valoshina et. al., 1977)
Frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>)	-	(Kretsu et. al., 1972)
Ajo (<u>Allium sativum</u>)	-	(Smoczkieviczowa & Nitschke 1975)
Ginsen	-	(Shibata, 1977)
Lenteja (<u>Lens culinaris</u>)	4	(Applebaum et. al., 1969)
Orozuz (<u>Glycyrrhiza macedonica</u>)	-	(Shibata, 1977)
Nuez moscada (<u>Myristica fragrans</u>)	-	(Varshney & Sharma, 1968)
Zarzaparrilla	-	(Kofler, 1927)
Remolacha (<u>Beta vulgaris</u>)	-	(Birk, 1969)
Girasol (<u>Helianthus annuus</u>)	-	(Chirva et. al., 1968)
Té (<u>Thea sinensis</u>)	-	(Kofler, 1927)
Batata	-	(Kofler, 1927)
Calabaza	-	(Kofler, 1927)
Espinaca de Nueva Zelanda (<u>Tetragonia expansa</u>)	-	(Kofler, 1927)
Orzaga (<u>Atriplex hortensis</u>) ^d	-	(Kofler, 1927)
Chícharo de jardín	2.5	(Applebaum et. al., 1969)

^a En Australia usualmente se comen los tallos.

^b Ver tabla (1)

^c Usada como espinaca en diferentes partes de los trópicos (Oxford Book of Food Plants, p. 160)

^d Un sustituto por espinaca o la acedera (Oxford Book of Food Plants)

Datos tomados de "Saponins in food" (14)

TABLA 6
PRODUCCION MUNDIAL Y PROMEDIO PER-CAPITA
DE ALIMENTOS CON MAYOR CONTENIDO DE SAPONINAS

	Soya	Cacahuates	Garbanzo	Semilla de sésamo	Lentejas
Producción (1975; 1000 toneladas) ^a	69670	19428	5569	1907	1104
Consumo per-cápita (g /años 1972 - 1974) ^b	2.56	1.26	2.48	0.22	-

^a Production year book, Food & Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. 1977.

^b Provisional food balance sheets, Food & Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. 1977.

y varios productos de soya, incluyendo la protefna de soya aislada, pueden contener cantidades importantes de saponinas (ver tabla 7). La próxima fuente más importante en la dieta de saponinas que le sigue son los chícharos, los cuales se consumen principalmente en los países orientales del mediterráneo, oriente medio, norte y este de Africa y partes de Asia.

II.d) QUIMICA DE LAS SAPONINAS ALIMENTICIAS.

Frijol soya.- Las sapogeninas y azúcares que han sido aisladas e identificadas (ver fig. 1) son ramnosa, galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa y ácido glucorónico. Las estructuras completas de tres de estas saponinas ya han sido determinadas (46). Estas son la soyasaponina I (el componente mayor) y las soyasaponinas II y III, todas éstas tienen la soyasapogenina B como la aglicona común. Las estructuras completas son mostradas en la fig. 3 (a), (b) y (c).

Alfalfa.- En trabajos recientes se identificaron los azúcares: glucosa, galactosa, xilosa y ramnosa y se demostró que los soyasapogenoles A, B y C (fig. 1) estuvieron presentes como agliconas (47). Las sapogeninas que se conocen hasta ahora parecen ser 5 soyasapogeninas con ácido medicagénico y hederagenina (fig. 3 d). Los azúcares son los mismos como en las saponinas de la soya (48).

La estructura de una de las saponinas ha sido establecida. (fig. 3e).

TABLA 7
 CONTENIDO DE SAPONINA EN ALGUNOS PRODUCTOS DE SOYA^a

Producto	% de saponinas (peso seco)
Soya entera	5.6
Cáscaras de soya	2.0
Flor de soya desengrasada	2.2
Promina-D ⁶	0.3
G. L. 750 ^C	0.8
Maxten C ^d	1.9
Maxten E ^d	2.5
Tofu ^e	2.1
Lecitina	2.9

^a Potter et. al. (1979)

^b Proteína de soya aislada obtenida de Central Soya Co. Inc. Illinois, U.S.A.

^c Proteína de soya aislada obtenida de Griffith Laboratories Pty Ltd., Victoria, Australia.

^d Proteína de soya texturizada obtenida de Miles Laboratories (Australia) Pty Ltd., Victoria, Australia.

^e Soya coagulada.

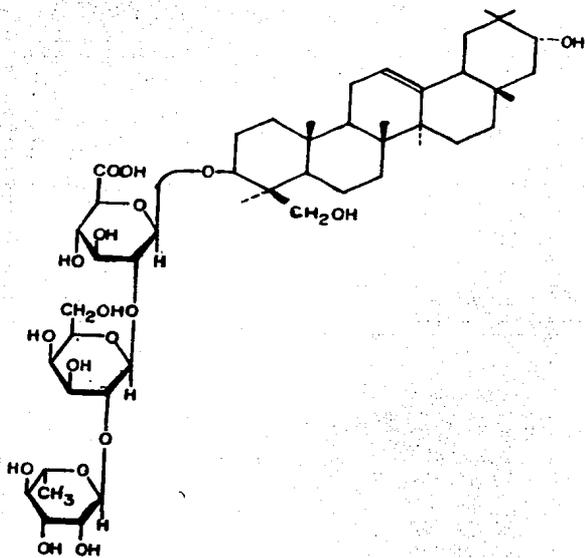


FIG. 3a SOYASAPONINA I

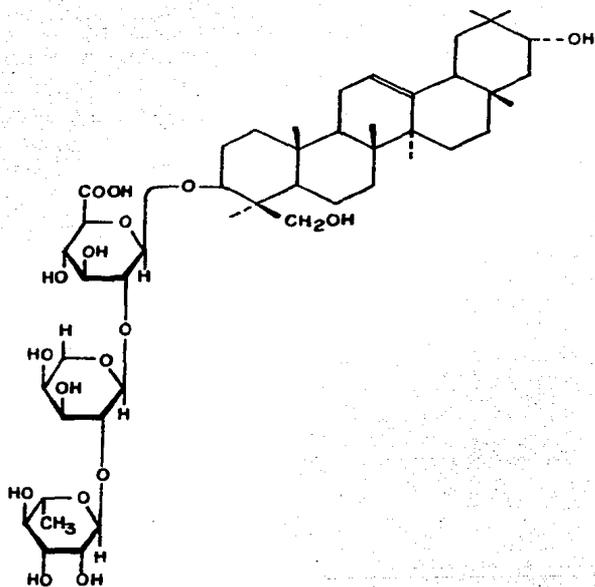


FIG.3b SOYASAPONINA II

27

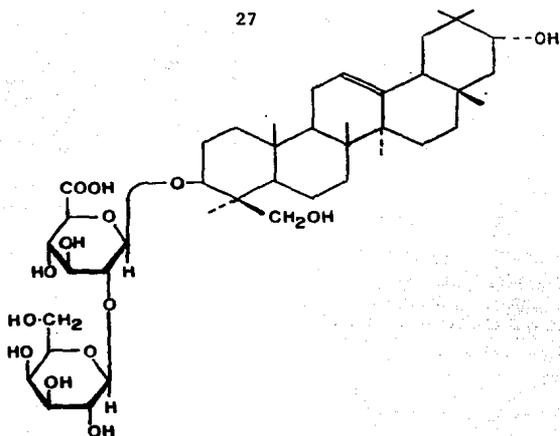
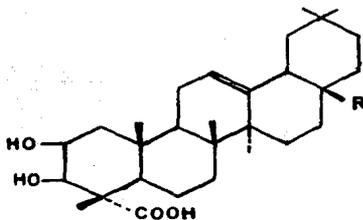


FIG. 3c SOYASAPONINA III



**FIG. 3d R=COOH ACIDO MEDICAGENICO;
R=CH OH HEDERAGENINA**

Remolacha Plateada y Azúcar de Remolacha.- La sapogenina más abundante es el ácido oleanólico fig. 3 (f) pero hay al menos otras 5. La fórmula estructural fig. 3 (g) de una de las saponinas ha sido establecida (49).

Espinacas.- Dos sapogeninas han sido identificadas, el ácido oleanólico fig. 3 (f) y la hederagenina fig. 3 (d) y la fórmula estructural ha sido reportada para dos de las saponinas (50).

Phaseolus radiatus (garbanzo hindú).- No se conoce todavía mucho acerca de las saponinas de estas especies. Ya ha sido identificada la soyasapogenol C (fig. 1) y los azúcares; glucosa, arabinosa, ramnosa y ácido glucorónico (14).

Phaseolus vulgaris (frijol).- Han sido aisladas 5 saponinas diferentes. Una sapogenina ha sido identificada (soyasapogenol E) con los azúcares; glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y ácido glucorónico (14).

Espárragos.- Estas son las únicas saponinas de esteroides conocidas presentes en plantas alimenticias. La fórmula estructural de dos de ellas fig. 3 (h,i) han sido recientemente reportados (51).

Avena.- Dos saponinas han sido reportadas y sus estruc-

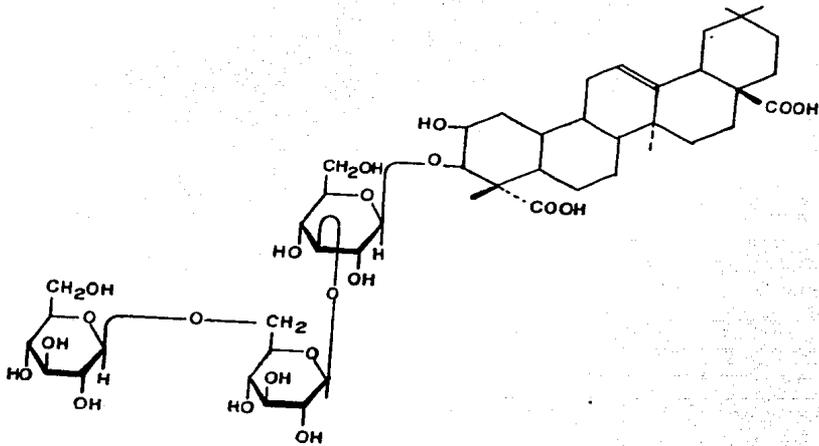


FIG. 3e SAPONINA DE ALFALFA

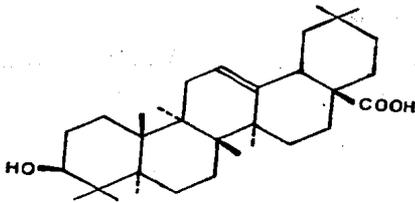


FIG. 3f ACIDO OLEANOLICO

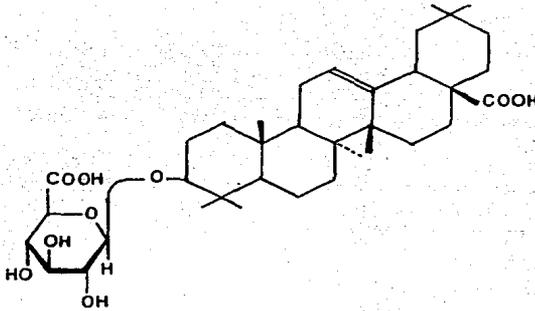


FIG. 3g SAPONINA DE REMOLACHA

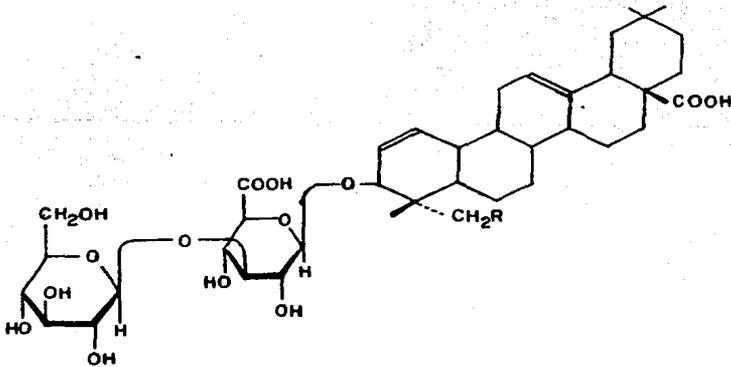


FIG. 3h SAPONINAS DE ESPINACA; R=H o OH

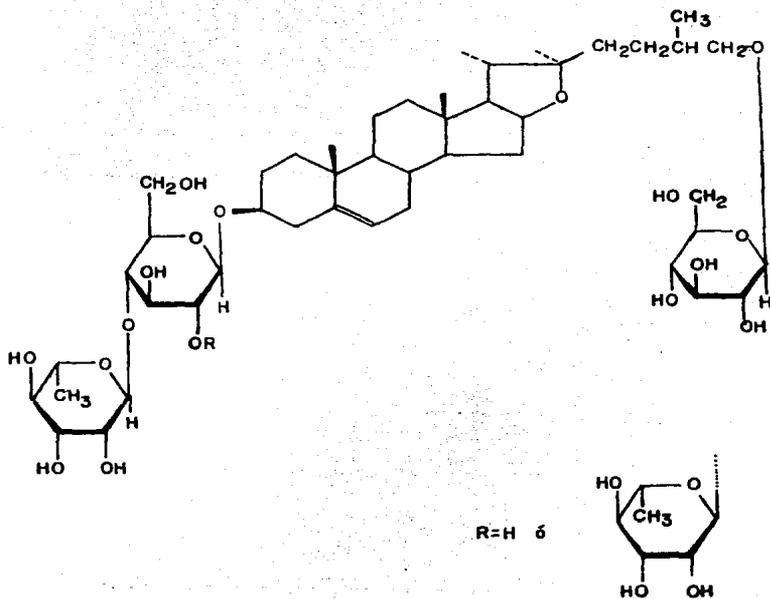


FIG.3I SAPONINAS DE ESPARRAGOS

turas investigadas, pero estos trabajos no están completos.

