N=54
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE SAPONINAS EN MUESTRAS VEGETALES APROVECHANDO SU CAPACIDAD HEMOLITICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MA. CRISTINA GIRON MARTINEZ

MEXICO, D. F. 1992

FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 .

	Página
I.- INTRODUCCION	1
II.- OBJETIVO	2
III.- GENERALIDADES	
III.1) Historia de las saponinas	3
III.2) Estructura de las saponinas	4
III.3) Caracteristicas generales de las saponinas	
III.3.1) Caracteristicas físicas y químicas	15
III.3.2) Propiedades biológicas, nutricionales y toxicológicas	16
III.4) Métodos de análisis para saponinas	
III.4.1) Cromatografía	29
III.4.2) Método de tensión superficial	35
III.4.3) Indice de hemólisis	37
III.4.4) Otros métodos	40
III.5) Usos de las saponinas	43
IV.- PARTE EXPERIMENTAL	
IV.1) Material y métodos	
IV.1.1) Equipo utilizado	44
IV.1.2) Reactivos y soluciones utilizadas	46
IV.1.3) Material vegetal utilizado	47
IV.1.4) Sangres utilizadas	49
IV.1.5) Material estadístico utilizado	50
IV.1.6) Método de trabajo general	50

Página

IV.1.7) Métodos para determinar el módulo de detección

IV.1.7.1) Método de cromatografía 53

IV.1.7.2) Método de tensión superficial 53

IV.1.7.3) Método de hemólisis 55

IV.1.8) Métodos para determinar el módulo de extracción

IV.1.8.1) Prueba de disolventes 62

IV.1.8.2) Extracción mediante agitación mecánica 62

IV.1.8.3) Extracción en el aparato Goldfisch 63

IV.1.9) Método para determinar el grado de recuperación 64

IV.2) Resultados y discusión

IV.2.1) Detección de saponinas 66

IV.2.2) Extracción de las saponinas 73

IV.2.3) Grado de recuperación del método semicuantitativo 94

IV.2.4) Aplicación del método semicuantitativo en muestras vegetales 96

V.- CONCLUSIONES 101

VI.- BIBLIOGRAFIA 102

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 animal. Sin embargo, muchas veces su consumo se ve limitado porque contienen ciertas sustancias de naturaleza química que las hacen potencialmente nocivas, y a cuya presencia no se le ha dado la suficiente importancia. Por otra parte estas mismas sustancias en muchas ocasiones se utilizan para fines tecnológicos (1), ó medicinales (2), siendo benéfica su presencia.

Por lo anterior en la presente tesis se trata de establecer una metodología para la determinación de saponinas, siendo: general, sensible, sencilla y rápida; aprovechando la capacidad hemolítica de las saponinas sobre los eritrocitos (3), su solubilidad en disolventes polares, en caliente o en frío, como por ejemplo: agua, sol. salina isotónica, y alcoholes de bajo peso molecular, así como en forma análoga su insolubilidad en disolventes no polares como: benceno, éter de petroleo, hexano, etc. (4), y la formación de espuma persistente, dado que poseen propiedades tensoactivas (5).

Por los experimentos realizados, el método propuesto resulta ser general, muy sensible, sencillo y relativamente rápido; con un valor de recuperación en el método de extracción de 88.8% $\pm$ 5.5, y un nivel de detección de hasta 1 microgramo de saponinas.

II.- OBJETIVO .

El presente trabajo tiene la finalidad de desarrollar una metodología general para la determinación de saponinas siendo ésta sencilla, rápida y sensible para proponerla como un método de selección (screening) en muestras vegetales .

TABLA 1.

SAPONINAS, AGLICONAS Y PORCIONES DE CARBOHIDRATO

NOMBRE	FORMULA	P.F. (°C)	[α]	AGLICONAS	P.F(°C)	[α]	AZUCARES
Digitonina	$C_{56}H_{92}O_{29}$	235	(-54)	Digitogenina	253	-81	4-galactosa, xilosa
Gitonina	$C_{50}H_{82}O_{23}$	282	(-50.6)	Gitogenina	272	-72	3-galactosa, pentosa
Tigonina	$C_{56}H_{92}O_{27}$			Tigogenina	204	-62	2-glucosa 2 galactosa rhamnosa
Sarsasaponina	$C_{45}H_{74}O_{17}$	241-245		Sarsapogenina	199	-75	2-glucosa, rhamnosa
Amolonina	$C_{63}H_{104}O_{31}$		(-67.5)	Tigogenina	204	-62	3-glucosa, 1 galactosa 2-rhamnosa
Esmilonina	$C_{57}H_{96}O_{29}$	235-237		Esmilagenina	186	-69	5 azúcares
Trillina	$C_{38}H_{52}O_{8}$	275-280		Diosgenina	202	-129	1 glucosa
Dioscina	$(C_{20}H_{34}O_{8})_x$	288		Diosgenina	262		rhamnosa, glucosa
Karmonina	$C_{63}H_{104}O_{37}$	310-315		Kammogenina	204		6 azúcares
Nolonina		280-285		Nologenina	265-267		
Escina		224		Escigenina	309	(26.8 °)	2-glucosa, xilosa
Aralósido A		195		Acido oleanólico	308	(+76)	2-glucosa, 2 arabinosa
Aralósido B		230		Acido oleanólico	308	(+76)	2-glucosa, 2 arabinosa
Asiaticósido	$C_{48}H_{78}O_{19}$	235-238	(-14°)	Acido asiático			2-glucosa, rhamnosa
Quinovina		235		Acido quinóvico	298		6-desoxiglucosa
Muscina				Acido esquinocístico	315	(46)	glucosa, arabinosa, rhamnosa
Odoratisitina		227-8		Acido esquinocístico	315	(-46)	glucosa, arabinosa, rhamnosa
Gratiósido	$C_{24}H_{68}O_{14}$	268-274	(+75)	Gratiogenina	196	(+168)	
_hederina (sapindussaponina)		256-257	(+9.68)	-Hederagenina	327-329	(+81) 2	rhamnosa, arabinosa

Datos tomados de "Métodos de investigación fitoquímica" (9)

III.- G E N E R A L I D A D E S .

III.1) HISTORIA DE LAS SAPONINAS .

El conocimiento y estudio de las saponinas ha tenido un incremento notable en los últimos tiempos debido a los usos tecnológicos, medicinales y al hecho de que se consideran tóxicas para ciertas especies animales.

El término "saponina" (del latín sapon=jabón) fué empleado por primera vez en el año 1811, por el Químico Bucholtz (6),para designar sustancias de naturaleza heterocíclica, neutras ó 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 (7).

III.2) ESTRUCTURA DE LAS SAPONINAS .

Las saponinas son glucósidos anfifílicos, en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos) que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado sapogenina, el cual puede ser ya sea un esterol ó un triterpeno (ver tabla 1), aunque la mayoría de las saponinas que han sido identificadas son triterpenoides (8).

R-OH + HO-X ----------> R-OX + H_2O

azúcar + sapogenina ----------> saponina + agua

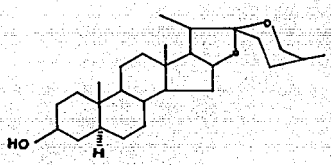
La aglicona, llamada genéricamente sapogenina, puede tener un esqueleto esteroidal (tipo colano) como es la esmilagenina fig.1(a), o de triterpeno tipo beta-amirina como en la chichipegenina fig.1(b),tipo alfa-amirina, como en el ácido asiático fig.1(c), tipo lupeol, como en la estallogenina fig.1(d), ó de tipo tetracíclico como en el panaxadiol fig.1(e).

Con excepción de la criptogenina fig.1(f), el sistema espiroacetal (anillos E y F de (a)) es una característica general de las sapogeninas esteroidales, y es variable el número de insaturaciones, hidroxilos, grupos cetónicos

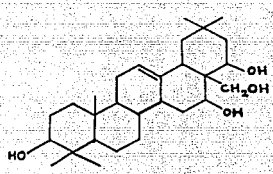
y otros grupos oxigenados, como lo ejemplifican la hecogenina fig.1(g), diosgenina fig.1(h), digitogenina fig.1(i). Las agliconas triterpenoides están también representadas por el ácido queretaroico fig.1(j), y la dumortierigenina fig.1(k). El enlace glicósido siempre se forma con el oxígeno del carbono tres. Se conocen saponinas esteroidales, localizadas en las monocotiledoneas (lileáceas, amarilidáceas y dioscoreáceas, principalmente, con excepción en escrofulariáceas) y otras tantas saponinas triterpenoides, aisladas principalmente en dicotiledóneas (9).

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal en hojas, raíces, tallos y flores; estas se encuentran y han sido aisladas en diversas muestras vegetales, entre ellas algunas plantas comestibles como lo son : soya fig.2 (a),(b) y (c) , alfalfa fig.2 (d) , remolacha plateada fig.2 (e) , espinaca fig.2 (f) , y espárragos fig.2 (g) , entre otras, (10), (11), (12), (13) y (14).

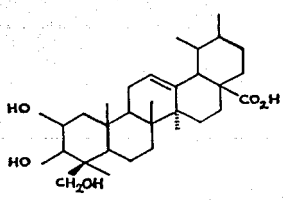
FORMAS ESTRUCTURALES DE LAS SAPOGENINAS .



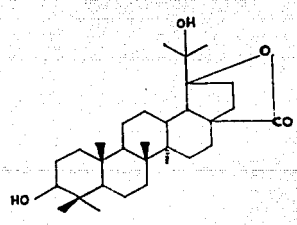
(a) ESMILAGENINA



(b) CHICHIPEGENINA



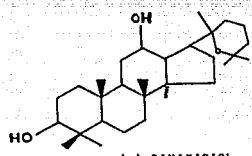
(c) ACIDO ASIATICO



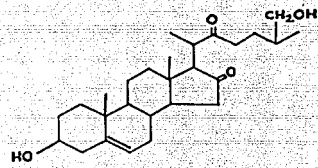
(d) ESTALLOGENINA

FIGURA 1 .

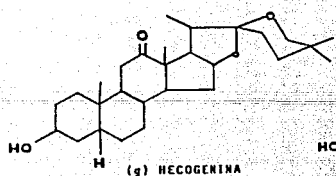
FORMAS ESTRUCTURALES DE LAS SAPOGENINAS .



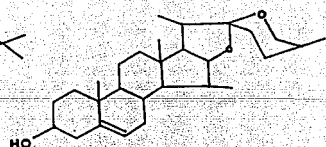
(e) PANAXADIOL



(f) CRIPTOGENINA



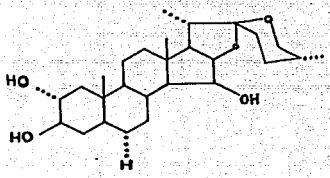
(g) HECOGENINA



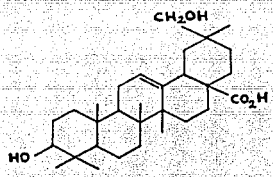
(h) DIOSGENINA

FIGURA 1 (CONT.)

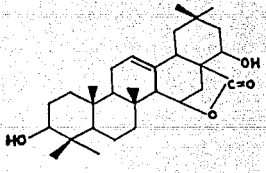
FORMAS ESTRUCTURALES DE LAS SAPOGENINAS .



(i) DIGITOGENINA



(j) ACIDO QUERETAROICO



(k) DUMORTIERIGENINA

FIGURA 1 (CONT.)

SOYASAPONINA I.

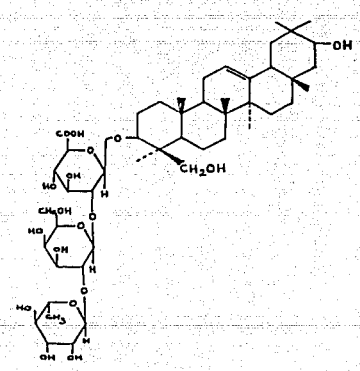


FIGURA 2 (a) .

SOYASAPONINA II .

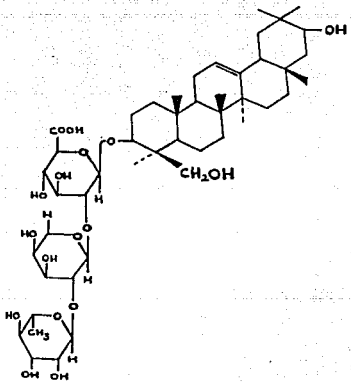
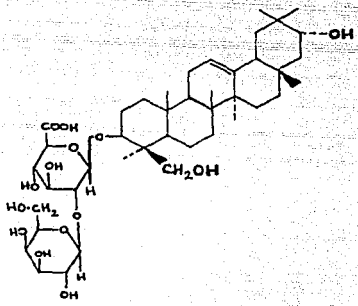


FIGURA 2 (b) .

(c) SOYASAPONINA III .



(d) SAPONINA DE ALFALFA.

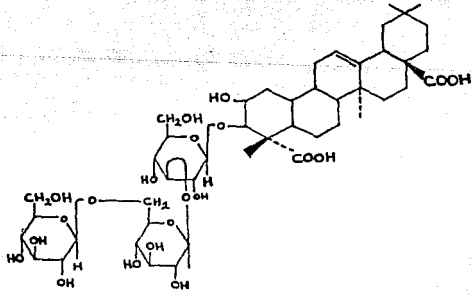
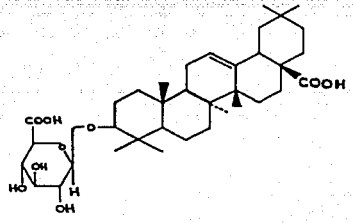


FIGURA 2 .

(e) SAPONINA DE REMOLACHA .



(f) SAPONINA DE ESPINACA; R=H ó OH .

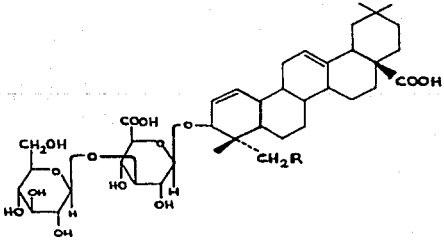


FIGURA 2 .

(g) SAPONINAS DE ESPARRAGOS .

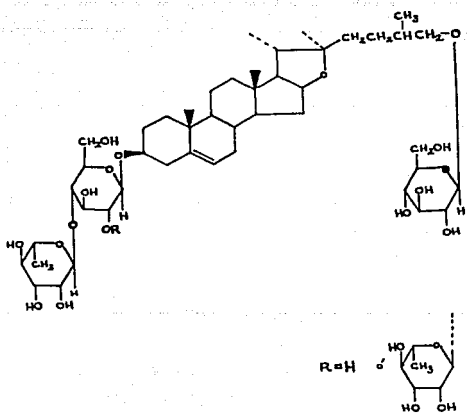


FIGURA 2 .

III.3) CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS SAPONINAS.

III.3.1.) CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS.

Las saponinas son sustancias en su mayor parte amorfas, de sabor amargo, en general son inodoras, de dificil cristalización; sus soluciones coloidales al producir espuma, reducen fuertemente la tensión superficial por lo que pueden estabilizar las emulsiones de grasas y aceites, siendo dificil romperlas (15), tienen propiedades estornudatorias muy marcadas, irritan los ojos y la piel cuando se frotan, son termoresistentes (16), forman complejos con el colesterol y otros hidroxiesteroles.

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 disolventes orgánicos como éter de petroleo, benceno, cloroformo, hexano, etc., son insolubles.

En ácido sulfúrico concentrado, las soluciones de saponinas esteroides producen una coloración que varía del rojo al violeta. Las soluciones alcohólicas de saponinas reaccionan con soluciones también alcohólicas de colesterina formando precipitados característicos.

Las propiedades lipofílicas e hidrofílicas de las saponinas, su actividad de superficie y la habilidad de

emigrar en medios diferentes, así como la propiedad de combinarse con esteroles, están determinados por la combi_ nación de las sapogeninas y carbohidratos en la molécula. Por ello su naturaleza anfifílica hace que dominen sus propiedades físicas en solución.

III.3.2) PROPIEDADES BIOLOGICAS, NUTRICIONALES Y TOXICOLOGICAS.

Algunas saponinas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y hongos. La toxicidad selectiva de las saponinas sobre hongos ha sido reportada por diversos autores (17); entre los diversos experimentos se encuentra un estudio de la influencia de una fracción de saponinas de alfalfa y otra que no las contenía, sobre dos variedades: DuPuits y Lahontan, en 15 patógenos, algunos de éstos microorganismos fueron inhibidos por la fracción que contenía saponinas y otros no fueron afectados.

Otro grupo de experimentadores reportaron que en variedades de alfalfa con bajo contenido de saponinas, la susceptibilidad de éstas hacia los patógenos se incrementó.

También estudiaron el efecto de las saponinas de alfalfa sobre Trichoderma viride los cuales encontraron que la presencia o ausencia de ácido medicagénico explicaba las diferencias entre las variedades y la actividad o inactividad sobre el microorganismo.

Gestetner y col. (18), dicen que la acción de las saponinas sobre los hongos es limitada y que actúan precipitando esteroles en la membrana celular.

Algunas hipótesis de trabajo sobre el contenido de saponinas en ciertas plantas y su mecanismo de defensa contra los insectos han sido estudiadas por Birk (19), Applebaum y col. (20) y Applebaum y Birk (21), entre otros investigadores; los cuales estudian con larvas de Costelytra zealandica (blanca).

Kain y col. y Farrell y col. (17), demostraron la resistencia de alfalfa (Medicago sativa) al ataque de larvas de un escarabajo europeo Melolontha vulgaris F. éstas observaciones sugieren una posible relación entre el contenido de saponinas y la resistencia al ataque de insectos fitófagos, sin embargo esto no ha sido totalmente comprobado y se sigue experimentando sobre ello.

Estudios realizados de los efectos que las saponinas de alfalfa tienen sobre algunos animales de granja (22), (23), (24), mostraron diferentes respuestas en animales monogástricos con dietas en las cuales el contenido de saponinas era variable.

Con un 20% de alfalfa en la comida de pollos (equivalente a un 0.3% de saponina), se detectó un decremento en el peso, el cual era atribuido al contenido de saponinas. Sin embargo la misma proporción se incorporó a la alimentación de cerdos sin ningún efecto en el crecimiento.

Cheek (24), observó que el ratón es mucho menos tolerante a las saponinas de alfalfa que la rata, con un 2% de saponinas en la dieta, presentando un decremento en el peso en comparación con la rata que no fué afectada.

Reshef y col. (17), creen que la inhibición del crecimiento está relacionado con el contenido de ácido medicagénico en las dietas preparadas.

En general el modo de acción de las saponinas sobre los animales monogástricos es poco conocido.

En cuanto al contenido de saponinas para el hombre en ciertos productos alimenticios, el estatus del Merk Index (1976) indica que prácticamente las saponinas no son tóxicas por ingestión oral (25). Los extractos de plantas

como el de sarsaparrilla ó de Quillaja saponaria, son permitidos como aditivos para alimentos en: Australia, Gran Bretaña y E.U.A. (ver tabla 2). Sin embargo en lugares como el oeste de Alemania, España y Marruecos, por ejemplo, es prohibido su uso en alimentos, por la considerable variación de toxicidad de diferentes saponinas (26).

La toxicidad oral de algunas saponinas se muestra en la tabla 3. Las dosis letales varían de 25 a 3000 mg/Kg de peso corporal . Las saponinas normalmente crean lesiones gastrointestinales, y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, producir fallas en la respiración, convulsiones y coma (27)

El efecto de inhibición de las saponinas de alfalfa sobre la germinación de semillas de algodón está reportado por Nord y Van Atta (28), por Pedersen y col. (29) y Shany y col. (30), los cuales realizaron sus estudios con diferentes preparaciones de saponinas de alfalfa.