Semillas de Girasol.- Tres saponinas han sido identificadas; estas son las soyasaponinas A, B y C (fig. 1). Los azúcares que han sido identificados son; glucosa, arabinosa, xilosa y ramnosa (52). Todavía no hay información detallada sobre la estructura.

II.e) U S O S

Se les utiliza en la elaboración de bebidas suaves, cerveza, shampoos, jabones y extinguidores de fuego, también se usan para disminuir la tensión superficial de emulsiones fotográficas. Las que se hallan en los tubérculos de varias especies de Dioscórea, son fuentes importantes de materia prima para la síntesis de hormonas (progesterona y cortisona) y otros productos esteroides (53). Además actúan como estabilizadores de emulsiones. La saponina *Ruscus Aculeatus* puede usarse como agente espumante o como detergente. Las saponinas también se usan como protectores coloidales en rociadores de polvos saborizantes. Varias patentes utilizan la glycyrrhizina en forma de sales de amonio, sodio, potasio y colchicina. La glycyrrhizina se ha usado para el tratamiento de úlceras gástricas y dermatitis (54).

III. METODOS DE ANALISIS

IIIa. PROPIEDADES ESPECTRALES DE LAS SAPONINAS

a.1) Ultravioleta (U.V.)

Las saponinas y sus agliconas no absorben en el ultravioleta, ya que carecen de grupos cromóforos, pero dan coloraciones con varios reactivos ácidos, como el de Liebermann-Burchard, Sulkowski, cloruro de tionilo y tricloruro de antimonio; debido a ésto, las reacciones de las saponinas con dichos reactivos se han empleado para su cuantificación (15).

a.2) Infrarrojo (I.R.) (15,55)

Las saponinas pueden detectarse por medio de métodos hemolíticos, si las muestras dan una prueba positiva las saponinas son hidrolizadas y las sapogeninas en la mezcla cruda pueden detectarse por medio de su espectro de absorción infrarrojo característico. Las sapogeninas se pueden identificar por cuatro bandas de absorción características. Bandas cercanas a 852, 900, 922 y 987 cm^{-1} (11.75, 11.1, 10.85 y 10.14 micrones) con la banda 922 más pronunciada que la banda 900 indican una sapogenina "normal". Bandas cercanas a 866, 900, 922 y 982 cm^{-1} (11.55, 11.1, 10.85 y 10.18 micrones), con la banda 900 más pronunciada que la 922 indican que se trata de una "iso" sapogeni-

na. Si las bandas a 900 y 922 cm^{-1} no difieren mucho en fuerza y las demás bandas tienden entre los valores dados, la muestra contiene sapogeninas de ambas configuraciones.

La estructura de una sapogenina esterooidal típica, es la esmilagenina (22, isopirostan-3B-ol) (fig. No. 4).

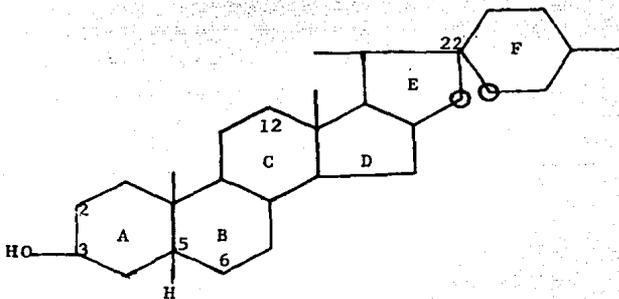


Figura No. 4

Las variantes son isomerismo a C_5 ó C_{22} , insaturación en entre C_5 y C_6 , presencia de un carbonil a C_{12} y grupos hidroxilo adicionales en C_2 , C_6 ó C_{12} , como se muestra en las figuras No. 5, 6 y en la tabla 8, todas las sapogeninas tienen absorción característica en bandas cercanas a 866 , 900 , 922 y 982 cm^{-1} - (11.55, 11.1, 10.85 y 10.18 micrones). La sarsapogenina (spi

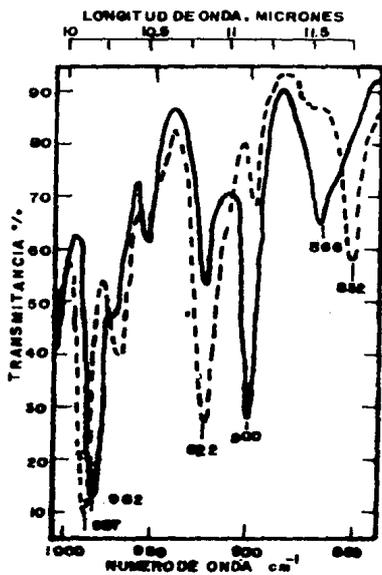


FIG. 6. ESPECTRO INFRARROJO DE ACETATOS DE DIOSGENINA (a), - DIHIDRODIOSGENINA (b) Y COLESTEROL (c).

FIG. 5. ESPECTRO INFRARROJO DE ACETATOS DE SARSAPOGENINA (a) Y ESMILOGENINA (b).

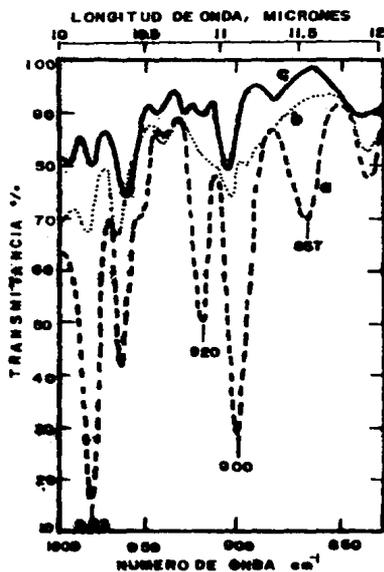


TABLA 8 CARACTERISTICAS DE LAS BANDAS DE ABSORCION DE LAS SAPOGENINAS

ACETATO DE SAPOGENINA	LONGITUD DE ONDA μ	No. DE ONDA cm^{-1}	ABSORTIVIDAD MOLAR	
			L. Mol	cm^{-1}
Clorogenina	11.55	866	82.5	
	11.11	900	285	
	10.86	921	103	
	10.17	983	365	
Diosgenina	11.54	867	66.3	
	11.11	900	229	
	10.87	920	126	
	10.17	983	335	
Gitogenina	11.53	867	72.2	
	11.11	900	229	
	10.81	925	130	
	10.18	982	403	
Hecogenina	11.53	867	73.7	
	11.11	900	284	
	10.86	921	133	
	10.18	982	352	
Manogenina	11.53	867	68.1	
	11.10	901	284	
	10.86	921	113	
	10.18	982	393	
Samogenina	11.56	865	82.4	
	11.11	900	206	
	10.86	921	113	
	10.18	982	393	
Sarsapogenina	11.74	852	102	
	11.15	897	69.9	
	10.85	922	239	
	10.14	982	422	
Esmilagenina	11.55	866	78.7	
	11.11	900	230	
	10.84	922	116	
	10.18	982	381	
	11.56	865	72.4	
	11.11	900	230	
	10.82	924	340	
	10.17	983	341	

rostan 3B-ol) la cual tiene una configuración "normal" absorbe a 852, 900, 922 y 987 cm^{-1} (11.75, 11.1, 10.85 y 10.14 micrones). La figura 5 muestra la relación entre la sarsasapogenina y la esmilagenina la cual difiere solamente en la configuración a C_{22} .

Las cuatro bandas de absorción I.R. características de las sapogeninas es una propiedad de un anillo F. Esto se muestra en la figura No. 6, la cual muestra la absorción infrarroja de los acetatos de diosgenina (Δ^5 -22-isopirostan-3 β -ol) -- dihidrodiosgenina (Δ^5 -22-furosten-3B-26-diol) y colesterol -- (Δ^5 -colesten-3B-ol). Estos compuestos tienen una estructura idéntica en los anillos A, B, C y D). El Colesterol difiere de la diosgenina en un hidrocarburo saturado unido al anillo D en lugar del anillo E y F; Dihidrodiosgenina contiene los anillos A, B, C, D y E pero el anillo F es abierto. Como se muestra en la figura solamente diosgenina tiene las cuatro bandas típicas de absorción. La presencia de este sistema de cuatro bandas de absorción es una evidencia positiva de sapogeninas esteroidales.

Las figuras 7, 8 y 9 muestran algunas curvas típicas de absorción en infrarrojo que indican una prueba positiva y negativa para sapogeninas. Curvas a, b y c (fig. 7) son isosapogeninas; la figura 8 muestra una sapogenina normal similar. Curvas a, b y c (fig. 9) muestra un espectro típico de extracto de

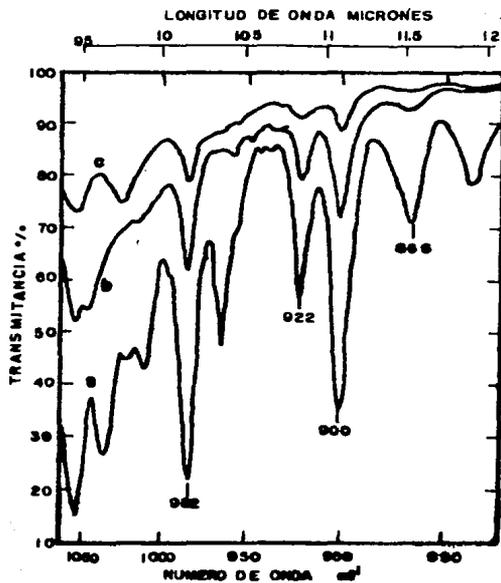


FIG. 7. ESPECTRO INFRARROJO DE ACETATOS DE ISOSAPOGENINA CRUDA.

- a. 1.6%
- b. 0.2%
- c. 0.08%

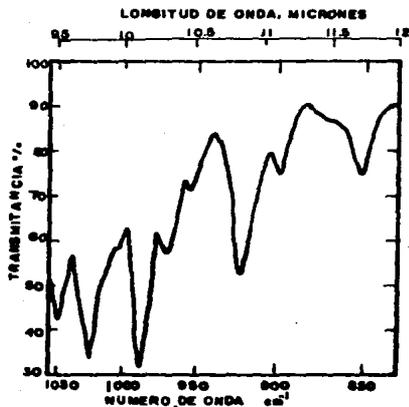
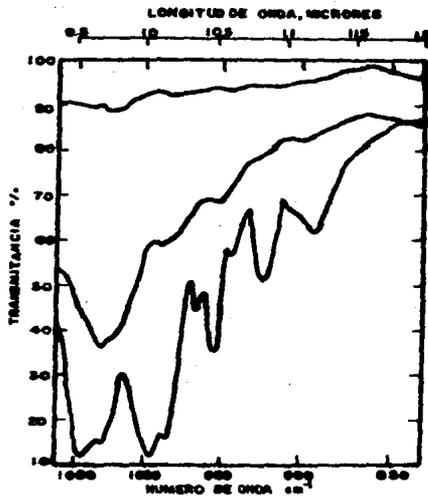


FIG. 8. ESPECTRO INFRARROJO DE ACETATO CRUDO DE SAPOGENINA NOR MAL, 0.45%.

FIG. 9. ESPECTRO INFRARROJO DE SUSTANCIAS NO ESTEROIDALES.



plantas que contienen sapogeninas no esteroidales. La curva muestra el espectro de una sapogenina triterpenoide. Como se observa en las figuras, las sapogeninas triterpenoides carecen de las cuatro bandas de absorción características, por lo que la coincidencia en el comportamiento tensoactivo, hemolítico, cambios coloridos y la ausencia de estos detalles en el I.R., se puede considerar como confirmatorio de que una sustancia pertenece a este grupo.

a.3) Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Tanto las saponinas triterpenoides como las esteroidales y sus agliconas exhiben espectros con suficientes detalles característicos, como para identificar fácilmente al grupo al que pertenecen.

a.4) Espectrometría de masas (E.M.)

Debido a su escasa volatilidad y a la ruptura casi instantánea del enlace hemiacetalico de los glicósidos, en especial de las saponinas no se les determina su espectro de masas, pero el de sus agliconas y sus derivados acetilados o cetónicos ha sido objeto de varios estudios. El tipo de sustituyente en el sistema de ciclopentanoperhidrofenantreno y su posición puede averiguarse por la fragmentación de esta porción de la molécula.