El mecanismo por el cual las saponinas de alfalfa inhiben la germinación en semillas de algodón fué estudiado en una serie de investigaciones, realizadas por Marchaim y col. (17); éstos colocaron semillas de algodón inmersas en una solución con 0.5% de saponinas y observaron la inhibición del crecimiento.

TABLA 2.
CONCENTRACION PROMEDIO DE LA SAPONINA DE QUILLAJA
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 (27)

TABLA 3.
TOXICIDAD ORAL DE ALGUNAS SAPONINAS [a]

Fuente de Saponina	Animal	Dosis	Dosificación	Referencia
Sapindus sapindus	Ratón	DL	3000	(Spector, 1956)
	Ratón	DL	1000	(Spector, 1956)
	Rata	DL_{50}	50	(Vogel & Marek, 1962)
Agrostemma githago	Conejo	DL	56-52	(Spector 1956)
(common corn cockle)	Perro	DL	20-25	(Spector, 1956)
Saponaria vaccaria	Ratón	DL_{50}	960	(Abubakirov et. al 1960)
Aesculus hippocastanum				
(horse chestnut)	Rata	DL_{50}	50	(Abubakirov et. al. 1960)
Hedera helix (ivy)	Rata	DL_{50}	100	(Abubakirov et. al 1960)
Gypsophila paniculata	Rata	DL_{50}	50	(Vogel & Marek, 1962)
Cyclamen europaeum	Rata	DL_{50}	160	(Vogel & Marek, 1962)
Digitalis purpurea	Rata	DL_{50}	50	(Vogel & Marek, 1962)
(fox glove)	Ratón	DL	90	(Spector, 1956)

[a] Versión condensada de datos recopilados por George (27)

Como las saponinas son potentes surfactantes interaccionan con la capa de la semilla y/o las membranas al mismo tiempo que penetran al embrión; ésta interacción resulta en una reducción del consumo de oxígeno por el embrión y se expresa en una inhibición de la germinación, también se observó que la inhibición dependía del período de proinmersión de la semilla en la sol. de saponina, ésta resulta irreversible si se sumerge por seis horas o más.

Otros investigadores indican que como las saponinas tienen propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, causan cambios en la micro estructura natural de las membranas celulares . Esta hipótesis se cimienta por experimentos con surfactantes sintéticos de diferente composición química y observaciones en microscopio electrónico en las cuales se muestra el daño sufrido a las membranas por saponinas de alfalfa y otras sustancias surfactantes; afectando la permeabilidad hacia el oxígeno .

Se ha observado que las saponinas de alfalfa y de soya inhiben a ciertas enzimas, como por ejemplo: la alfa-quimotripsina, las proteasas del Triboliu y la colinesterasa, así como las enzimas concernientes al

ciclo del ácido cítrico. La inhibición es no-específica y se ve suprimida por la presencia de cualquier otra sustancia proteínica (31).

Se han estudiado los efectos que las saponinas tienen sobre los niveles de colesterol en sangre. Algunos estudios mencionan que ciertas saponinas forman un complejo insoluble con el colesterol que en el intestino previene su absorción y por lo tanto disminuyen los niveles de colesterol en plasma. Pero ésto es contradictorio ya que la disminución de colesterol se ha probado con saponinas que no forman complejos con esteroles (Cheeke (24)). La mejor explicación que se ha encontrado, es que una dieta con saponinas induce la adsorción de los ácidos biliares sobre la fibra de la dieta.

La adsorción de ácidos biliares sobre la fibra dietética se ha sugerido como un mecanismo general para explicar la disminución de colesterol con muchos alimentos de origen vegetal. Un experimento "in vivo" en el cual se incluye saponina purificada (comercial) en una dieta se incrementa la excreción de ácidos biliares en el material fecal de ratas y cerdos, disminuyendo los niveles de colesterol.

Con algunas plantas se reporta una disminución del nivel de colesterol en ciertos animales; éstos datos se describen en la tabla 4.

Según Carroll (32) se probó con diferentes fuentes de proteína animal y vegetal sobre conejos y se observó un nivel bajo de colesterol en el caso de la alimentación a base de plantas que contenian saponinas, ver tabla 5.

Las saponinas producen hemólisis en diferentes tipos de glóbulos rojos (33); la hemólisis se define como la destrucción de los glóbulos rojos, que produce liberación de hemoglobina (34).

La membrana celular de los eritrocitos está constituida por esteroles, fosfolípidos y proteínas, ver figura 3. E.Schlosser (35), observó que quince saponinas y seis sapogeninas formaron complejos con el colesterol, pero no con lecitina ni con albúmina; esto implica que el punto de ataque en la hemólisis con saponinas, es el colesterol de la membrana de los eritrocitos.

Schmidt-Thome (36), estudiando la reacción, encontró que se necesita una mínima cantidad de saponinas que rodeen a la membrana para que se produzca la hemólisis,

TABLA 4.

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 y humano	Referencia
* Alfalfa (Medicago sativa)	Conejo	(Horlick et. al. 1976)
* Avena	Pollo	(Fischer & Griminger 1967)
* Avena Industrializada	Hombre	(de goot et. al. 1963)
* Garbanzos (Cicer arterium)	Hombre	
* Frijol garbanzo (Phaseolus mungo)	Hombre	
* Garbanzo verde (Phaseolus radiatus)	Hombre	(Mathur et. al. 1968)
Haba (Dolichus biflorus)	Hombre	
Garbanzo rojo (Cajanus cajan)	Hombre	
Frijoles (Phaseolus vulgaris)	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)
* Proteina de soya texturizada	Hombre	(Sirtori et. al. 1977)
* Soya aislada	Conejo	(Crrull, 1677; Belton & Truswell 1978)
* Lecitina de soya	Hombre	(Simons, 1978)

Datos tomados de "Saponins in food" (42)

TABLA 5.

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

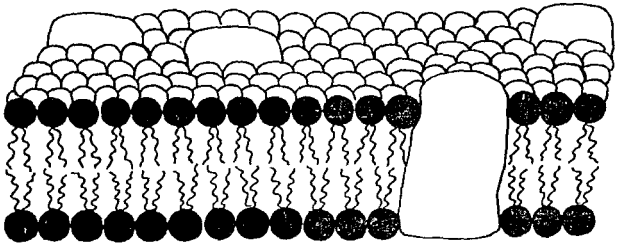
FUENTE PROTEINA	COLESTEROL DE PLASMA (mg/ml) [b]
Huevo entero	235
Leche desnatada	230
Lactoalbúmina	215
Caseína	204
Pescado	166
Bistek de res	166
Bistek de puerco	110
Clara de huevo	105
Nabo silvestre	95
Gluten de trigo	80
Cacahuates *	80
Semilla de algodón	76
Semilla de sésamo *	70
Proteína de soya aislada *	67
Semilla de girasol *	53
Chícharo *	41
Frijoles Faba *	30

[b] Promedio de 4-6 animales

* Planta que contiene saponina

Datos tomados de " Saponins in food " (42)

MODELO PARA UNA MEMBRANA CELULAR .



Las membranas se componen en parte de una bicapa de lípidos con sus cabezas hidrofílicas formando las superficies interna y externa de la membrana y sus colas de ácidos grasos hidrofóbicas, concentrándose en el centro de la membrana. Las proteinas están ya sea embebidas en la bicapa de lípidos, o se encuentran princi_ palmente en la superficie .

FIGURA 3 .

que es una consecuencia de que las moléculas de saponina se unan al colesterol, dando lugar a la formación de canales en la membrana y/o una posible desnaturalización.

La velocidad de hemólisis varía marcadamente con diferentes saponinas (37). A su vez con una saponina dada, la velocidad de la reacción será diferente, dependiendo de la clase de eritrocitos a probar, por ejemplo según Ewart (24), clasificó ciertos eritrocitos según su susceptibilidad a la hemólisis: hamster,caballo>perro, rata, conejo>hombre, cerdo>cabra .

Jocs y Ruyssen (8), afirman que no todas las saponinas hemolíticas forman colesteroides. Esto es verdadero para las saponinas ácidas o triterpenoides.

Gestetner (8), utilizando saponinas de alfalfa y diferentes esteroles, comprobó que la capacidad hemolítica y antimicrobiana que presentan los glucósidos es el resultado de la interacción que tienen con el colesterol de las membranas.

Comparando la actividad hemolítica con otras propiedades, se han obtenido diversos resultados; algunos investigadores no han encontrado relación entre la actividad hemolítica, la dosis letal en ratones y el efecto inflamatorio que algunas saponinas presentan. Lindahl, también reportó que no hay correlación entre hemólisis y otros efectos fisiológicos de las saponinas de alfalfa (17) No obstante, Awe y col. y Vacek y col. (8), demostraron que hay correlación entre producción de espuma, tensión superficial, actividad hemolítica y toxicidad.

Gestetner (38), demostró que la toxicidad de las saponinas es debida principalmente a la fracción de saponina, cuya aglicona está constituida por ácido medicagénico y que su actividad puede ser inhibida por colesterol y beta-sitosterol. Esto se explica por la habilidad de los esteroles para formar compuestos insolubles en agua con las saponinas.

Mas recientemente Assa y col. (17), estudiaron los elementos de la membrana que están asociados al mecanismo de la hemólisis de los eritrocitos con saponinas y encontraron que forman productos de interacción de diferente estabilidad con el colesterol, proteínas y fosfolípidos de la membrana; no encontrando interacción alguna entre los ácidos grasos de la membrana. Los cambios estructurales resultan de la interacción de los componentes ya mencionados y las saponinas, afectando la actividad de la membrana, surgiendo entonces el rompimiento de la estructura de la membrana y provocando la hemólisis.

III.4) METODOS DE ANALISIS PARA SAPONINAS.

III.4.1) C R O M A T O G R A F I A .

La cromatografía es un proceso de separación el cual depende de la distribución diferencial del compuesto o de una mezcla entre una fase móvil y una estacionaria.