IIIb.) Actividad Óptica

En las saponinas y sapogeninas esteroidales predominan - las rotaciones ópticas negativas, valores de -40° a -85° , si - hay doble enlace en C-5 la rotación se desplaza unos 50° más a la izquierda. Cuando C-12 es grupo ceto, como en la hecogenina, cacogenina, mexogenina, etc., las rotaciones van de -6° a $+5^{\circ}$ y si tienen un doble enlace en C-5 también se desplazan unos 50° a la izquierda. Las saponinas triterpenoides y sus geninas - tienden a ser positivas, particularmente las geninas con rotaciones de $+50^{\circ}$ a $+120^{\circ}$.

III.c) Detección de las saponinas

Como se mencionó anteriormente, la presencia de las saponinas es fácilmente detectable por su actividad hemolítica, su habilidad para formar espumas estables en solución acuosa, por su grado de toxicidad sobre los pescados y por cromatografía en capa fina.

Índice de Hemólisis.- Fue propuesto por primera vez en 1912 por R. Kobert, seguido por numerosos investigadores (41).

En este método una suspensión de glóbulos rojos se hemoliza con las saponinas disueltas en la muestra. La hemoglobina pasa de los glóbulos rojos a la solución, transformándola en - una solución de hemoglobina transparente. Luego de dejarla en

reposo, la parte no hemolizada sedimenta y con una hemólisis total, se encuentra en el fondo del recipiente una capa tenue - compuesta de los estromas de glóbulos rojos. La hemoglobina - hemolizada por hidrólisis con saponina, es de gran interés práctico, puesto que es el mejor método actual para la determinación de saponinas en vegetales (41).

Determinación de Número de espuma.- Este método fue propuesto por F.W. Apt. 1921 y E. Pfrau 1955 (41). El método no es recomendable para una determinación cuantitativa, ya que la altura de la espuma y su densidad depende de la forma de - mezclado, de tal forma que de la intensidad de agitación dependerá la altura y consistencia de la espuma en el tubo de ensayo.

Índice de Pescado.- Este método está basado en la observación del grado de toxicidad de la saponina sobre los pescados (Kofler 1927) (14), ha propuesto el método basado en la toxicidad de las saponinas sobre los gusanos Tubifex.

Cromatografía en placa fina.- Normalmente, el uso de la cromatografía en capa fina es necesario para una mejor identificación. Los disolventes que se recomiendan para la separación en las láminas de placa fina son resumidos en la tabla No. 9. Además, una variedad de reactivos de revelado pueden ser usados, - los cuales dan características de esteroides o triterpenos en - general (Lisboa 1976) (56), no son específicos de saponinas y -

TABLA 9. SOLVENTES SUGERIDOS PARA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE SAPONINAS EN KIESELGEL

S O L V E N T E	TIPO DE SAPONINAS	REFERENCIA
CHCl ₃ /metanol/agua 65:10-30:10	no polar	(Tschesche & Wulff, 1973)
CHCl ₃ /metanol/agua 65:35:10	no polar y neutra	(Tschesche & Wulff, 1973)
Ac. Acético/etanol/agua 70:15:15	ácido y neutro	(Tschesche & Wulff, 1973)
n-Butanol/etanol/agua ^f 1:1:1	ácido y neutro	(Coulson, 1958)
n-Butanol/etanol/amoniaco IM 60:13:30.5	polar y ácido	(Wolf & Thomas, 1970)
n-Butanol/etanol/amoniaco 5M 7:2:5	polar y ácido	(Wolf & Thomas, 1970)

^f Desarrollado en cromatografía en papel

Datos tomados de "Saponins in food" (14).

TABLA 10. REACTIVOS DE REVELADO PARA LA DETECCION DE SAPONINAS POR CROMA-
TOGRAFIA EN CAPA FINA (LISBOA, 1976)

N O M B R E	COMPOSICION	CONDICIONES	COLOR ^a
Carr-Price	Tricloruro de antimonio saturado en CHCl_3 ^b	calor a 105°C por 15 min.	verde-azul-gris
Liebermann-Burchard	30% anhídrido acético en ácido sulfúrico al 50%	calor a 90°C por 10 min.	verde-azul
Vainillin-acido - fosfórico	Sol. de vainillina al 2% en ac. fosfórico/etanol (1:4)	calor a 120°C 10-20 min.	gris-azul-malva
Ekkert	1% p-anisaldehydo en - ácido acético/ácido - sulfúrico	calor a 90°C por 10 min.	gris-azul-malva

^a El color producido depende de la naturaleza de la saponina

^b Esto ha sido usado como un reactivo húmedo. Es tóxico y se debe tener precauciones durante su uso.

Datos tomados de "Saponins in food" (14).

es necesario que se usen varios criterios para su identificación. Las láminas pueden ser también rociadas con reactivos específicos para azúcares (tal como nitrato de plata). Un método ha sido recientemente reportado en el cual la hemólisis es usada para detectar saponinas sobre las láminas de placa fina. Las láminas son cubiertas con una suspensión de eritrocitos en gelatina y cloruro de sodio isotónico. Las saponinas luego aparecen como manchas blancas sobre un fondo verde (14).

Método de Monroe; et. al. (55)

El describe un método para la detección y estimación de las saponinas esteroidales en tejido de planta. Por este método, las saponinas son detectadas por medio de su actividad hemolítica, si la muestra da una prueba positiva, las saponinas son hidrolizadas y las saponinas esteroidales en la mezcla cruda son detectadas y estimadas por medio de su espectro de absorción infrarrojo específico.

Procedimiento:

Extracción de las saponinas a partir de la muestra húmeda. 400 a 500 g de tejido de planta es triturado y 200 g del triturado se mezcla con aproximadamente 500 ml de alcohol etílico al 95%, se somete a reflujo por 15-30 minutos, la muestra fría se filtra, se enjuaga y se lleva a un volumen de 1 litro con -

alcohol etílico al 95%.

Extracción de las saponinas a partir de la muestra seca. 50 gramos de muestra se pasan a través de una malla molecular de 80-100 μ m, se mezclan con 300 ml de alcohol etílico y se someten a reflujo por una hora. La muestra fría se filtra y se lleva a un volumen final de 500 ml con alcohol etílico al 80%

Detección hemolítica de las saponinas. (estandarización de la sangre). 10 a 20 ml de sangre total humana se suspende en 100 ml de una solución acuosa de cloruro de sodio al 0.85%, la suspensión se enjuaga otras 2 veces con cloruro de sodio al 0.85% y se suspende en 400 ml de la misma solución. 10 ml de la suspensión turbia y 1 ml de solución de digitonina (10 mg de digitonina pura en 100 ml de alcohol etílico al 80%), son mezclados en tubos de centrifuga de 15 ml, la mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente por 5 minutos y se compara visualmente con un tubo de suspensión de sangre que no fue tratada. Si la hemólisis es completa, el tubo que contiene la digitonina es clara (esto puede checarsse por centrifugación). La solución hemolizada da o no un precipitado rojo. De acuerdo a la experiencia del autor, - la hemólisis completa de 1 ml de digitonina no ocurre bajo esas condiciones experimentales, de ahí que la suspensión de sangre - patrón, es progresivamente diluida con cloruro de sodio al 0.85% hasta 10 ml de suspensión de la sangre la cual completa la he-

hemólisis a temperatura ambiente en 5 minutos. De esta manera, - diferentes muestras de sangre deben de ser estandarizadas para dar una hemólisis equivalente con digitonina. La solución patrón puede ser guardada por una o 2 semanas bajo refrigeración.

Detección de las saponinas.- Un mililitro de extracto de planta se adiciona a 10 ml de suspensión de sangre estandarizada. Después de 5 minutos, la presencia o ausencia de hemólisis es observada igual que como para la estandarización de sangre. Si la muestra da una prueba negativa, se descarta. Si la muestra da un resultado positivo, las saponinas son hidrolizadas y las sapogeninas esteroidales en el extracto crudo son detectadas y estimadas por medio de su espectro de absorción infrarrojo característico.

Aislamiento de las sapogeninas crudas.- Una alícuota del extracto alcohólico equivalente a 5.0 g de la planta original es evaporada bajo corriente de aire en baño maría y el producto es transferido con un total de 5 ml de alcohol etílico al 50% a un tubo de reacción de 1.6 x 13.0 cm provisto con un tubo T. Se adicionan 5 ml de benceno saturado con alcohol etílico al 50%, se agita vigorosamente y el tubo es centrifugado de 1500 - 2000 rpm durante un minuto. La capa de benceno se descarta y la extracción con benceno se repite. El extracto de benceno contiene grasas, pigmentos, etc., y es descartado. Se adiciona suficiente ácido clorhídrico concentrado al extracto -

residual para dar una concentración de aproximadamente 4N. Se agregan uno o 2 ml de benceno y se conecta a su condensador. - El tubo se sumerge en baño de agua a 78° - 80°C por 2 horas, - después se retira del baño, se enfría, se agrega 5 ml de benceno con 10% de alcohol etílico, el tubo se agita, se centrifuga y se repite la extracción 2 veces. El extracto de benceno que contiene las saponinas crudas, se evapora bajo corriente de aire y se le agregan 2 ml de anhídrido acético, se mezcla y se deja reposar por 1 minuto. El acetilado crudo de saponinas es transferido a un tubo de centrifuga con 5 ml. de benceno y 4 ml de metanol saturado con hidróxido de potasio, se mezclan vigorosamente e inmediatamente se adicionan 5 ml de agua y se centrifuga. La capa de benceno se guarda y el extracto acuoso metanólico residual se extrae 2 veces más con benceno. La fase de benceno que contiene el acetato de saponina se coloca en un evaporador bajo corriente de aire en baño maría y el residuo se pone a peso constante a 110°C.

III.d) Aislamiento de las saponinas

Las saponinas pueden ser aisladas de las plantas por extracción con solventes orgánicos tales como acetona o éter dietílico, usando un extractor Soxhlet para remover lípidos, pigmentos, etc. El disolvente luego es cambiado a metanol para dar un extracto crudo conteniendo a las saponinas. El método más comunmente empleado para aislar las saponinas de la planta es -

el de Kitagawa et. al. 1976 (46), él aisló la soyasaponina I - (mayor), II y III. (Estas poseen un soyasapogenol B como aglicona común) de un extracto metanólico de soya (*Glycine Max Merrill, Leguminosae*) y elucidó mediante evidencias químicas y físicoquímicas la estructura de las 3 soyasaponinas.

Método de Kitagawa et. al (46)

El extracto metanólico (1.4 Kg) se obtiene a partir de la soya pulverizada que es desengrasada con n-hexano y se extrae con MeOH a reflujo (57). El extracto preparado se fracciona en una mezcla de N-BuOH-Agua (1:1) y la mezcla de isoflavona resultante se separa como un precipitado amarillo brillante. Durante el procedimiento se realiza una cristalización fraccionada - con MeOH de la mezcla de isoflavona, dando genistina de 253-255 °C (mp) y daidzina de 234-236°C (mp). (Ambas se identificaron por IR y RMN.

La capa de n-butanol se evapora a presión reducida para dar un residuo, el cual se disuelve en una pequeña cantidad de MeOH y es colocada en una cantidad en exceso de éter. El precipitado crudo de las saponinas se colecta por filtración y se pasa a través de una columna de carbón (200 g) y celita 535 - (200 g.) con metanol, para dar una mezcla de saponinas (\approx 30 g), que se lavan con n-BuOH y una base débil.

La porción insoluble (20 g) se colecta, se centrifuga y es cromatografiada en sílica gel (500 g) eluyendo con CHCl_3 - $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (7:3:1) para dar soyasaponina I (5.5 g), II (0.5 g), III (0.1 g) y una mezcla de soyasaponina I y II (2g).

III.e) Determinación de la composición química de las saponinas

La determinación de la composición química de las saponinas por análisis de sus carbohidratos y sus agliconas en el hidrolizado ácido, es quizá el método más confiable para su identificación. Las técnicas empleadas para el estudio de la estructura y estereoquímica de las saponinas, fueron descritas por N. Basu y R. P. Rastogi (54) en esta revisión se informa la detección de las saponinas y sus geninas, por medio del color que producen con varios reactivos, por ejemplo. Liebermann-Burchard, cloruro de tionilo, ácido fosfomolibdico, ácido sílico tungstíco, etc. y por hemólisis de sangre. Otros reactivos que se describen para la detección son: una mezcla de metaperyodato de sodio - permanganato de potasio y tricloruro de antimonio/cloroformo - vainilla /cloroformo (5:4:1).

También reportan varios métodos para el aislamiento de saponinas crudas y su purificación.