Todas las técnicas cromatográficas tienen un principio en común: una sol. líquida o gaseosa, por ejemplo, que es llamada fase móvil, la cual pasa a través de un adsorbente llamado fase estacionaria. Los diferentes compuestos de una muestra se mueven a través del adsorbente en distintos intervalos dependiendo de sus diferencias físicas, como la presión de vapor, solubilidades, capacidad de adsorción, etc. con respecto a la fase móvil y estacionaria.

Las técnicas cromatográficas, principalmente utilizadas son:

1.Cromatografía de capa fina (TLC)

2.Cromatografía en columna líquido-sólido

3.Cromatografía de gas-líquido (GLC)

4.Cromatografía líquida de alta-resolución (HPLC)

En general las técnicas cromatográficas se usan para: establecer la pureza y autenticidad de ciertos materiales o reactivos, monitorear diferentes reacciones, para optimizar condiciones experimentales, para comparar constantes físicas, para separar compuestos en una mezcla, etc.

En años recientes la cromatografía líquida de alta resolución ha sido una herramienta muy útil para trabajos analíticos y preparativos como por ejemplo, en el área de separación de isómeros. Sin embargo, el equipo, el costo de operación y los materiales de la columna son muy costosos en comparación con la cromatografía de capa fina o de columna (39).

Por su caracter polar, las saponinas se manejan en forma adecuada en la cromatografía de capa fina (40), (41).

Esta técnica emplea usualmente una base sólida en la cual se adhiere la fase estacionaria, que puede ser: sílica gel, alúmina ó Kieselguhr por mencionar algunas.

La selección del disolvente, que será la fase móvil, depende de la polaridad de la sustancia en estudio, para lo cual deben realizarse una serie de pruebas con varios disolventes o mezclas de ellos hasta obtener un desplazamiento adecuado.

Las cromatoplacas se introducen en una cámara previamente saturada de los disolventes seleccionados como sistema móvil.

Los disolventes que se recomiendan para la separación en las láminas de capa fina, para saponinas, son resumidos en la tabla 6.

TABLA 6.

DISOLVENTES SUGERIDOS PARA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE SAPONINAS EN SILICA-GEL.

DISOLVENTE	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	(Tscheesche & Wulff, 1973)
Ac. Acético/etanol/agua 70:15:15	ácido y neutro	(Tschesche & Wulff, 1973)
n-Butanol/etanol/agua[a] 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)

[a] Desarrollado en base a cromatografía en papel

Datos tomados de " Saponins in food " (42).

La localización de las manchas se realiza generalmente con sustancias de revelado como por ejemplo: vapores de iodo, sustancias aplicables en spray o mediante luz ultravioleta.

Para el caso de las saponinas hay una gran variedad de reactivos de revelado que pueden ser usados, los cuales dan reacciones positivas para esteroides o triterpenos en general (42), pero no son específicos de saponinas y es necesario que se usen varios criterios para su identificación, ver tabla 7. Las láminas pueden ser rociadas también con reactivos específicos para azúcares, tal como el nitrato de plata.

Si las condiciones experimentales son reproducibles, el movimiento de una sustancia con relación al del disolvente (fase móvil) en el sistema cromatográfico es constante y característico de la sustancia.

La constante, es el valor llamado Rf, que se define como:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

En la figura 4 se indica el método de medición del valor de Rf, para cada componente de un cromatograma típico (43).

TABLA 7.

REACTIVOS DE REVELADO PARA LA DETECCION DE SAPONINAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

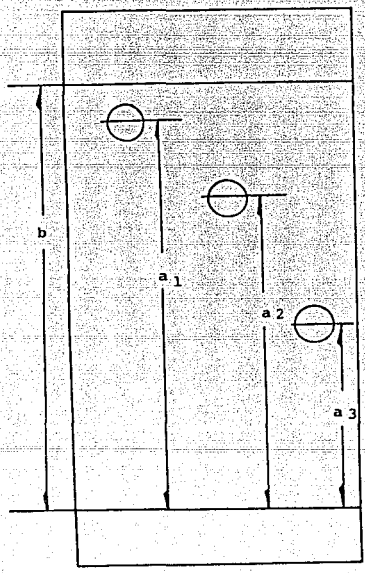
NOMBRE	COMPOSICION	CONDICIONES	COLOR [a]
Carr-Price	Tricloruro de antimonio saturado en $CHCl_3$ [b]	calor a 105°C por 15 min.	verde-azul-gris
Liebermann-Burchard	30% anhídro acético en ácido sulfúrico al 50%	color a 90°C por 10 min.	verde-azul
Vainillin-ácido fosfórico	Sol. de vainillina al 2% en ac. fosfórico/ etanol (1:4)	calor a 120°C 10-20 min.	gris-azul-malva
Ekkert	1% p-anisaldehído 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 deben tener precauciones durante su uso.

Datos tomados de " Saponins in food " (42).

METODO DE MEDICION PARA EL VALOR Rf .



$$Rf_{\lambda} = \frac{a_{\lambda}}{b}$$

FIGURA 4.

III.4.2) METODO DE TENSION SUPERFICIAL O NUMERO DE ESPUMA.

La espuma es considerada como un tipo de emulsión, cuya fase interior es un gas, la cual necesariamente tiene un componente surfactante presente para dar estabilidad.

La espuma puede presentarse como: una burbuja esférica aislada, un par de éstas, tres, cuatro o más, aparentemente unidas, formando entre ellas arreglos poliédricos (ver figura 5) (44).

Las saponinas tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial y actuar como agentes espumantes o emulsificantes, gracias a que presenta una porción polar y otra no polar.

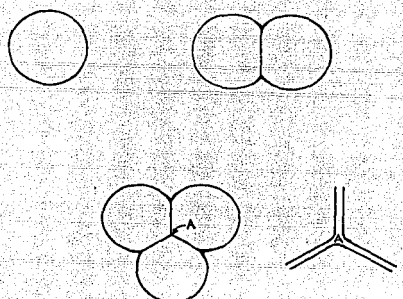
La tensión superficial es la fuerza de atracción entre las moléculas de un líquido, la cual se opone al incremento en su área.

La tensión superficial se define por la siguiente fórmula:

$$TS = \frac{F}{2\,L} = \frac{\text{Fuerza}}{\text{unidad de longitud}}$$

TS = Tensión superficial

ARREGLOS AISLADOS Y POLIEDRICOS DE LA ESPUMA .



A= Visualiza cómo la unión entre las burbujas esféricas nunca se realiza entre líquido-líquido sino entre líquido-gas .

FIGURA 5.

Así resulta evidente que la tensión superficial es el trabajo necesario para producir un incremento unitario del área superficial o la fuerza que actúa sobre una unidad de longitud de la superficie. Las unidades de la tensión superficial son: erg/cm^2 ó dina/cm (45).

El método de determinación de saponinas por el número de espuma fué propuesto por F.W. Appleton en 1921 y E. Pfrau en 1955 (46).

El método no es recomendable para una determinación cuantitativa, ya que la altura de la espuma y su densidad depende de varios factores tales como: agitación, el recipiente ó tubo donde se realice la prueba, la temperatura, etc.; pero sí es de gran ayuda para una detección cualitativa por su fácil realización .

III.4.3) <u>INDICE DE HEMOLISIS.</u>

La hemólisis se define como la destrucción de los glóbulos rojos que produce liberación de hemoglobina (34), y mediante la solución transparente de color rojo, por la hemoglobina, es como se detectan los índices de hemólisis.

La hemoglobina (Hb) es una proteína pigmentada de color rojo que transporta oxígeno en los eritrocitos de los vertebrados. Esta molécula es un tetrámero globular formado por dos pares de cadenas polipeptídicas disimiles; cada cadena transporta un derivado porfirínico que

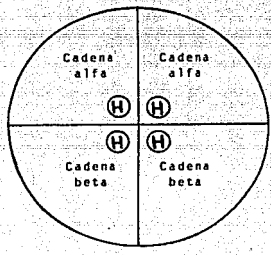
contiene hierro denominado hemo, una ferroprotoporfirina IX, en la que un átomo de hierro está situado en el centro del anillo porfirínico (ver figura 6).

Este método de análisis para saponinas fué propuesto por primera vez en 1912 por R. Kobert, y ha sido muy utilizado (46).

En el método una suspensión de glóbulos rojos se hemoliza con las saponinas disueltas en un extracto de determinada 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.

En cuanto a la forma de acción de las saponinas sobre el glóbulo rojo la teoría más reciente es de Assa y col. (8), en ella se menciona que las saponinas forman productos de interacción de diferente estabilidad con el colesterol, proteínas y fosfolípidos de la membrana, lo que afecta su actividad surgiendo entonces el rompimiento de la estructura y provocando hemólisis.

(a) DIAGRAMA DE LA ESTRUCTURA DE UNA MOLECULA DE Hb .



(b) DIAGRAMA DE LA ESTRUCTURA DEL HEMO.

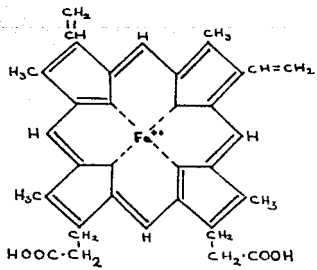


FIGURA 6

III.4.4) OTROS METODOS.

III.4.4.1) ULTRAVIOLETA (U.V.).

Las saponinas y sus agliconas no absorben en el espectro ultravioleta, ya que carecen de grupos cromóforos, pero dan coloraciones con varios reactivos ácidos, como el de Liebermann-Burchard, Sulkowski, cloruro de tionilo y tricloruros de antimonio. Debido a las reacciones de las saponinas con dichos reactivos se han empleado para su cuantificación (47), (48).

III.4.4.2) RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (R.M.N.)

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

III.4.4.3) ESPECTROMETRIA DE MASAS (E.M.)

Debido a su escasa volatilidad y a la ruptura casi instantánea del enlace hemiacetálico de los glucósidos, en especial de las saponinas no se les determina su espectro de masas, pero el de sus agliconas y sus derivados acetilados o cetónicos sí y han sido objeto de varios estudios.

III.4.4.4) INFRARROJO (I.R.).

En éste método 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" sapogenina.

En la tabla 8 se muestran algunas características de esta determinación en sapogeninas. (49)

III.4.4.5) ACTIVIDAD OPTICA .

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, etc., las rotaciones van de -6° a +5° 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° a +120°.

TABLA 8.

CARACTERISTICAS DE LAS BANDAS DE ABSORCION DE LAS SAPOGENINAS

ACETATO DE SAPOGENINA	LONGITUD DE ONDA (micrones)	No. DE ONDA cm^{-1}	ABSORTIVIDAD MOLAR $L. Mol^{-1} cm^{-1}$
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

Datos tomados de " Métodos usados para la determinación de saponinas " (49) .

III.4.4.6) INDICE DE PESCADO

El método está basado en la observación del grado de toxicidad de las saponinas sobre los pesces, siendo mayor la concentración del tóxico si el grado de toxicidad aumenta. El método es considerado de tipo indirecto (42).

III.5) USOS DE LAS SAPONINAS.

Las saponinas se utilizan como sustancias que disminuyen la tensión superficial, como espumantes y emulsificantes en productos como: detergentes, helados, bebidas carbonatadas, shampoos, jabones y extinguidores de fuego, también para disminuir la tensión superficial de emulsiones fotográficas.

Las saponinas esteroides, en especial las que se extraen de especies de Dioscorea, son fuentes importantes de materia prima para la síntesis de hormonas (progesterona y cortisona) y otros productos esteroides. Actúan también como estabilizadores de emulsiones. Se usan como protectores coloidales en rociadores de polvos saborizantes, varias patentes utilizan la glicirhizina en forma de sales de amonio, sodio y potasio (50).

IV.- P A R T E E X P E R I M E N T A L .

IV.1) MATERIAL Y METODOS.

IV.1.1) EQUIPO UTILIZADO.

Extractor de grasa Goldfisch- Labconco .

Cartuchos de celulosa- Whatman, dimensiones: 22x80 mm.

Balanza analítica- Sartorius.

Rotavapor- Büchi, modelo R .

Centrífuga- Clay Adams, modelo Dynac .

Incubadora bacteriológica- Electric Company, modelo Blue M de convección gravitacional .

Espectrofotómetro- Coleman Junior, modelo $6|^{20}_{A}$, con celdas de vidrio- Perkin Elmer (dimensiones: 10x75 mm.) y adaptador de celdas que permiten el paso de 1 cm^2 de luz .

Incubadora con agitación- Lab-Line.

Cromatofolios AL-Merck de sílica-gel 60 (sin indicador fluorescente) para cromatografía en capa fina, espesor de capa 0.2 mm., dimensiones: 20x20 cm.

Cámara cromatográfica de vidrio para placas de 10x20 cm.

Micropipetas de gota- Cook Microtiter Sistem, Dynatech Laboratories, INC., de 0.050 ml.

Microdilutores- Cook Microtiter Sistem, Dynatech Laboratories, INC., de 0.050 ml.

Placas de calibración- Cook Microtiter Sistem, Dynatech Laboratories, INC., de 0.050 ml.

Placas de microtitulación reutilizables- Cook Microtiter Sistem, Dynatech Laboratories, INC., tipo "U" .

Espejo adaptado para lectura de hemólisis en las placas de microtitulación .

Papel filtro Whatman No. 1 .

IV .1.2) REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS .

Solución de metanol(R.A) y agua(destilada) al 85 % (v/v) .
Eter de petróleo (R.A) .
Solución de cloruro de sodio (R.A) y agua al 0.9 % (m/v) .
Heparina como anticoagulante de 5000 UI/ml .
Solución de proteasa (tripsina de páncreas porcino (Sigma t-8128)) al 0.1% en solución salina (0.9%) (m/v) .
Solución estandar de saponinas al 0.5% en solución salina (0.9%); el estandar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina de tipo esteroidal) de la casa SIGMA y un extracto de quillaja (saponina de tipo triterpenoide) de la casa BDH .
Solución 1:10 de ácido sulfúrico (R.A.) y etanol (R.A.), utilizado como revelador para cromatografía .
Solución de butanol-etanol-amoniaco (R.A.), en relación 3.5:1:2.5 ,como fase móvil para cromatografía .
Metanol (R.A.) .
Etanol (R.A.) .

IV.1.3) MATERIAL VEGETAL UTILIZADO.

MUESTRA VEGETAL (NOMBRE VULGAR)	PARTE (*) UTILIZADA	NOMBRE CIENTIFICO		LUGAR DE RECOLECCION
Nescafé	H.de semilla	Stizolobium	cinerium	Veracruz
F.Colorado de Vega	H.de semilla	Phaseolus	vulgaris	Chiapas
Parota	H.de semilla	Enterolobium	cyclocarpum	Veracruz
Maguacata	H.de semilla	Pithecollobium	flexicaule	Tamaulipas
Tepehuaje	H.de semilla	Lysiloma	acapulcense	Jalisco
Palo Fierro	H.de semilla	Pithecollobium	undulatum	Sinaloa
Güinole	H.de semilla	Acacia	coelliacantha	Sinaloa
Jinicuil	H.de semilla	Inga	radians	Chiapas
Cacahuanano	H.de semilla	Gliricidia	sepium	Guerrero
F.Colorado de Suelo	H.de semilla	Phaseolus	vulgaris	Chiapas
Barbasco	H.de rizoma fermentado	Dioscorea	composita	Chiapas
Haba	H.de semilla	Vicia	faba	Mex.D.F.
Soya	H.de semilla	Glycine	max	Mex.D.F.
Chícharo	H.de semilla	Pisum	sativum	Mex.D.F.
Avena	H.de semilla	Avena	sativa	Mex.D.F.
Maguey	H.de hoja	Agave	mapisaga	Edo. de Mex
Alfalfa	H.de hojas y tallos	Medicago	sativa	Mex.D.F.

* Muestras desengrasadas y molidas, con malla de 1 mm. para el diámetro de partícula .

Dentro de las muestras vegetales se seleccionaron dos muy importantes: alfalfa y maguey, para realizar los estudios de extracción de las saponinas y su detección, ya que respectivamente una contiene saponinas de tipo triterpenoide y la otra de tipo esteroide , ésto con el fin de que el método sea lo más general posible.

El cacahuanano se seleccionó para realizar los estudios del grado de recuperación del método general semicuantitativo, ya que no contiene saponinas. Por lo que se refiere a los demás vegetales, se utilizaron para realizar la aplicación del método sobre algún meterial ya reconocido y estudiado como : soya, chícharo, avena y haba; y otro no tan estudiado como: nescafé, frijol colorado de vega, parota, jinicuil, maguacata, tepehuaje, palo fierro, gÜinole, basbasco y frijol colorado de suelo.

IV.1.4) SANGRE HUMANA Y DE DISTINTAS ESPECIES ANIMALES. * *'

ANIMAL	
NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO
Rata	*Rattus noruegicus*
Hamster	*Mesocricetus auratus*
Cuyo	*Cavia porcellus*
Perro	*Canis familiaris*
Conejo	*Oryctolagus cuniculus*
Ratón	*Mus musculus*
Vaca	*Bos taurus*

Sangre humana tipo A

* En todos los casos se utilizó únicamente la sangre del animal .

*' Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Fac. de Química de la U.N.A.M. (C.U) .

IV.1.5) MATERIAL ESTADISTICO UTILIZADO.

Para el estudio estadístico se recurrió al uso de un procesador personal con el apoyo del software estadístico STATGRAPHICS (ver. 2.6) y las siguientes referencias: (51), (52).

IV.1.6) METODO DE TRABAJO GENERAL.

El trabajo experimental de la tesis se presenta en el diagrama de bloques (figura 7), en el cual se definieron cinco módulos.

En el primer módulo se realizó una revisión bibliográfica.

Para el segundo módulo en base a la información bibliográfica, se determinó el método de detección más adecuado tratando de aprovechar la capacidad hemolítica de las saponinas; sin descartar la posibilidad de algún otro método que reuniera las siguientes características:

A) Que fuera rápido y fácil.
B) Que presentara una especificidad y sensibilidad adecuada
C) Que fuera general para los dos tipos de saponinas.
D) Que los reactivos y equipo necesarios fueran de fácil acceso.

DIAGRAMA DE TRABAJO GENERAL

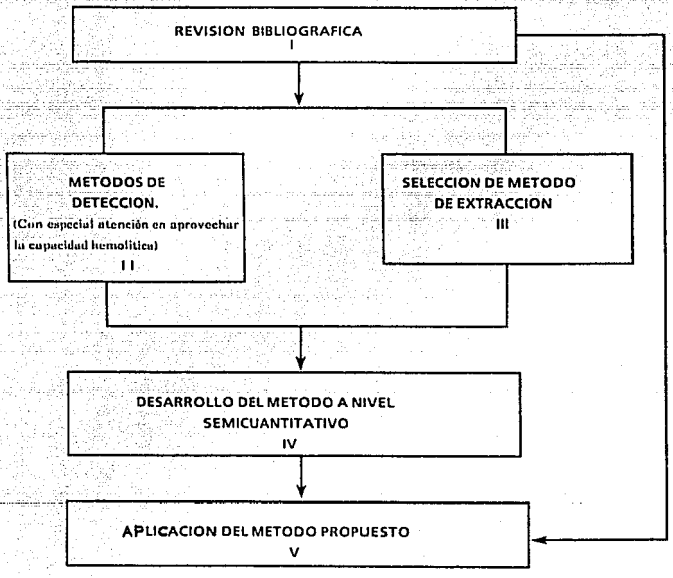


FIG. 7

En el tercer módulo, una vez establecidas las condi_ciones de detección, se procedió a buscar experimental_mente el proceso de extracción más adecuado; para lo cual se contempló lo siguiente:

A) Que el proceso incluyera los dos tipos de saponinas.

B) Que la extracción fuera lo más completa y rápida posi_ble.

En el cuarto módulo, una vez definidos los anteriores y en base a los datos experimentales con que se cuente, se replantearon y evaluaron las ventajas y desventajas de cada uno de los parámetros y se realizaron los estudios estadísticos convenientes.