Las saponinas insolubles en agua, generalmente precipitan en extractos alcohólicos. La precipitación de saponinas solubles en agua puede efectuarse en forma de estearina o complejos de

colesterol, así las saponinas liberadas pueden cuantificarse. Basu et. al. refiere el uso de electroforesis en papel para la purificación de saponinas usando buffers de borato acuoso y sus geninas usando butanol: ácido acético:agua (1:1:2.25). También reporta un método en el que emplean intercambiadores de iones con el cual se obtienen magníficos resultados. Así la araloside A, es absorbida en Dowex I y eluida con 10% de ácido acético seguido de 90% de alcohol, las saponinas de Hedera Helix y Glycyrrhiza glabra son absorbidas por intercambiadores de iones de una solución de sales de saponina-trietilamina y eluidas por desplazamiento con iones Cl^- , las saponinas de alfalfa son purificadas por cromatografía de intercambio iónico, previa a la precipitación con colesterol. En el caso de saponinas ácidas, se reporta la ventaja de que las saponinas crudas precipitan con sales de sodio o de amonio o por esterificación de los grupos carboxilo con diazometano antes de la cromatografía por partición. Los azúcares son normalmente identificados por el método convencional de cromatografía en papel, en varios sistemas de solventes,

Los azúcares metilados individuales, son identificados por comparación directa o por cromatografía de gases usando una columna de neofenthyl glicol adipato poliéster al 5% en chromosorb W (operando a una temperatura de 150° C). La espectrometría de masas también es de gran valor en estas determinaciones.

Las fracciones de sapogenina obtenidas por hidrólisis ácida, son identificadas por espectrometría de masas de alta resolución, a través de sus acetatos y ésteres metílicos correspondientes. Las sapogeninas también son identificadas por cromatografía de gases. Para analizarlas, se silanizan por tratamiento rápido con TRISIL/BSA para producir trimetilsililesteres. La mejor resolución de las sapogeninas sililadas se observa en una columna empacada con SE-30 (o OV-1) en Gas-Chrom W a 280°C. (7).

Los benzoatos derivados de la mayoría de las sapogeninas que se encuentran en especies de agave, han sido analizadas -- por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) sobre una columna de 250 x 4 mm i.d. Lichrosorb RP8 (fase reversa) usando acetonitrilo-agua (80:20) como fase móvil. La sarsapogenina, deshidrotigogenina y diosgenina también pueden ser separadas en el mismo sistema (58,59, 60). Por el uso de dos sistemas de solventes (isooctano/n-pentanol/acetonitrilo/agua (124:35:12:2). Para glicósidos de baja, mediana y alta polaridad es posible separar 14 glicósidos digitales en Lichrosorb Si-60 (61).

Los glicósidos cardíacos se pueden derivatizar con cloruro de p-nitrobenzyl (62, 63), de esta manera se mejora su detección en el UV a 254 nm (63,64).

III.f) Determinación cuantitativa de las saponinas

Varios de los métodos usados para la identificación de saponinas pueden ser modificados para dar una información cuantitativa.

1.- Análisis cuantitativo de saponinas por determinación de su rendimiento

Una indicación útil para determinar el contenido de saponinas de una planta, aunque solamente en límites bajos puede ser obtenido por determinación del rendimiento de la saponina purificada siguiendo el procedimiento sugerido por Birk, et. al., en 1963 (64) o bien el de Applebaum et. al. en 1969 (65).

a) Método de Yehudith Birk, A. Bondi, B. Gestetner and I. Ishaaya.

200 gr de flor de soya se suspenden en 2ℓ de etanol al 80%, se agitan por 23 horas a 50-60°C y el residuo se extrae después de la filtración con otros 2ℓ de etanol al 80%. El etanol se remueve de los filtrados combinados por destilación.

Los pigmentos y otros materiales se remueven por extracción de la solución con porciones de 200 ml de éter etílico -- hasta que el color desaparezca. A la solución acuosa remanen-

te se le agregan 20 g. de cloruro de sodio y ácido clorhídrico hasta pH de 4-5 y se mezclan con 300 ml y 150 ml de butanol sucesivamente. Los extractos combinados de butanol se lavan 2 veces con 50 ml de cloruro de sodio al 5%. La fase lavada de butanol se concentra bajo corriente de aire obteniéndose un rendimiento de 4 gr de material crudo.

1 gr de la preparación seca se suspende en 100 ml de agua y se trata con 1 g. de monóxido de calcio. El precipitado formado, se separa por filtración, suspendiéndolo en 50 ml de metanol al 80% caliente y neutralizando con ácido clorhídrico. La solución turbia resultante se filtra y se concentra a 0.75 de su volumen. Se adicionan 50 ml de agua y el precipitado de soya se colecta por filtración, se lava con acetona y se seca.

Para determinar la actividad hemolítica del extracto de saponina se usa el método de Kofler's (14) y O'Dell et. al. (66) para esto 1 ml de extracto de saponinas en buffer de fosfato 0.3M pH 7.4 se mezcla en un tubo de ensayo con 1 ml de suspensión de glóbulos rojos previamente lavados. La suspensión mezclada se deja reposar a temperatura ambiente por 20 Hrs. La hemólisis se define de acuerdo a Buchi (41), como la ausencia de precipitado en el fondo del tubo de ensayo y el índice hemolítico se calcula dividiendo el peso de la mezcla de reacción, entre el peso de extracto de saponina ensayado.

El efecto inhibitorio del extracto de saponinas sobre la actividad proteolítica de larvas de *Tribolium castaneum* es examinada por el método de digestión de caseína a 280 mu (64).

La separación por cromatografía en papel del extracto de saponinas se hace en papel filtro ~~Whatman~~ No. 3MM. El papel se lava antes de la cromatografía con butanol/etanol/agua -- (6:2:3) y se seca. Se aplican soluciones de extracto de saponina en etanol al 80% en dirección ascendente. Las manchas son detectadas por inmersión del papel en reactivo de Carr Price (solución saturada de tricloruro de antimonio en cloroformo) y calentado por 5 minutos a 100°C, los cromatogramas se hacen por duplicado y la mancha que no se hizo reaccionar con reactivo de Carr-Price se eluye con etanol al 75%, el etanol se remueve por destilación y en los residuos se examina la actividad proteolítica

b) Método de Shalom W. Applebaum, Shlomo Marco y Yehudith Birk.

Identificación cromatográfica y caracterización de semillas de leguminosas. Las saponinas se extraen con etanol al 80% como lo describe Birk et. al. (64). Los extractos etanólicos se tratan con éter dietílico para remover los pigmentos residuales. La solución acuosa libre de éter se lleva a un pH 4 y se refrigera toda la noche. El precipitado formado se remue

ve por centrifugación a 105,000 x G por 30 minutos. El sobrenadante se trata con CaO, con agitación constante para precipitar las saponinas. La mezcla se filtra a través de papel filtro Whatman No. 1. Las saponinas se encuentran, tanto en el precipitado, como en el filtrado. Las saponinas sobrenadantes son una fracción distinta y no precipitan con exceso de CaO. El precipitado que contiene las saponinas como sales de Ca, se mezcla con 20 ml de etanol absoluto y la suspensión etanólica se neutraliza con H_2SO_4 diluido, la solución se lleva a una concentración final de etanol al 80% y se agita toda la noche a -55° - $-60^{\circ}C$. El filtrado se concentra en vacío a un volumen mínimo de agua y se liofiliza (Preparación I).

El sobrenadante obtenido, después de la precipitación de las Ca-saponinas, se trata de manera similar, se extraen con etanol y se neutralizan con H_2SO_4 , después se concentran a vacío y se liofilizan (Preparación II). La separación cromatográfica en papel de las preparaciones se hace en papel filtro Whatman N. 3 MM, como se describe por Birk et. al. (64) para saponinas de soya.

Para la identificación de los componentes de la aglicona de las diferentes preparaciones de saponinas, se hidrolizan en H_2SO_4 IN en dioxano-agua (1:3) por 5 horas bajo reflujo (condiciones óptimas para la hidrólisis de saponina de soya). El hidróxido frío se diluye con agua y las saponinas son ex-

traídas con éter dietílico y analizadas por cromatografía en papel circular de acuerdo con Gestetner (65).

La actividad hemolítica in vitro, se determina por el método de Buchi et. al. (41) y el índice hemolítico se calcula de acuerdo a Wasicky and Wasicky (65).

2.- Bioensayos para el análisis cuantitativo de saponinas

Los bioensayos que se han empleado para determinar el contenido de saponinas, se basan en la propiedad que tienen de formar espuma en soluciones acuosas, la de hemolizar células sanguíneas, en la propiedad de inhibición de la actividad proteolítica de larvas de *Tribolium castaneum* (ya mencionado) -- (en el grado de inhibición del crecimiento de *Trichoderma viride* o bien en su grado de toxicidad sobre los pescados.

a) Medición de la formación de espuma.

La actividad de formación de espuma de las saponinas se mide por el método de O'Dell et. al. (66), el cual incluye la agitación de 5 ml de 0.01 - 1% de saponina en K_2HPO_4 1/15 M por un minuto en un cilindro graduado de 25 ml midiendo la cantidad de espuma tomada después de otro minuto. Este método correlaciona la cantidad de espuma formada y la concentración de saponina cuando se examina con diferentes cantidades de varias

saponinas.

b) Métodos basados en la hemólisis de células sanguíneas.

Los métodos antiguos fueron descritos por Kofler (14) y Birk (4). La confiabilidad de estos métodos recae en una concentración crítica de saponina, la cual es requerida para el rompimiento de los eritrocitos (índice hemolítico). En este método, varias cantidades de material que contengan saponinas son mezclados con una suspensión de eritrocitos lavados en buffer isotónico a pH de 7.4. Después de 24 horas, la mezcla es centrifugada y la hemólisis se indica por la presencia de hemoglobina en el sobrenadante. La mínima cantidad que pueda producir hemólisis dará la concentración de saponina que proveerá el índice hemolítico para la saponina en particular. El índice hemolítico dependerá, tanto de la naturaleza de la saponina y de la especie animal de donde los eritrocitos fueron obtenidos. Este dato es esencial cuando se usan estándares preparados a partir de muestra de saponina purificada o de mezclas de saponina que ya han sido medidas.

Método de Hajko et. al. (67)

En este método la alfalfa se mezcla con solución salina fisiológica para eluir las saponinas. La sangre se añade al eluado y la hemólisis es medida espectrofotométricamente por un in

cremento en el color rojo.

Método de Monroe E. Wall (modificado). (53)

Se basa en la propiedad que tienen las saponinas triterpe-
noides de unirse al colesterol que rodea a los eritrocitos, -
disminuyendo la tensión superficial de la membrana y provocan-
do como consecuencia su ruptura. Como el glóbulo contiene he-
moglobina, ésta queda en libertad y pasa a disolverse en el lí-
quido en el que estaban suspendidos los eritrocitos. La hemo-
globina por ser de color rojo absorbe a 540 nm.

Preparación de los extractos:

2 a 3 g de muestra se hierven a reflujo con aproximadamen-
te 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 má-
ximo. Los extractos usados se diluyen o concentran para hacer
la determinación.

Preparación de eritrocitos:

10 ml de sangre se agita con perlas de vidrio con el obje

to 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 a 18°C y se decanta el 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 0.0 ml 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 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 minutos a temperatu-

ra 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. de la hemoglobina libre = A - B, la D.O. resultante se interpola en la curva estándar correspondiente.

Curva estándar de saponinas.

Se procede en la misma forma que para los extractos, sólo que sustituyendo éstos por la solución patrón. Se trabaja en rango de 40-60 ug (0.1-0.4 ml). Las condiciones para la curva y problemas deben ser exactamente iguales.

Método de Kartning et. al. (14)

Es una variante muy sensible del método de hemólisis. En él se usan discos de papel filtro que son mojados con la solución de saponina y embebidos en una preparación de eritrocitos en gelatina. El diámetro del área durante la cual se extendió la hemólisis en un tiempo específico es proporcional a la concentración de saponinas.

Método de Khristow (68)

El describe un método de cuantificación de saponinas por difusión en agar. En este método las saponinas son cuantificadas con 5% de error por difusión en agar sangre por incubación a 37°C, durante 16-18 horas, usando soluciones de saponina a pH de 7.4, después de remover las saponinas del extracto (45% de EtOH).

- c) Métodos basados en la inhibición del crecimiento de microorganismos.

Método de Horber (69)

El ideó una técnica para estudiar las saponinas de la alfalfa en relación a la sobrevivencia del gusano de la papa y la pulga de chícharo. Esta técnica fue desarrollada en base a

estudios previos en donde se encontró que las saponinas de las legumbres, constituyen un mecanismo metabólico de defensa de la planta, al ataque de los insectos (65) y de que las saponinas de la alfalfa (7) interfieren con la actividad normal de los insectos. Este bioensayo diferencia claramente saponinas de diferentes orígenes (ej. Yucca sp) medicago sativa y diferentes variedades (ej. Lehantan y DuPuites). En un programa de cría, se intentó bajar los niveles de saponinas de la alfalfa, para este estudio se usó un bioensayo con el hongo trichoderma viride (70).

Método de Zimmer, et. al. (70)

Se preparan extractos por triplicado de hoja de alfalfa seca molida de la familia 36 F₁ y S₁, suspendiendo 10 gr de hojas de alfalfa seca y molida en 100 ml de agua destilada, la suspensión se mezcla por 20 minutos a 121°C bajo presión y se filtra. Los extractos recuperados de la familia de planta 36 F₁ y S₁ se usan en proporción 5, 10 y 20% en una formulación al 2% de potato - dextrosa - agar. Para cada clase de medio se usan cajas petri por triplicado. A cada caja petri se siembran con un disco de 5 mm de Trichoderma viride.