El quinto módulo es la última fase del trabajo donde en primera instancia se realizó un estudio del grado de recuperación, por la adición de una cantidad conocida de saponina y la aplicación de la metodología propuesta. Como parte final se realizó la determinación de saponinas en diversas muestras vegetales de interés.

IV.1.7) METODOS PARA DETERMINAR EL MODULO DE DETECCION.

IV.1.7.1) METODO DE CROMATOGRAFIA.

La cromatografía en capa fina se realizó en placas de silicagel, se aplicaron de 5 a 30 microlitros de un estándar de saponina al 1% en solución de metanol-agua (90:10), con un capilar calibrado de 5 y 10 microlitros; como se muestra en la figura 8.

Las placas se corrieron en un sistema de butanol-etanol-amoniaco, con una relación de 3.5:1:2.5 .

El revelado se efectuó con una solución de ácido sulfúrico-etanol (1:10), que se aplicaron con ayuda de un atomizador, las placas se calentaron a 110°C por 30 minutos.

IV.1.7.2) METODO DE TENSION SUPERFICIAL O ESPUMA.

El método se realizó con la agitación mecánica de una solución acuosa de saponinas con concentraciones de 2,4,8,16 y 24 mg/ml, en probetas de 10 ml de fondo plano, a una temperatura de 30°C por 10 min., con agitación mecánica oscilatoria de 104±6 oscilaciones/min. (graduación 5 de la incubadora con agitación Lab-line) .

Al finalizar la agitación se esperaron 5 min. y se tomó la lectura de la espuma, con la propia graduación de la probeta.

APLICACION DE LAS MUESTRAS EN LA PLACA PARA TLC.

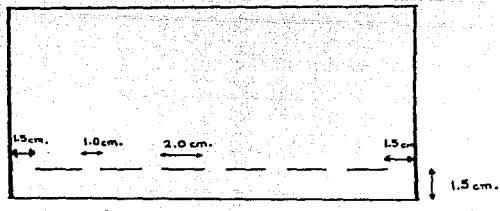


FIGURA 8.

IV.1.7.3) METODO DE HEMOLISIS. (53), (54).

En éste método primero se utilizaron glóbulos rojos sensibilizados de varios animales y sangre humana tipo A, los cuales fueron de: rata, hamster, cuyo, perro, conejo, vaca y ratón; para determinar el tipo de eritrocitos más sensibles a la hemólisis, y trabajar posteriormente con ellos.

Una vez que se decidió la sangre con la que se trabajó se realizó una prueba de hemólisis con una solución estándar de saponinas al 1% en solución salina (0.9%) para observar la mínima cantidad que produce hemólisis. Los pasos a seguir para la prueba se describen a continuación:

La sangre de conejo con anticoagulante (0.1 ml de heparina de 5000 UI/ml para 5 ml de sangre) se transvasó a tubos de centrífuga para lavarla (3 veces) con solución salina (0.9%), en una proporción de sangre:sol.salina de 1:5 . Se efectuó una centrifugación a 50 U, aproximadamente 1500 r.p.m., por 15 min., después por decantación se eliminó el líquido sobrenadante.

Ya terminado el tercer lavado se diluyó el paquete de glóbulos rojos al 4%, para lo cual por cada mililitro de eritrocitos (paquete), se añadieron 24 ml de solución salina (0.9%), y se filtraron a través de gasa.

Para la sensibilización, por cada 10 ml de glóbulos rojos al 4%, se agregó 1 ml de solución de proteasa, se colocó en la incubadora por espacio de 1 hora a 37°C, después de lo cual se volvió a lavar <3 veces> centri_ fugando para eliminar la enzima a 50 U, aproximadamente a 1500 r.p.m., por 15 min. con solución salina (0.9%). Se midió el paquete de eritrocitos y se resuspendío al 5%, para lo cual por cada mililitro de glóbulos rojos se añadieron 19 ml de solución salina (0.9%), se colocó la suspensión de eritrocitos en un matraz filtrándola con gasa.

En el ajuste de la suspensión de eritrocitos se tomaron 0.5 ml de éstos agitando para homogenizar la solución y se adicionaron 2 ml de sol. salina (0.9%), en las celdas, ajustando a 100% de transmitancia con sol. salina (0.9%). Se mantuvo una longitud de onda de 620 nm., se diluyó tanto como fué necesario la suspensión de eritrocitos, hasta obtener una lectura de 26% $\pm$ 0.5 de transmitancia.

La microtitulación se realizó en placas de tipo "U", se colocaron en cada pozo 50 microlitros de solución salina (0.9%), con el pipeteador de gota (figura 9).

Se llenó el microdilutor (figura 10) con 50 microli_ tros del extracto problema o del estándar de saponina, y se calibró el volumen con las placas de la figura 11.

PIPETEADOR DE GOTA .

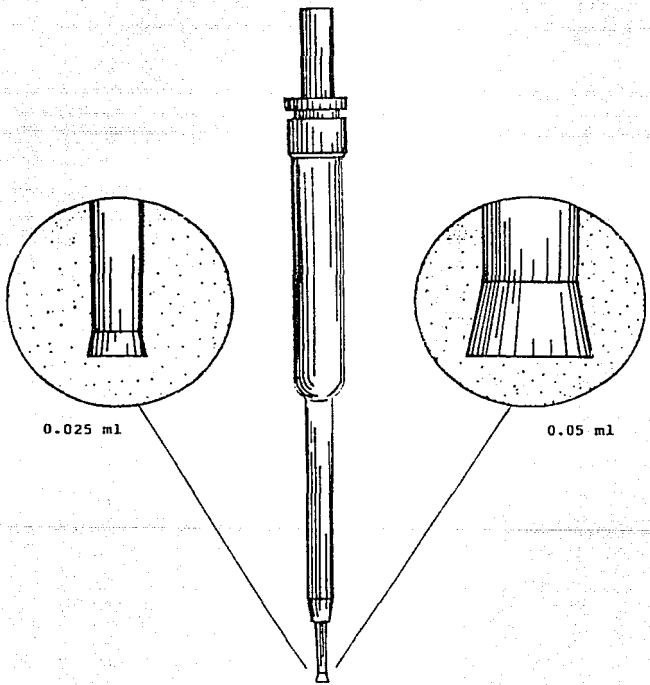


FIGURA 9.

MICRODILUTOR .

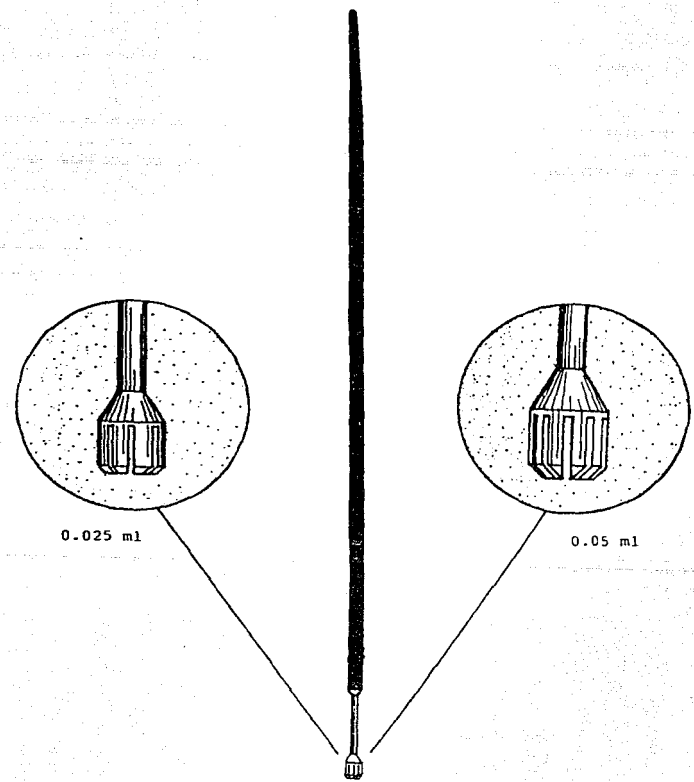


FIGURA 10.

PLACA DE CALIBRACION .

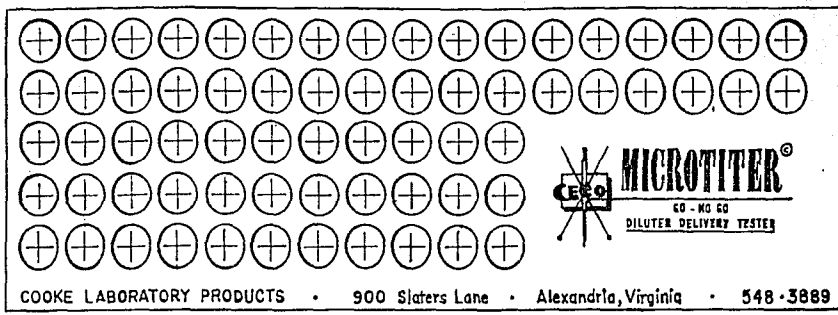


FIGURA 11.

Una vez calibrado el volumen, se realizaron diluciones sucesivas desde el primer pozo (siguiendo la hilera horizontal hasta donde se desee) y se eliminó el residuo de la última dilución (figura 12).

Ya realizadas las diluciones pertinentes, se colocaron con el pipetcador de gota 50 microlitros de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y ajustados, teniendo siempre un control negativo con solución salina (0.9%) sin extracto problema y otro positivo con solución salina (0.9%) y el estándar de saponinas al 0.5% en sol. salina 0.9%.

Se rotó la placa en forma circular sobre una superficie plana, para homogeneizar, y se colocó en la incubadora por 1 hora a 37°C; una vez transcurrido el tiempo de incubación se puso la placa con todo cuidado en el dispositivo especial para poder realizar la lectura.

Para obtener el título de hemólisis se observó a través del espejo adaptado al dispositivo y se localizó en la hilera horizontal de la placa, el número que correspondió al último pozo donde se apreció la hemólisis, y que resulta ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

PLACA DE MICROTITULACION DE TIPO "U" .