Enseguida, las cajas se incuban a 30°C y se miden los diámetros de las colonias, después de 48 horas. Los datos obtenidos se convierten a un porcentaje de control con placas con-

troil conteniendo únicamente 2% de potato - dextrosa- agar. - Los datos obtenidos se someten a un análisis estándar de varianza y covarianza.

Livingston describe los niveles de ácido medicagénico en alfalfa seca, concentrado de proteína de hoja de alfalfa y alfalfa germinada (71).

Método de Livingston et. al. (71)

Reactivos.

- Emulsión antiespumante (FG-10)
- Potato dextrosa agar (PDA) ph 5.6 a 25°C
- Estándar de saponinas. Muestras de ácido medicagénico de alfalfa, conteniendo 0.2 mg/ml de agua
- Trichoderma viride.- los hongos crecen en P.D.A.

Preparación y purificación del extracto

Pesar cuidadosamente 1 ó 2 g de producto de alfalfa en un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 30 ml de etanol-- agua (1+1) el matraz se conecta a un condensador y se coloca en baño maría a 95°C de tal forma que cubra el nivel de disolvente, se pone a reflujo durante 2 ½ horas, se enfría y se filtra a través de un filtro de vidrio. Los cristales son

lavados 3 veces con porciones de 5 ml de agua. Se combinan - los lavados, se transfiere a un frasco de fondo redondo, se adicionan 2-3 gotas de emulsión antiespumante. La mezcla se evapora a vacío en un evaporador rotatorio en baño maría.

El residuo se disuelve en 2-3 ml de agua y se transfiere a un matraz volumétrico de 10 ml y se ajusta su volumen. Para la preparación e inoculación del medio se disuelven 39 g de - potato dextrosa agar (P.D.A.) en un filtro de agua en ebullición y vaciar el medio en tubos de cultivo, (8 ml/tubo) tapar los tubos y autoclavarlos 15 minutos a 15 psi. El medio puede almacenarse hasta un mes perfectamente tapado.

a) Adición de estándar de saponinas.

Colocar los tubos con medio en baño maría hasta que esté líquido y adicionar 0.1 ml de solución estándar de saponinas - por cada tubo.

b) Adición de extracto.

Adicionar alícuotas de la muestras a cada tubo con medio y mezclar el contenido y autoclavar 15 minutos, vaciar en cajas petri estériles. Después, enfriar e inocular las placas - de muestra con trichoderma viride para control si usa PDA. To me inóculo de la periferia del trichoderma a partir del control

de agua y colocar por un tiempo de 64-74 horas a 120°C.

Medición de la potencia.- Medir el crecimiento en cada disco en cm y calcular el % de crecimiento de 4 Placas control para cada ensayo, preparar una curva estándar con saponina de alfalfa purificada.

Antes del análisis se requiere determinar el rango relativo de la potencia. Se analizan todas las muestras a 3 niveles por duplicado. Calcule la concentración de saponina (en %) y en muestras desconocidas por análisis de la relación de inclinación, usando la porción de la curva donde tanto el estándar como la muestra, dan líneas de respuesta.

Método de Jones, M, and Elliott F. (72)

Desarrollaron dos ensayos, en base a los resultados obtenidos de la detección de saponinas por hemólisis de eritrocitos. Uno mediante la evaluación de ensayo con peces y otro por determinación química de saponinas.

Ensayo con eritrocitos.

Los extractos de saponina cruda se preparan remojando 2 g de hojas de alfalfa en 23 ml de solución salina fisiológica 120 min. La mezcla se filtra a través de 2 capas de gasa y el

filtrado colectado se refrigera a 2°C hasta su uso.

La solución de eritrocitos se prepara por centrifugación de la sangre humana citratada a 5,900 r.p.m. durante 5 minutos, las células sanguíneas colectadas se lavan dos veces y se suspenden en un volumen que varía de (20 - 980 ml) de solución salina fisiológica.

Para evaluar cada extracto de planta se usan diez tubos - conteniendo cada uno 1 ml de la preparación de eritrocitos. 1 ml de extracto de planta se agrega al tubo No. 1, se mezcla y se toma 1 ml para transferirla al tubo No. 3, el contenido del tubo No. 3 se mezcla y se transfiere como el anterior a través de los tubos 5, 7 y 9. 1 ml de extracto de planta diluido -- (1.3 ml de extracto de planta + 0.7 ml de solución salina) se colecta en el tubo No. 2, se mezcla y se transfiere de la misma manera a través de los tubos 4, 6, 8 y 10.

Para esto se usa una jeringa de 1 ml. La relación de el volumen de la preparación de eritrocitos al 2% /volumen de extracto de planta no diluido es 1.00/1.00, 1.00/0.65, 1.50/0.50, 1.50/0.33, - 1.75/0.25, 1.75/0.16, 1.88/0.13, 1.88/0.08, 1.94/0.06, 1.94/0.04 en tubos de 1 al 10 respectivamente. Los tubos son colocados por 30 minutos, enseguida se sacan del baño y se dejan a temperatura ambiente por 15 a 20 minutos antes de la lectura.

Las concentraciones de los extractos de planta en la mezcla de reacción se obtienen por transferencia de la mitad de la mezcla inicial de extracto de planta - eritrocitos a través de una serie de tubos conteniendo solamente preparación de eritrocitos. En esta serie la concentración del extracto de planta disminuye y en las distintas series estándar la concentración de eritrocitos incrementa. Este método rápido permite la obtención de gradientes de concentración y los resultados son parecidos a los obtenidos en una serie estándar. A la concentración más baja del extracto de planta que causa hemólisis -- completa se le llama título. La hemólisis completa se define como la ausencia de sedimentación eritrocítica en el fondo del tubo de prueba. El valor del título de hemólisis se establece con el último tubo que contiene una hemólisis completa y la estimación del porcentaje de hemólisis en el tubo adyacente.

El valor hemolítico se calcula como:

$$\frac{\text{Volumen de preparación de eritrocito al 2\%}}{\text{Volumen de extracto a la concentración título}}$$

Nota: para cada muestra se hacen 2 determinaciones

Bioensayo con peces

Se usan pequeños lotes de pimephalea promelas de fuente - comercial de 4.0 - 4.5 cm de longitud, que se colocan con agua a 20°C por no más de 2 días. El extracto crudo de saponinas - se prepara mezclando 2 g. de alfalfa fresca en 23 ml de agua - destilada por 120 minutos. La mezcla se filtra a través de - una gasa y el tejido y el filtrado se colecta y refrigera a - 2°C hasta su uso. Para cada planta por analizar un pez se co- loca en una copa de papel encerado conteniendo 90 ml de agua - destilada a 20°C. Si el pez se nota calmado y sano a los 5 mi nutos, se le añade 10 ml de extracto de alfalfa. Los peces - son cubiertos durante el ensayo (180 minutos máximo). El tiem po en el que el pez queda inmovilizado se anota. Se recomien- da hacer 2 determinaciones para cada extracto por analizar.

Ensayo Químico (basado en el Método de Van Atta e. al) (73)

En un matraz Erlenmeyer de 1ℓ se mezclan 15 g^g de muestra picada y seca con 75 ml de agua. La muestra se deja reposar 5 horas y se le adicionan 210 ml de alcohol etílico al 95% se - mezcla, se tapa y se deja reposar 20 horas; después se le adi- cionan 53 ml de alcohol etílico al 95% y 162 ml de agua. El - volumen del líquido adicionado es de 500 ml y la concentración de alcohol etílico final es 50%. La mezcla se filtra en papel y a una porción de 50 ml de extracto de solución alcohólica --

(equivalente a 1.5 g. de muestra de aire) se le adiciona 1 g. de carbón activado y es colocado en vapor de aire caliente con agitación ocasional por 15 minutos. Por medio de un filtro de succión de 5.5 cm, el extracto se filtra rápidamente a través de papel, se enjuaga y se completa a 100 ml con 50% de alcohol etílico. El filtrado se evapora y se termina de secar con corriente de aire caliente. El residuo se disuelve con 20 ml de agua hasta completa disolución y se agregan 1.5 g. de carbón activado. La mezcla se agita ocasionalmente y se continúa calentando con vapor por 5 minutos. La mezcla se filtra a través de papel. Si el filtrado contiene carbón, se vuelve a filtrar hasta obtener un filtrado libre. Se lava el carbón que queda en el embudo con 4 porciones de 20 ml de agua seguida de 2 porciones de 10 ml de alcohol etílico al 20%, las saponinas quedan adsorbidas en el carbón y el filtrado y los lavados se descartan. Para eluir las saponinas adsorbidas en el carbón, éste se lava con una mezcla de piridina (grado purificado) y alcohol etílico absoluto, 3:7 (v/v). Se evapora el alcohol y la piridina en vacío, el residuo se introduce en una estufa durante 16 horas a 65°C y el residuo se pesa como saponinas.

3. Métodos espectrofotométricos para el análisis cuantitativo de saponinas

En 1941 los investigadores: Wasicki y Schulk, O.I - Sarmol (7) propusieron los métodos espectrofotométricos para

la determinación de saponinas. Estos métodos se basan en la formación de compuestos de absorción derivados de las saponinas.

Método de Walker et. al. (74, 75)

Describe un método para la determinación de saponinas en azúcar de remolacha, en este método las saponinas se precipitan a partir de las soluciones de azúcar por acidificación.

El precipitado se redissuelve y se filtra y el filtrado es determinado colorimétricamente, al hacer reaccionar las saponinas disueltas en ácido acético glacial con SbCl_5 al 10% en CHCl_3 durante 10 minutos dando lugar a la formación de un color rojo que absorbe a 535 nm.

Procedimiento:

Disolver 125 g de azúcar en 250 ml de agua y adicionar 2.5 ml de HCl concentrado. Filtrar el precipitado en un embudo Buchner y lavarlo con agua acidificada. Se deja secar durante 20 minutos a 105°C . Disolver el precipitado en 8 ml de ácido acético glacial caliente y aforar a 10 ml. Para la determinación colorimétrica se coloca en un tubo de ensayo 1 ml de la disolución y se adicionan 7 ml de SbCl_5 al 10% en CHCl_3 . Mezclar y dejar reposar por 10 minutos y medir la absorbancia a 535 nm. El contenido de saponinas se calcula por interpola-

ción en una curva estándar.

Método de Walker Modificado (75)

Procedimiento:

En un matraz de 500 ml disolver 50 g de azúcar con 150 ml de agua a temperatura ambiente y llevar a un pH de 1 - 1.4 con HCl. Filtrar la mezcla a través de un filtro de vidrio previamente lavado con 5 ml de ácido acético glacial caliente y 30 ml de agua. Enjuagar el matraz con 15 ml de ácido diluido (1 ml de ácido concentra + 1 litro de agua) y pasar a través del filtro. El eluado obtenido se trata con 5.2 ml de ácido acético glacial caliente y se colocan alicuotas de 1 ml en frascos viales limpios. Para los blancos se adicionan en 2 viales por separado 1 ml de saponina y un ml de eluado ácido respectivamente. A todos los viales se le adicionan 7 ml de $\text{SbCl}_5\text{-CHCl}_3$, se dejan reposar durante 10 minutos y se lee la absorbancia a 535 nm.

Método de Van Duuren A.J. (76)

Van Duuren describe un método espectrofotométrico para la determinación de saponinas en remolacha, usando sapogenina como material de referencia. En este método el jugo prensado se acidifica a pH de 1, se calienta una hora a 100°C, se enfría

y se centrifuga, se tira el sobrenadante, el residuo se lava con agua acidificada y luego se disuelve en EtOH. Se evapora un volumen de esta solución conteniendo 0.5 - 2.0 mg de saponina hasta 5 ml, se agregan 4 ml de agua y 1 ml de HCl 12N. La disolución se somete a hidrólisis 75 minutos a 100°C. Se evapora el etanol en vacio, la solución remanente se acidifica con 5 ml de HCl 12N y se extraen las saponinas con 10 ml de CHCl_3 (en porciones pequeñas). En tubos numerados como A y B. Se evaporan por duplicado 4 ml de la fase orgánica a sequedad. A los tubos A y B se les agrega 3 ml de una solución que contenga 3 volúmenes de AcOH, 6 volúmenes de AC_2O , 1 volumen de H_2SO_4 ; y la muestra B en 3 ml de una solución que contenga 9 volúmenes de AcOH y 1 volumen de H_2SO_4 . Se mide la absorbancia de A vs B (blanco) a 525 nm después de 8 minutos.

Método de V.A. Nagornaya et. al. (77)

En el intento de determinar el contenido de saponinas en jugo de carbonatación y en los sedimentos de los productos de la producción de azúcar, Nagornaya probó 2 métodos colorimétricos para la determinación de saponinas. Uno con SbCl_5 mostrando absorción máxima a 525 nm (83, 84) y otro con H_2SO_4 basado en la formación de un color rojo, debido al anillo terpeno de la saponina. Nagornaya comparó los resultados obtenidos y encontró que el método de formación de compuestos coloridos con H_2SO_4 era el mejor para el control rutinario en la industria -

del azúcar.