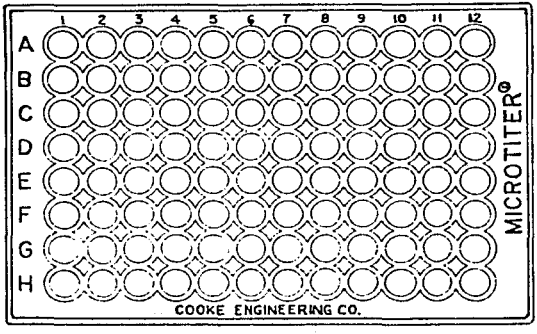


FIGURA 12 .

IV.1.8) METODOS PARA DETERMINAR EL MODULO DE EXTRACCION .

IV.1.8.1) PRUEBA DE DISOLVENTES.

Antes de aplicar los métodos de extracción se realizó una prueba de solubilidad, de diferentes disolventes con un estándar de saponinas (triterpenoide y esteroide), estos fueron: agua, solución salina 0.9%, etanol, metanol, etanol-agua (95:5), etanol-agua (90:10), etanol-agua (85:15), metanol-agua (95:5), metanol-agua (90:10) y metanol-agua (85:15).

El peso del estándar de saponina fué de 50 mg. aproximadamente, la adición del disolvente se realizó con bureta y la temperatura se controló a 25°C.

De esta prueba se decidió el disolvente o su dilución en agua, que se utilizó para cada método de extracción.

IV.1.8.2.) EXTRACCION MEDIANTE AGITACION MECANICA.

Se pesaron 2.5, 5.0 y 7.5 gramos respectivamente de muestras de alfalfa y maguey, se colocaron en un vaso de precipitados de 250 ml., se le adicionaron 50 ml de sol. salina 0,9% y se colocó un agitador magnético, estos se pasaron a una parrilla con agitación y se realizó la extracción de las saponinas por un tiempo de 1, 2 y 4 horas a 300 r.p.m., a la mitad del tiempo respectivo se le adicionaron unos 10 ml más de sol. salina.

Una vez terminado el tiempo de extracción, las muestras se pasaron cuantitativamente a tubos de centrífuga,

se balancearon por pares y se colocaron en la centrífuga. Se centrifugaron los tubos con las muestras a 50 U, aproximadamente 1500 r.p.m., por 10 min.; el sobrenadante se filtró con ayuda de vacío, y se pasó a un matraz aforado de 100 ml, esta operación se realizó de nuevo adicionando al sedimento de los tubos, que es la muestra vegetal, más solución salina 0.9%, homogeneizando perfectamente, hasta aforar con el sobrenadante los 100 ml del matraz.

Ya que se tienen los diferentes extractos se detectaron con glóbulos rojos de conejo sensibilizados, como se explica en la sección IV.1.7.3. de la tesis.

IV.1.8.3) EXTRACCION EN EL APARATO GOLDFISCH.

Se pesaron 2.5, 5.0 y 7.5 gramos respectivamente de muestra de alfalfa y maguey desengrasada con éter de petroleo, y se colocaron en cartuchos de celulosa, estos a su vez se pusieron en los portadedales y en el extractor Goldfisch.

La extracción se realizó a la máxima temperatura del aparato por 1, 2 y 4 horas, con metanol-agua (85:15), por ser la solución extractora para las saponinas, que se seleccionó de la prueba de disolventes.

Una vez terminado el tiempo de extracción, la solución que se tiene, se concentró a sequedad en el rotavapor, ya concentrada se resuspendió en solución salina 0.9%, y se filtró con ayuda de vacío, pasando el filtrado a un matraz aforado de 100 ml, llevando al volumen correspondiente con la misma solución.

Ya que se tienen los diferentes extractos se detectaron con eritrocitos de conejo sensibilizados, como se explica en la sección IV.1.7.3 de la tesis.

IV.1.9) METODO PARA DETERMINAR EL GRADO DE RECUPERACION.

Se asignó una muestra vegetal en la cual no se encontraron presentes las saponinas (cacahuanano), de ésta se pesaron 7.5 gramos ya desengrasados con éter de petroleo y se les adicionaron 0.25 gramos del estándar de saponina, se realizó la extracción en el aparato Goldfisch por 2 horas, teniendo como disolvente de las saponinas metanol-agua (85:15) y a la máxima temperatura del aparato.

Una vez finalizado el tiempo de extracción, la muestra se concentró a sequedad en el rotavapor, luego se resuspendió en sol. salina 0.9%, y se filtró con ayuda de vacío , se pasó el filtrado a un matraz aforado de 50 ml y se llevó al volumen correspondiente con dicha solución.

Ya que se tiene el extracto se detectó la presencia de saponinas con eritrocitos de conejo sensibilizados como se explica en la sección IV.1.7.3 de la tesis, y se comparó el título de hemólisis con un estándar de saponina al 0.5% en solución salina (0.9%), que se detectó en la misma forma dándole un valor del 100% de recuperación.

IV.2) R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N .

IV.2.1) DETECCION DE SAPONINAS .

METODOS PARA LA DETECCION DE SAPONINAS.

METODO	CONC. DETECTADA DE SAPONINAS mg	µg
Cromatografía en capa fina.	0.05	50
Tensión superficial (espuma).	2.00	2000
Prueba de hemólisis.	$1*10^{-3}$	1.0

En cuanto al método de detección se realizaron las tres pruebas señaladas anteriormente, de las cuales, en la cromatografía de capa fina se tiene como límite para detectar a las saponinas un valor de 50 µg. Este método de detección resulta ser cualitativo si solo se comparan los Rf ó si se quiere cuantificar, se vuelve una prueba muy laboriosa ya que conlleva a procesos de purificación más elaborados, teniendo además la necesidad de contar con diferentes tipos de estándar para su determinación , por lo anterior no cumple con los objetivos propuestos de ser una prueba lo suficientemente sensible, ni tan sencilla.

En la prueba de tensión superficial ó espuma se observa una sensibilidad muy baja comparando con las otras pruebas, además resulta ser poco reproducible, ya que depende de muchos factores como son: la agitación, la temperatura, el recipiente donde se realice la prueba y la relación muestra/disolvente; por lo anterior no resulta ser lo suficientemente sensible, pero sí se puede realizar conjuntamente con otro método de detección, siendo una prueba presuntiva de tipo cualitativo por cumplir con los objetivos de ser sencilla y de rápida aplicación.

El último método de detección es la prueba de hemólisis, en la cual se tiene un valor de sensibilidad muy alto (1 microgramo), comparando con los otros, ésta prueba resulta ser más reproducible, confiable, general, sensible y relativamente rápida, por lo que cumple con muchos de los objetivos fijados siendo no solo de tipo cualitativo sino semicuantitativo.

Se decidió entonces trabajar con la prueba de hemólisis, para la detección de las saponinas, por todo lo discutido anteriormente.

Para el método de hemólisis se realizaron pruebas con diferentes tipos de sangre buscando la más sensible.

Los experimentos se realizaron con un estándar de saponinas al 1% en solución salina (0.9%), para cada tipo de eritrocitos. Estos resultados se muestran en la siguiente tabla:

TITULO DE HEMOLISIS PARA ERITROCITOS DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES Y HUMANA.

ANIMAL DE EXPERIMENTACION	TITULOS DE HEMOLISIS	TITULO PROMEDIO DE HEMOLISIS
Perro	5,5,5,5,5,5,6,6	5.25
Vaca	6,6,6,6,6	6.00
Ratón	6,7,7,7,7,7,7,8	7.00
Rata	7,7,7,7,7,7	7.00
Conejo	7,7,7,7,7,7,8,8	7.25
Hamster	7,7,7,7,8,8	7.33
Cuyo	7,7,7,8,8,8,8,8,8	7.66
Humana (tipo A)	6,6,6,6,6,7,7,7	6.37

Con los valores de título de hemólisis para cada sangre se realizó un estudio estadístico en donde se observan diferencias significativas entre las sangres, el estudio se realizó con la prueba ANOVA y rango múltiple

Los resultados son los siguientes :

ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA I) .

G.L. NIVEL : 7

G.L. ERROR : 52

REL. DE VARIANZA : 22.706

REPETICIONES : 7.5

DIF.MIN. SIGNIFICATIVA : 0.78125

De lo anterior se observa que sí existe una diferencia significativa entre algunas sangres y entre otras no; lo cuál nos dá la pauta para poder elegir entre los tipos de sangre con mayor título de hemólisis .

Este resultado se ejemplifica mejor con el siguiente diagrama de barras :

SENSIBILIDAD A LA HEMOLISIS

```
┼──────────────────────────────────────────────────────────────>
S.perro S.vaca S.hum.S.ratón S.rata S.conejo S.hamsterS.cuyo
┼──────────────┤
        ┼───────────┤
                ┼──────────────────┤
                        ┼──────────────────────────────────┤
```

En este diagrama de barras se observa que la sensibi_ lidad a la hemólisis de las diferentes sangres, aumenta de

izquierda a derecha,para este diagrama, la sangre de perro tiene el valor menor y no tiene diferencia significativa con respecto a la de vaca, pero sí con las demás; la sangre de vaca no tiene diferencia significativa con la humana ni con la de perro, pero sí con las otras sangres; la humana no presenta diferencia significativa con: sangre de vaca, ratón y rata, pero sí con las demás; y por último las sangres que tienen una mayor sensibilidad a la hemólisis y no presentan una diferencia significativa entre ellas son: la sangre de ratón, rata,conejo, hamster y cuyo.

Otra forma de visualizar esta prueba se muestra en la figura 13.

Con el estudio estadístico, por tener una alta sensibilidad a la hemólisis y por la facilidad de obtención, se decidió trabajar con la sangre de conejo para realizar la detección "in vitro" de las saponinas .