Método de Kishihara, Siro, Simizu & Tosihide, (78)

Ellos estudiaron el método colorimétrico del SbCl_5 (pentacloruro de antimonio) desarrollado por Walker (99, 100) y encontraron que 10 minutos eran insuficientes para la aparición del color, además, estudiaron la formación de reacción de color a 20, 30, 35 y 40° con respecto al tiempo y encontraron que 50, 30, 15 y 10 minutos eran el tiempo necesario para llegar a la máxima absorbancia respectivamente. La intensidad del color no cambió en 30 minutos a 20°C. Ellos propusieron la siguiente modificación: 1 ml de solución de saponina en HOAc es pipeteada en un tubo de ensayo y se adicionan 7 ml de SbCl_5 - 10% (vol/vol) en CHCl_3 . El tubo se sumerge en un baño de agua a 35°C por 15 minutos y la solución es transferida a una cubeta para leer su absorbancia a 535 nm en el colorímetro. La curva estándar fue obtenida con solución de saponina remolida preparada por el método de F.G. Eis et. al. (1952) así; el contenido de saponinas C se calcula como $(\text{mg/ml}) = 0.217D + 0.033$ (para absorbancia, $D = 0.3 - 1.0$ a 535 nm) y $C = (D - 0.025) / (1.7 + 3.7D)$ para $D < 0.3$.

Método de Gestetner, et. al. (79)

En este método el contenido de saponinas en el hidroliza-

do ácido se determina usando el reactivo modificado de Liebermann Burchard después de una purificación preliminar sobre columnas de alumina. Las 5 sapogeninas conocidas (sapogenoles - de soya A, B, C, D y E) dan un color parecido por unidad de peso con este reactivo. Una relación 1:1 de sapogenina - azúcar es típica para varios extractos de saponina de soya preparadas de algunas variedades y este dato es usado como un factor de conversión de sapogeninas en contenido de saponinas.

En este método, las sapogeninas de soya se aíslan hidrolizando una muestra de extracto de saponina de soya (10 mg/ml) o sus fracciones en H_2SO_4 1M en dioxano - agua (1:3) por 4 horas bajo reflujo. La solución es enfriada a temperatura ambiente, diluida con agua (20 ml) y las sapogeninas son extraídas con tres porciones sucesivas de éter. Los extractos combinados de éter son lavados, secados con sulfato de sodio anhidro y el éter es eliminado. El residuo que contienen las sapogeninas de soya se recoge en una pequeña cantidad de benceno y es purificada en una columna de alúmina (10 g. de alúmina activada -- ALLOAF-20) suspendida en benceno y 0.4 ml de solución acuosa de ácido acético 10%, para esto el residuo es agitado por 30 minutos, colocada en una columna de 15 mm de diámetro y lavada con 0.4ℓ de benceno. Varias impurezas son removidas por lavado de la columna con 200 ml de benceno y las sapogeninas son eluidas con 500 ml de una solución en benceno. Esta solución es concentrada por corriente de aire y el residuo disuelto en 25

ml de cloroformo. La determinación de sapogeninas es llevada a cabo en tubos de vidrio con tapa en alícuotas de 0.5 - 1.0 ml, los cuales fueron evaporados bajo corriente de aire y después enfriados con 3 ml de ácido acético glacial seguido por 2 ml de H_2SO_4 concentrado. Los tubos fueron tapados y agitados vigorosamente. Un color amarillo es desarrollado de inmediato y después de pocos segundos, cambia a violeta. El tubo es enfriado a temperatura ambiente y sus absorbancias son leídas a 530 nm con un blanco respectivo. Por estudios hechos -- por los autores, se concluye que el contenido de saponinas de la soya puede ser estimada como el doble de la cantidad de sapogeninas, el método cuantitativo descrito se basa en el uso - del reactivo modificado de Liebermann-Burchard. El uso de este reactivo tiene ciertas limitaciones, puesto que no es específico para sapogeninas ya que puede reaccionar con esteroides y sustancias relacionadas; además, el H_2SO_4 altamente concentrado en la mezcla de reacción puede también producir interferencia con otras sustancias orgánicas, pero esta dificultad - puede superarse por introducción de un paso de purificación cromatográfica. Este paso es esencial, no solamente para la de--terminación del contenido de saponinas en hidrolizados ácidos, sino también para la pureza relativa del extracto de sapogenina de soya, la proporción de sapogenina/azúcar (1:1) puede ser usada como un factor de conversión del contenido de sapogeni--nas a saponinas. Así el contenido de saponinas de soya puede ser estimado como 2 veces la cantidad de sapogeninas. Este mé

todo puede ser aplicable a la determinación de saponinas en otras leguminosas.

Método de Hiai, et. al. (80)

El propone un método para la determinación de sapogeninas esteroidales, en el cual se usa vainillina y ácido sulfúrico. Siguiendo el procedimiento se observó que esta reacción, no es específica para sapogeninas, porque algunos esteroides, ácidos biliares y sapogeninas triterpenoides también dan cromóforos. Por otro lado, se sabe que las sapogeninas tratadas con ácido sulfúrico concentrado producen cromóforos característicos, - los cuales sin embargo, no absorben a la misma longitud de onda. Además de que el problema de interferencia es muy marcado.

Procedimiento:

- Preparar una solución de vainillina 2% (w/v) : 800 mg de vainillina (grado analítico) se disuelve en 10 ml de 99.5% (v/v) etanol (grado analítico). la solución se debe preparar - cada vez que se haga la determinación.

- H_2SO_4 al 72% (v/v): a 28 ml de agua desionizada, se le adicionan 72 ml de H_2SO_4 grado analítico al 95% v/v. 0.5 ml - de solución de vainillina y 5.0 ml de ácido sulfúrico, se mezclan en un baño de hielo. Se prepara un blanco de reactivos -

con agua o etanol y se leen las absorbancias de 450 a 700 nm - en un espectrofotómetro.

Método de Baccou, et. al. (81)

Este método se basa en trabajos anteriores donde se sugiere el uso de un reactivo consistente en ácido sulfúrico concentrado (1 ml); anisaldehído (0.5 ml) y ácido acético (5 ml) para revelar esteroides y particularmente sapogeninas, después de su separación por cromatografía en placa fina. Sin embargo, como la mezcla es inestable y rápidamente desarrolla un color rojo oscuro no es aplicable a espectrofotometría, Baccou, sugirió: A) 0.4 ml de anisaldehído además de 99.5 ml de acetato de etilo y B) ácido sulfúrico concentrado. El reactivo A es estable; el ácido sulfúrico concentrado es posible diluirlo en el mismo volumen de acetato de etilo dando lugar al reactivo C) 50 ml de ácido sulfúrico concentrado y 50 ml de acetato de etilo. Para la determinación de sapogeninas por este método, se colocan 0-40 µg de sapogenina esteroideal y se disuelve en 2 ml de acetato de etilo y se adicionan 1 ml de reactivo A y un ml de reactivo C, después de mezclar, se coloca el tubo en baño - maría a 60°C por 20 minutos, enseguida se enfría por 10 minutos en baño de agua a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 430 nm.

Para la determinación de saponinas, se coloca en un tubo

de ensayo una alícuota de saponinas en solución alcohólica correspondiente a un contenido de saponinas entre 0 - 40 μg y se coloca en baño maría a ebullición o en baño maría de aire caliente a 100°C , para eliminar el alcohol, después se enfría, se agregan 2 ml de acetato de etilo y se lleva a cabo la determinación como para las saponinas.

4. Métodos Cromatográficos para el análisis cuantitativo de saponinas

Probablemente los métodos generales más sensibles y recomendables para la determinación de saponinas, son aquellos basados en su análisis cromatográfico, en particular el método más empleado es la cromatografía en capa fina. Los Resultados cuantitativos pueden ser obtenidos en 2 pasos.

- a. La densidad de las manchas obtenidas con un reactivo revelador apropiado puede ser medido directamente, usando un densitómetro.
- b. Las manchas de saponina pueden ser localizadas usando vapor de yodo, luego se quitan raspando la sílica en tubos y tratándolos luego con H_2SO_4 concentrado. La intensidad del color café claro que es producido es determinado espectrofotométricamente.

Las densidades de las manchas y la intensidad de los colores producidos por la muestra, son relacionadas a las densidades e intensidades producidas a partir de soluciones estándar de saponina que proporciona una medida de la cantidad presente en la muestra desconocida. Las saponinas que son de origen diferente probablemente producen colores de diferente intensidad, por lo tanto, es esencial que se usen preparaciones estándar a partir de muestras purificadas de saponinas que han sido medidas (14).

Diversos métodos se han reportado para la determinación cromatográfica de las saponinas. Algunos de ellos se citan a continuación.

Método de Wolf, W.F. & Thomas, B.W. (82).

En este reporte se evalúan 22 sistemas de disolventes para el análisis por cromatografía en capa fina de saponinas de soya en sílica gel.

Procedimiento:

Las saponinas se preparan siguiendo el método de Birk et. al. (64) con modificaciones mínimas. Después de la extracción de las saponinas en butanol, la disolución de saponinas es transferida a un matraz que se coloca en un evaporador rotato-

rio, para separar la fracción que contiene a las saponinas -
crudas. En etapas de purificación subsecuentes, la centrifuga
ción se sustituye por filtración para reducir el tiempo requere-
rido.

La cromatografía en capa fina se hace en placas sílica-gel;
se usan 150 - 200 μg de muestra en 80% de etanol para cada man-
cha, después se desarrollan con solvente, las manchas se detec-
tan revelando las placas con H_2SO_4 al 50% y calentando de 90 -
95°C. La cromatografía de intercambio iónico, se hace en 2 ml
de agua y se disuelven 20 ml de saponina purificada y 10 mg de
sal de sodio de EDTA, ajustando el pH entre 7-8 con NaOH 0.1 N.
El autor encuentra que en ausencia de EDTA, las saponinas no -
se solubilizan totalmente en agua, debido probablemente a los
residuos de calcio que tuvieron las preparaciones. La solución
de saponinas se aplican en columnas de 0.6 x 63 cm comparadas
con AGI-X₄ en forma de acetatos. La columna de 2.5-5N, el bom-
beo se hace a una velocidad de 7.5 ml/hr y se colectan fraccio-
nes de 2 ml con un colector de fracciones. El gradiente de -
ácido acético se determina por titulación con hidróxido de so-
dio 0.1 N. Las saponinas en el eluyente se estiman por de-
terminación del contenido de azúcar como glucosa, con fenol -
ácido sulfúrico. Se observó por medio de un análisis control,
que el EDTA no da un color y no interfiere con la formación de
color de la glucosa.

TABLA No. 11
REPORT E DE VALORES DE RF DE SAPONINAS DE SOYA EN SILICA GEL CON DIFERENTES SOLVENTES

SOLVENTE	COMPOSICION DISOLVENTE	REF.	VALORES DE RF	COMENTARIOS
1	Butanol. benceno. ácido fórmico. agua (*)	8	0.01 ^b , 0.06, 0.09, 0.17	mancha compacta
2	Butanol. ácido acético. agua (6:1:2)	-	0.24, 0.26 ^b , 0.31, 0.35	- - - - -
3	Butanol. ácido acético. agua (4:1:1)	9	0.20, 0.35	- - - - -
4	Butanol. ácido acético. agua (2:1:1)	10	0.51 ^b , 0.71	- - - - -
5	Butanol. ácido acético. éter dietílico. agua ((:6:3:1)	10	0.12 ^b , 0.27, 0.32	- - - - -
6	Butanol. etanol. agua (7:2:5)	9	0.26 ^b , 0.31	- - - - -
7	Butanol. etanol. agua (6:2:3)	1,6	0.37, 0.43	- - - - -
8	Butanol. etanol. hidróxido de amonio 15N (7:2:5)	9	0.24 ^b , 0.29, 0.34, 0.55	mancha compacta
9	Butanol. etanol. hidróxido de amonio 1N (60:13:30.5)	11	0.20, 0.22, 0.24	mancha compacta
10	Acetato de etilo. ácido acético. agua (70:16:15)-fase superior	12	0.02 ^b , 0.07, 0.22, 0.25	- - - - -
11	Acetato de etilo. ácido acético. agua (3:1:3) - fase superior	13	0.02, 0.06, 0.15, 0.17	- - - - -
12	Acetato de etilo. piridina. agua (5:1:4) - fase superior	14	0.00, 0.03	- - - - -
13	Acetato de etilo. piridina. agua (3:1:3) - fase superior	13	0.00, 0.0.7	- - - - -
14	Cloroformo. metanol. (3:1)	15	0.00	- - - - -
15	Cloroformo. metanol. agua. (65:25:4)	5	0.0.5 ^b , 0.10, 0.14, 0.18	- - - - -
16	Cloroformo. metanol. agua. (65:35:10)	16	0.26 ^b , 0.30, 0.34, 0.37	- - - - -
17	Cloroformo. metanol. á. acético. agua (90:8:1:1)	17	0.00	- - - - -
18	Cloroformo. metanol. á. acético. agua (65:25:8:4)	-	0.05, 0.10, 0.15, 0.22	- - - - -
19	Cloroformo. tetrahydrofurano. piridina (10:10:2) saturado con formamida	18	0.06	- - - - -
20	Benceno. etanol. agua. hidróxido de amonio (200:47:15:1) fase superior	10	0.00	- - - - -
21	Benceno. etanol. agua. á. acético (200:47:15:1) fase superior	10	0.00	- - - - -
22	Cloruro de metileno. metanol. formamida (80:19:1)	19	0.00, 0.01	- - - - -

a) Toda la proporción de solventes es en base al volumen
 b) Los Rf decrecen con el incremento en concentración de saponinas
 (*) (100:19.10:25)

Por este método se evalúan 22 sistemas de disolventes para el análisis por cromatografía en capa fina de saponinas de soya. (ver tabla No. 11). El trabajo reporta fracciones con Rfs idénticos, dichas fracciones se diferencian en base a los colores detectados con H_2SO_4 y mediante su posición de elución en las resinas de intercambio iónico.

Método de Andrzejewska E. (83).

El reporta un método semicuantitativo para determinar el contenido de saponinas de un extracto de saponaria officinalis.

En este método las grasas contenidas en la muestra se remueven por una extracción con acetona. Las saponinas se extraen en metanol al 70%, se reextraen con fenol y se identifican y cuantifican por cromatografía en capa fina usando alcohol n-butil/alcohol etílico/amoniaco al 25% en agua, en una proporción de 70:20:50. La cantidad mínima detectable que reporta el autor es de 5 μg , con una recuperación del 90%.

Método de Sakamoto, I, et. al. (84).

Este trabajo se realizó con el fin de hacer un análisis cuantitativo de las saponinas de ginsen y su aplicación a la evaluación comercial del té de ginsen y extracto de ginsen. Los hidrolizados crudos de los extractos de metanol obtenidos

de ginsen fueron trimetilsilados con N-trimetilsililimidazol y el contenido de saponinas fue determinado por cromatografía de gases usando diacetilhedragenina como estándar interno.

Método de Fenwick & Oakenfull (85)

El propone un método cuantitativo por cromatografía en capa fina para determinar el contenido de saponinas en la soya, así como en algunos productos comerciales. En este método la muestra se seca por 16 horas a 110°C. Una muestra de 20 gr se extrae con acetona en un extractor Soxhlet para remover lípidos, pigmentos, etc. El solvente se cambia por metanol y la extracción continúa por lo menos 36 horas. El extracto metanólico se enfría y se completa a 200 ml con metanol. Las muestras medidas (5-50 µl) del extracto metanólico se colocan en placas de sílica gel T.L.C. (Merck, Kiesegel 60F-254). Las placas se corren con n-butanol-etanol-amoniaco concentrado (3:5:1:2.5). Para visualizar las manchas, las placas son reveladas con una solución de ácido sulfúrico en etanol y calentadas a 110°C por 30 minutos. Debido a que el extracto metanólico contiene otros compuestos, los autores usaron tres procedimientos para identificar a las saponinas.

- a) Una placa cromatografiada se revela con una mezcla de anisaldehído (1 ml) ácido sulfúrico (2 ml) y ácido acético (98 ml) y se calienta por 10 minutos a 100°C (ver

figura 10.2. Este reactivo da un color púrpura característico de los esteroides y triterpenos (pero también con otra clase de compuestos)

- b) Una placa cromatografiada se sumerge por un minuto dentro de una solución que contiene nitrato de plata acuoso al 2.7 M (2 ml) en acetona (400 ml). Luego se seca y se revela con hidróxido de sodio 0.5 M en etanol. Los azúcares reductores dan una coloración café oscura sobre un fondo claro (86). Este método resultó ser menos sensible que el de revelado con anisaldehído, además la resolución fue muy pobre aún a grandes cantidades del extracto.
- c) Una placa cromatografiada fue cubierta con una suspensión de eritrocitos lavados (de pollo) en una solución amortiguadora de fosfato isotónico (pH 7.4) contenidos en 45 g./l de gelatina, la placa empapada es sometida a 100% de humedad relativa a temperatura ambiente (28 °C) por 16 horas. Se observó que las saponinas de la soya no eran fuertemente hemolítica. En este procedimiento se requirió gran cantidad de extracto, obteniéndose una resolución pobre.

Ellos usaron colectivamente estos tres métodos para obtener una indicación inequívoca de la presencia de saponinas en

la placa cromatográfica. En la fig. No.10 se indican las manchas debidas a las saponinas por medio de flechas.

Para la cuantificación de las saponinas las placas cromatografiadas son reveladas con una solución de ácido sulfúrico en etanol y se calienta a 110°C por 30 minutos, considerando siempre un blanco de referencia. La intensidad de la mancha es medida con un densitómetro. Se construye una curva patrón de concentración vs área del pico (R) y la cantidad de saponina es calculada de la curva.

Un método alterno para la estimación de las saponinas después de su separación por cromatografía en placa fina usado por los autores se basa en el trabajo de Gestetner et. al. (79), ya mencionado anteriormente.

Método de Fenwick & Oakenfull (87.)

Midieron el contenido de saponinas en plantas alimenticias y en algunos alimentos preparados de éstas basándose en su trabajo previo (85), ellos proponen en este trabajo, graficar la curva patrón como el cuadrado del área relativa del pico cromatográfico vs concentración ya que en una serie de volúmenes conocidos de extracto metanólico y también de una solución estándar de Saponina purificada (blanco de saponinas en metanol), se coloca en placas preparadas para cromatografía en capa fi--

na. Las manchas de cada extracto se arreglan de forma que -- sean adyacentes a las manchas de saponina estándar. Las pla-- cas se desarrollan con una mezcla de solventes idénticos a la descrita previamente y se revelan con una solución de ácido sul-- fúrico en etanol (100 ml/l) y se calientan a 110°C por 30 minu-- tos. La intensidad de las manchas de saponina se miden con un densitómetro, por medición de las áreas de los picos que son - observados en un registrador y medidas con un planímetro. Los resultados se expresan como la relación (R) del área de la mues-- tra desconocida sobre el área del estándar de saponina. En una serie de experimentos con saponina purificada y extracto de sa-- ponina de frijol de soya y garbanzo la cantidad (en ug) es - proporcional a R^2 , como se muestra en la figura No. 11 puede - observarse que las 3 preparaciones tienen la misma relación y se pueden usar para estimar la cantidad de cualquier saponina o mezcla de saponinas. El procedimiento es entonces graficar R^2 contra el volumen del extracto metanólico colocado en la - placa. La pendiente de esta línea (calculada por el método - de mínimos cuadrados) dividida por la pendiente - - - - - de la línea de la figura No. 11 da la concentración de saponi-- nas en el extracto metanólico y así el contenido de saponinas de la muestra original, con un error de $\pm 20\%$

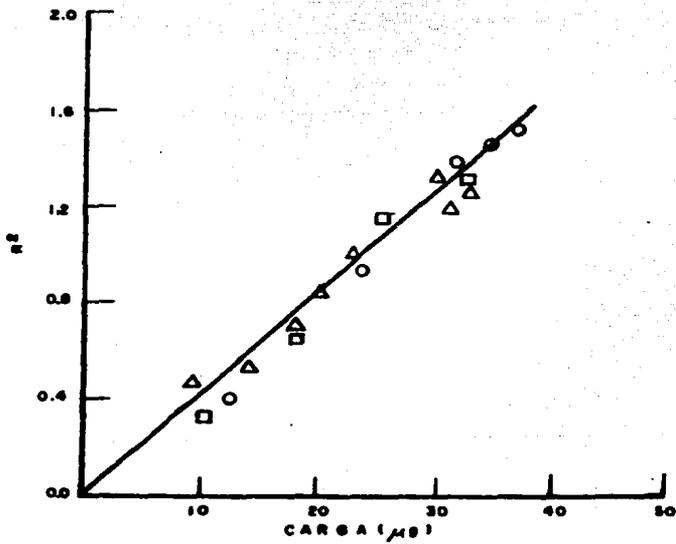


FIG. No. 11 GRAFICA DEL CUADRADO DEL AREA RELATIVA DEL PICO (R^2) CONTRA LA CANTIDAD DE LAS 3 SAPONINAS PURIFICADAS: SAPONINA DE FRIJOL DE SOYA O, SAPONINA DE GARBANZO \square , ESTANDAR DE SAPONINA Δ .

IV. CONCLUSIONES

El término saponina es usado para designar sustancias de naturaleza heterocíclica neutras o ácidas que presentan como carácter común la formación de soluciones "falsas" que por agitación producen espuma persistente.

Las saponinas son compuestos anfifílicos en los cuales los azúcares están enlazados a un grupo no polar llamado saponina, la cual puede ser un esteroide o un triterpeno.

Entre los métodos existentes para la determinación de saponinas los que más frecuentemente se emplean son en base a:

- a) Su actividad hemolítica v.g. Monroe et. al. (55) que describe un método para la detección y estimación de las saponinas y saponinas esteroideas en tejido de planta, las saponinas son detectadas por medio de su actividad hemolítica, si la muestra da una prueba positiva, las saponinas se hidrolizan y las saponinas esteroideas en la mezcla cruda son detectadas y estimadas por medio de su espectro de absorción infrarrojo característico.
- b) Su habilidad para formar espumas estables en solución acuosa, el método no es recomendable para una determi-

nación cuantitativa, ya que la altura de la espuma y su densidad depende de la forma de mezclado de tal forma que de la intensidad de agitación dependerá la altura y consistencia de la espuma en el tubo de ensayo.

- c) Índice de pescado, este método está basado en el grado de toxicidad de las saponinas sobre los pescados v.g. Jones & Elliott desarrolló dos ensayos en base a los resultados obtenidos de la detección de saponinas por hemólisis de eritrocitos, uno de ellos fue un bioensayo y un ensayo químico reportado por Van Atta (73).
- d) Por inhibición de la actividad proteolítica de larvas de Tribolium castaneum, en el grado de inhibición de Trichoderma viride o bien en relación a la sobrevivencia del gusano de la papa y la pulga de chícharo. Esta técnica fue desarrollada en base a estudios previos en donde se encontró que las saponinas de las legumbres constituyen un mecanismo metabólico de defensa de la planta al ataque de los insectos (65) y de que las saponinas de la alfalfa (7) interferían con la actividad normal de los insectos.
- e) Por cromatografía en capa fina. Este método es necesario para una mejor identificación. En las tablas 9 y 10 se resumen los disolventes que se recomiendan para el corri

miento de las láminas de placa fina, además de una gran variedad de reactivos de revelado que pueden ser usados, los cuales dan características de esteroides o triterpenos en general (14), no son específicos de saponinas y es necesario que se usen varios criterios para su identificación.

Varios de los métodos usados para la identificación de saponinas pueden ser modificados para dar una información cuantitativa. Así podemos referir:

1. Análisis cuantitativo de las saponinas por determinación de su rendimiento v.g. Birk et. al. (64) y Applebaum et. al (65)
2. Métodos espectrofotométricos para determinación de saponinas. Las saponinas y sus agliconas no absorben en el ultravioleta, ya que carecen de grupos cromóforos, pero se aprovecha la coloración que dan con varios reactivos ácidos como el de Lieberman-Burchard; Sulikowsky, cloruro de tionilo y tricloruro de antimonio, estos métodos presentan frecuentemente interferencia; Gestetner et. al. refiere la determinación colorimétrica de saponinas después de una purificación preliminar sobre columnas de alúmina (79).
3. Métodos cromatográficos. Estos métodos son los más sensibles y recomendables para la determinación de saponinas; en

particular el método más empleado es el de cromatografía - en capa fina v.g. Wolf & Thomas (82). También se refiere la cromatografía líquida de alta presión (58-63) Así como la cromatografía de gases.

V. 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. 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. Abst. 64, 19019C. (1966).
3. 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).
4. Birk Y. and Peri I. Saponins in Toxic constituents of plant foodstuffs, edited by Irvin E. Liener Academic Press N.Y. Pp 169-203 (1969).
5. Valadez Corona I. Estudio de las saponinas de las agaves y de sus efectos en la fermentación. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I.P.N, México (1954).
6. Walter, E.D. "Note on saponins and their sapogenins from-strawberry clover". J. Am. Pharm. Assoc., 49:735-736 - (1960).
7. Birk Y. and Peri I. Saponins in Toxic constituents of plant foodstuffs, edited by Irvin E. Liener Academic Press N.Y. Pp 161-181 (1980).
8. Linder, E. "Toxicología de los alimentos" Ed. Acribia pp 19 España (1978).
9. Wattiez N.F. Sternon. Elements de Chimie Vegetale Masson y cie. Paris 680 Pp. 431-438. (1942).
10. Coppola P. "Estudio de la saponina del maguey. Tesis. Facultad de Química y Farm. U.N. de Méx. (1928).
11. Huntress E.H. y S. Mulliken. "Identificación of pure organic compound. John Wiley and Sons. Inc. N.Y. I., 5975-5980 (1941).
12. Kitagawa and Kobayashi. On the structure of the major saponin from the starfish. Acanthaster planci. Tetrahedron Letters, 4: 859-62. (1977).

13. Willner, D., Gostetner, B., Lavie, D., Birk, Y. & Bondi, A. Soya bean saponins. Part. V. Soyasapogenol E. J. Chem Soc., Suppl., 1, 5885-8. (1964).
14. Oakenfull D. Saponins in food - A Review Food Chem. 6. 19-40 (1981).
15. Dominguez X.A. Métodos de investigación fotoquímica. Ed. Limusa, Méx. Primera reimpresión, pp 149-159 (1979)
16. Shibata, S. Saponins With biological and pharmacological activity. In New natural products and plant drug with pharmacological, Springer-Verlag, Berlin, pp. 177-97. (1977).
17. Newman. H. A., Kummerov, F. A. & Soctt, H.H. Dietary saponin, a factor which may reduce liver and serum cholesterol levels. Poultry Sci., 37, 42-5. (1957).
18. Griminger, P. & Fisher, H. Dietary saponin and plasma cholesterol in the chicken. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99, 424-426 (1958).
19. Malinow, M.R., Mc Laughlin, P., Kohler, G. O. & Livings - ton, A.L. Prevention of elevated cholesterol levels in monkeys. Steroids, 29, 105-10. (1977).
20. Oakenfull, D.G., Fenwick, D. E., Hood, R. L., Topping, D. L., Illman, R. J. & Storer, G.B. Effects of saponins on bile acids and plasma lipids in the rat. Br. J. Nutr., 42, 209-16. (1979).
21. Topping, D. L., Storer, G. B., Calvert, G.D., Illman, R. J., Oakenfull, D.G., & Weller, R.A. Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, plasma lipids and lipoprotein turnover in the pig. Am. J. Clin. Nutr., 33, 783-6 (1980).
22. Cheeke, P. R. Nutritional and physiological properties of saponins. Nutr. Rep. Int., 13, 315-24. (1976).
23. Burkitt, D.P. & Trowel, H. C. Refined carbohydrate foods and disease, Academic. Press, London. (1975).
24. Oakenfull, D. G. & Fenwick, D. E. Adsorption of bile salts from aqueous solution by plant fibre and cholestyramins. Br. J. Nutr., 40, 299-309. (1978).

25. Carroll, K. K. The role of dietary protein in hipercholes-
terolemia and artherosclerosis lipids, 13, 360-5. (1977).
26. Merck Index 9th edn., Merck, Rahway, pp 8120 (1976).
27. Martindale. The extrapharmacopoeia, 26 th edn., Pharma-
ceutical Press, London, pp. 393. (1972).
28. Ewart, A. J. The poisonous action of ingested saponins Bu-
lletin No. 50. Council for Scientific and Industrial re-
search, Melbourne (1931).
29. Lindahl, I. L. et. al. Alfalfa saponin: Studies on their
chemical pharmacological and physical proprieties in re-
lation to rumiants bloat. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. No. 1.
1161 (1957).
30. Heywang, B. W., Thompson, C.R. et. al. Effect of alfalfa
in saponin on laying chickens. Poultry Sci., 38, 968-75
(1959).
31. Coulson, C. E. & Evans, R. A. The effect of saponin, ste-
rols and linoleic acid on the weight increase of growing
rats. Br. J. Nutr., 14, 121-34. (1960).
32. Ishaaya, I., Birk, Y., Bondi, A. & Tencer, Y. Soyabean -
saponins. IX. Studies of their effect on birds, mammals
and coldblooded organisms. J. Sci. Fd. Agric., 20, 433-6.
(1969).
33. Oser, B. L. An evaluation of yucca mohavensis as a source
of food grade saponin. Fd. Cosmet, Toxicol., 4, 57-61 -
(1966).
34. Gaunt, I. F., Grasso, P. & Gangolly, S.D. Short-term toxi-
city of quillais extract in rats. Fd. Cosmet. Toxicol.,
12, 641-50. (1974).
35. Phillips, J.C., Bulterworth, K. R., Gaunt, I.F., Evans, J.
G. & Grasso, P. Long-term toxicity studies of quillais ex-
tract in mice. Fd. Cosmet. Toxicol., 17, 23-7. (1979).
36. Carrera, G., S. Mitjavila. "Effect of tannic acid on vita-
min B₁₂ disposability in the rat" Chem. Abstr., 79: 90863s
(1973).

37. Carrera, G. Mecanism of action of tannic acid on vitamin B₁₂ availability in the intestine. Chem. Abstr., 80: 104687x (1974).
38. 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).
39. Rungrvangsak, K., P. Tosukhowong, B. Panijpan and S.L. - Vimokesant. Chemical Interaction between thiamin and tannic acid. I. Kinetics, oxigen dependence and inhibition by ascorbic acid. Am.J. Clin Nutr., 30;1680-1685 (1977).
40. Salisbury and Ross, "Plant Physiology". Wadsworth Publishing Co., Inc. U.S.A., 352, 483 y 489. (1969).
41. Kopsic, T. y Lauric, V. Saponinas de soja. Métodos para su determinación. Alimentación Moderna, 3, 26-29 (1974).
42. Wolters, B. The antibiotic action of saponins III. Saponins as plant fungistatic compounds. Planta Med. 79: (1): 77-83 (1968).
43. Wolters, B., The antibiotic action of saponins IV. Antibiotic effect of neutral steroid glycosides with and without saponin characteristics. Planta Med. 16(I): 114-119 (1968).
44. Nord, E. C. And G. R. Van Atta. Saponin a seed germination inhibitor. Forest Sci., 6:350-353 (1960).
45. Oxford book of food plants. Oxford University Press, London. (1969).
46. Kitagawa, I., Yoshikawa, M. & Yosioka; I. Saponin and saponenol. XIII. Structures of tree soybean saponins. Soyasaponin II and Sosaponin III. Chem Pharm. Bull., 24, 121-9. (1976).
47. Walter, E. D. Bickorff, E. M., Thompson, C. R. Robinson, C. H. & Djerassi, C. Saponin from ladino clover (*trifolium repens*) J. Am. Chem. Soc., 77, 4936-7. (1955).
48. Bondi, A., Birk, Y. & Gestetner, B. "Forage saponins". In Chemistry and Biochemistry of Herbage (Butler, G. W. & Bailey, R. W. (eds), Vol. I. Academic Press, New York, pp 511-28. (1973).
49. Wagner, J. & Sternkop, G. Chemical and physiological studies of saponins of sugar beets. Nahrung, 2, 338-57. (1958).

50. Tshesche, Von R. & Wullff, G. Triterpenes XXVII: Saponins of spinach (*Spinacea oleracea*) Justus Liebigs. *Ann. Chem* 726, 125-35. (1969).
51. Kawano, K., Hiroji, S. & Sakamura., S. A. bitter principle of asparagus. Part II. Isolation and structure of furastanol saponin in asparagus edible shoots. *Agric. Biol. - Chem.*, 41, 1-8. (1977).
52. Chirva, V. Y., Chebov, L. & Lazaur'evskii, G.V. Sunflower saponins. *Chem. Abstr.*, 69:41746s (1968).
53. Muñoz Rivera Miriam. Determinación de saponinas y taninos y acción antibiótica en algunas plantas silvestres mexicanas. Tesis profesional (Fac. de Química) UNAM (1979).
54. Bazu N. and Rastogi R.P. Triterpenoids saponins and saponinins. *Phytochemistry*, vol 6, pp 1249-1270 (1967).
55. Monroe; E., C. Wall, E. Roland, M. L. Mc. Clennan and M. E. Klamp. Detection and estimation of steroidal saponins in plant. tissue. *Anal. Chem.* 24(8), 1337-1341, (1952).
56. Lisboa, B.P. Thin Layer Chromatography of sterols and steroids. In *Lipid chromatography analysis*. Marinetti, G.V. (ed) Merce, Dekker N.Y. Pp 431-445. (1976).
57. I. Kitagawa, M. Yoshikawa, Y. Imakura, and I. Yosioka. Saponin and saponin. VIII Photochemical cleavage of glycoside Linkage in saponin. (1). Photolysis of some saponins and their Structural features. *Chem. Phar. Bull (Tokyo)*, 22, 1339 (1974).
58. Higgins, J.W. A High-permormance liquid chromatography analysis of the benzoate esters of saponinins isolated from agave. *J. Chrom.* 121, 329-334 (1976).
59. Evans, F. J. A new thin-layer densitometric technique for the assay of cardiolides from *digitalis purpurea*. *J. Chrom.* 88, 341-346 (1974).
60. Castle, M.C. Isolation and quantitation of picomole quantities of digexin, digitexin and their metabolites by High pressure Liquid Chromatography. *J. Chrom.* 115, 437-445 (1976).

61. Linder W. & Frei, R.W. Partition High-pressure liquid chromatographic systems for the separation of digitalis glycosides as for liquid chromatographic trace analysis. Anal. Chem. 48, 1576-1579 (1976).
62. Nachtman, F. Ultraviolet derivatization of digitalis glycosides as for liquid chromatographic trace analysis. Anal. Chem. 48: 1576-1579 (1976).
63. Nachtman F. Rapid and sensitive High - Resolution - procedure for digitalis glycoside analysis by derivatization. J. Chrom. 122: 293-298 (1976).
64. Birk, Y., Bondi A., Gestetner, B. & Ishaaya. A. Thermostable haemolytic factor in soybeans Nature, 197: 1089-90 - (1963).
65. Applebaum, S. W., Marco, S. & Birk, Y. Saponins as possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects J. Agric. Food Chem. 17: 618-22. (1969).
66. O'dell, Bil., Regam. W. O., and Beach. T.J. Toxic principle in Red clover. Missouri Univ. Agr. Expt. Sta. Res - Bull. 702 P 12 (1959).
67. Majko, Zoltan. Quantitative determination of saponins in lucerne by its hemolytic effect. Novenytermeles 27 (3), - 217-222 (1978).
68. Khristov, M., Dryanovska N.L. Method for the quantitative determination of saponins by diffusion in blood agar. Chem Abstr. 92: 169317u (1979).
69. Horber, E., Leath, K. T. Borrang, B. Marcariam, V., and - Hanson, C. H. The use potato leafhopper and pea aphid survival to assay activities of alfalfa saponins. Entomol. - exp. Appl. 17, 410-414 (1974).
70. Zimmer, D. E. Pederson M. Wand Mc Guire A. bioassay for alfalfa saponins using the fungus, Trichoderma viride. Crop. Sci. 7 (3), 553-554 (1967).
71. Livingston, A. L. Whitehend, C., and Kohler, G.O. Microbiological assay for saponins in alfalfa products. J. Assoc. off Anual. Chem 60(4), 957-966 (1977).
72. Jones, J., & Elliott, F.C. Two rapid assays for saponin in individual alfalfa plants. Crop. Sci. 9, 688-691 (1969).

73. Van Atta, Guggotz, J. and Thompson R. Determination of saponin in alfalfa Agric. Food Chem. 9(1), 7-79 (1961).
74. Walker, H.G., Determination of saponin in refined beet sugars. J. Am. Soc. Sugar Beet Technologist, 9: 233-287 (1956).
75. Walker H. G., West R.R. and Gaddie, R. S. Determination of saponins in granulated sugar method of H.G. Walker adapted to routine control. J. Am. Soc. Sugar Beet Technologist 9: 146-152 (1956).
76. Duurem A. J. Van. The determination of saponin in sugar beet products. Chem. Abstr. 52: 5863s (1963).
77. Nagoraaya V.A. Zhizhina R.G. & Kartashou. Determination of saponin in the products of sugar production. Sakbarn, Prom. 40 (8), 39-44 (1966).
78. Kishihara, Siro, Simizu and Tosihide. Colorimetric determination of saponin. Chem. Abstr. vol. 70, 98:39080w (1966).
79. Gestetner. B., Birk y. Bondi A. & Tenner Y. Soya Bean saponin VII. A method for the determination of saponin and saponin contents in soya beans. Phytochemistry, 15: 803-860 (1966).
80. Hiai S., Oura H., & Nakajima T. Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulfuric acid, Plants Med. 29: 116-121 (1976).
81. Baccou, J. C., Lambert F. & Sauvaire, Y. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. Analyst, 102: 458-465 (1977).
82. Wolf W. J. & Thomas Betty W. Thin layer and Anion exchange chromatography of soybean saponins. J. Am. Oil Chem. Soc. 47: 86-70 (1970).
83. Andrzejewska, E. Determination of saponins in certain food products. Chem. Abstr. vol. 70, 98: 7303y (1976).
84. Sakamoto, I. Morimoto, K. Tanaka, O. Quantitative analysis of dammarane type saponins of ginseng extract. Food Sci. Tech. Abstr. 8: H1412 (1976).
85. Fenwick & Oakenfull. Saponin content of soya beans and some commercial soya bean products. J. Sci. Food Agric. 32: 273-278. (1981).

86. Trevelyan, W. E., Procter, D.P.; Harrison, J.S. Detection of sugars on papel chromatograms. *Nature* (London) 166; - 444-445 (1950).
87. Fenwick & Oakenfull. Saponin content of food plants and some prepared foods. *J. Sci. Food Agric.* 34: 186-191 - (1983).