Otro experimento adicional que se realizó para el módulo de detección relacionado con la prueba "in vitro" ó de hemólisis, fué el uso de tripsina como sensibilizador de los eritrocitos, este se aplicó con sangre de conejo y un estandar de saponinas al 1% en sol. salina (0.9%), con extractos salinos de alfalfa y barbasco; los resultados son los siguientes:

INTERVALO PARA FACTORES DE MEDIAS
95 % DE CONFIANZA

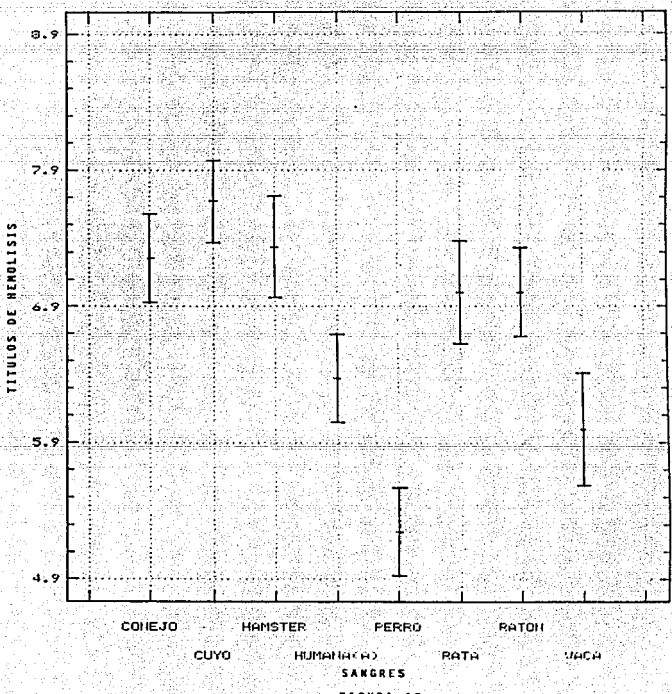


FIGURA 13

TITULO DE HEMOLISIS PARA ERITROCITOS TRATADOS CON Y SIN TRIPSINA.

MUESTRA DETECTADA	TITULO DE HEMOLISIS	
	CON TRIPSINA	SIN TRIPSINA
Estandar de saponina	8 ,8, 8, 8 ,8	7 ,7, 7, 7 ,8
Extracto salino de: Alfalfa	1 ,1, 1, 1 ,1	0 ,0, 0, 1 ,1
Extracto salino de: Barbasco	4 ,4, 4, 4 ,4	3 ,3, 3, 3 ,3

De estas pruebas se observó que el título de hemóli_ sis disminuía, en promedio un valor, si no se utilizaba tripsina para sensibilizar la sangre durante el proceso de preparación de la misma, y además en las placas para detectar la hemólisis, las pruebas positivas no se visua_ lizan perfectamente como en el caso que sí se utiliza; ya que no se sedimentan bien los eritrocitos y se ven difusos esto causa confusión al decidir el título de hemólisis en una prueba .

Por esto, sí es necesario que se realice la sensibi_ lización de los glóbulos rojos, con tripsina, durante la preparación de la sangre .

IV.2.2) EXTRACCION DE LAS SAPONINAS.

El primer paso para determinar el método de extracción más eficiente, fué una prueba de solubilidad realizada con un estándar de saponinas esteroide y triterpenoide (50 mg aproximadamente) y varios disolventes elegidos según los métodos de extracción que se probaron los cuales fueron mediante una extracción mecánica y otra en el aparato Goldfisch, el resultado de la prueba se presenta en el siguiente cuadro:

PRUEBA DE SOLUBILIDAD PARA EL ESTANDAR DE SAPONINA.

ESTANDAR (mg)	DISOLVENTE	VOL.GASTADO (ml)	A*
50.0	Agua	10.0	0.5015
50.2	Sol.salina 0.9%	10.5	0.4761
50.1	Etanol	INSOLUBLE	-
50.3	Metanol	11.0	0.5775
50.1	Metanol-agua (95:5)	9.0	0.6904
49.9	Metanol-agua (90:10)	3.5	1.7382
49.9	Metanol-agua (85:15)	2.5	2.3932
50.0	Etanol-agua (95:5)	INSOLUBLE	-
50.2	Etanol-agua (90:10)	42	0.1469
50.3	Etanol-agua (85:15)	17.0	0.3579

A* = valor de solubilidad dado en:

$$\frac{\text{g soluto}}{\text{100g disolvente}}$$

De la prueba para disolventes se decidió trabajar con solución salina 0.9%, para la extracción mecánica; ya que la solubilidad de las saponinas en ésta es adecuada y facilita la aplicación de dicho proceso, así como también mantiene la estabilidad de los glóbulos rojos sensibilizados que se utilizaron para detectar a las saponinas. En cuanto al método de extracción realizado con el aparato Goldfisch, el disolvente que se eligió fué metanol-agua al 85%; por ser el de mayor solubilidad con respecto al estandar de saponinas, aún más que el etanol; es más selectivo comparado con el agua ó la solución salina 0.9% y resulta adecuado por su volatilidad, para el uso en dicho extractor .

Ya seleccionados los disolventes de extracción, se procede a determinar el tiempo, relación muestra/disolvente y el proceso más adecuado para la extracción de las saponinas; en base a esto se seleccionaron dos muestras vegetales que contienen cada una diferente tipo de saponinas, triterpenoide (alfalfa) y esteroide (maguey); éstos factores se muestran en el siguiente cuadro :

FACTORES PARA DETERMINAR EL PROCESO DE EXTRACCION.

MUESTRA:	Alfalfa (triterpenoide)	Maguey (esteroidal)	
PROCESO:	agitación mecánica- extracción en Goldfisch		
TIEMPO: (horas)	1	2	4
RELACION MUESTRA (g/ml) DISOLVENTE	$\frac{2.5}{100}$	$\frac{5.0}{100}$	$\frac{7.5}{100}$

El total de experimentos a realizar para éstos factores es de 36.

De estas pruebas se obtienen, utilizando el método de detección hemolítico, los siguientes resultados:

METODO DE EXTRACCION CON AGITACION MECANICA.

MUESTRA	PESO (g)	TIEMPO(hrs)	TITULO DE HEMOLISIS
A	2.5	1	000000
L		2	000000
F		4	000000
A	5.0	1	111111
L		2	111111
F		4	111111
A	7.5	1	111111
		2	111111
		4	111111

METODO DE EXTRACCION CON AGITACION MECANICA.

MUESTRA	PESO (g)	TIEMPO(hrs)	TITULO DE HEMOLISIS
M	2.5	1	555555
A		2	555555
G		4	555555
U	5.0	1	666666
E		2	666666
Y		4	666666
	7.5	1	666666
		2	666666
		4	666666

METODO DE EXTRACCION EN EL APARATO GOLDFISCH.

MUESTRA	PESO (g)	TIEMPO(hrs)	TITULO DE HEMOLISIS
A	2.5	1	111111
L		2	111111
F		4	111111
A	5.0	1	111111
L		2	222222
F		4	222222
A	7.5	1	222222
		2	333333
		4	333333

METODO DE EXTRACCION EN EL APARATO GOLDFISCH.

MUESTRA	PESO (g)	TIEMPO(hrs)	TITULO DE HEMOLISIS
M	2.5	1	555555
A		2	666666
G		4	666666
U	5.0	1	666666
E		2	666666
Y		4	666666
	7.5	1	677777
		2	677777
		4	777777

De los resultados obtenidos durante las diferentes pruebas se realizaron estudios estadísticos para determinar el método de extracción, el peso y el tiempo más adecuados para el método general.

Las pruebas estadísticas son de varianza (prueba simple) y de rango múltiple.

Primero para determinar si hay o nó diferencia significativa entre métodos, se realizó la prueba de análisis simple con dos factores, estos son: los resultados del método de agitación mecánica contra los de extracción en Goldfisch; para las dos muestras vegetales: alfalfa y maguey.

Los resultados estadísticos son los siguientes:

ANALISIS DE RESULTADOS ESTADISTICOS PARA LA ALFALFA.

PRUEBAS ESTADISTICAS DE LA MUESTRA *	METALFALFA *	SALALFALFA *
No.de obs.	54	54
Promedio	1.77778	0.66666
Varianza	0.62893	0.22621
Desv.est.	0.79305	0.47583
Mediana	2	1

*Metalfalfa=datos del extracto metanólico de alfalfa por el proceso en Goldfisch.
*Salalfalfa=datos del extracto salino de alfalfa por simple agitación mecánica .
*Muestra define el proceso de extracción para la alfalfa

DIFERENCIA ENTRE MEDIAS: 1.11111

INTERVALO DE CONFIANZA: valor del 95% .

(VARIABLES IGUALES) MUESTRA 1-MUESTRA 2 0.8615/1.3606

(VARIABLES DIFERENTES) MUESTRA 1-MUESTRA 2 0.8608/1.3613

RADIO DE VARIANZAS: 2.7777

INTERVALO DE CONFIANZA DEL RADIO DE VARIANZAS: 0 % .

MUESTRA 1 ÷ MUESTRA 2

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA HO: DIFERENCIA= 0

VS. Alt: NO HAY DIFERENCIA, con alfa= 0.05

VALOR DE t= 8.8284, NIVEL DE SIGNIFICANCIA: 3.2862E-14

SE RECHAZA LA HIPOTESIS HO .˙. SI HAY DIF. SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MUESTRAS .

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANALISIS DE RESULTADOS ESTADISTICOS PARA EL MAGUEY

PRUEBAS ESTADISTICAS DE LA MUESTRA*	METMAGUEY *	SALMAGUEY *
No.de obs.	54	54
Promedio	6.18519	5.66667
Varianza	0.38015	0.22641
Desv.est.	0.61656	0.47583
Mediana	6	6

*Metmaguey=datos del extracto metanólico de maguey por el proceso en Goldfisch.

*Salmaguey=datos del extracto salino de maguey por simple agitación mecánica .

*Muestra define el proceso de extracción para el maguey.

DIFERENCIA ENTRE MEDIAS: 0.518519

INTERVALO DE CONFIANZA: valor del 95% .

(VARIABLES IGUALES) MUESTRA1-MUESTRA2 0.30834 - 0.72869

(VARIABLES DIFERENTES) MUESTRA1-MUESTRA2 0.30819 - 0.7288

RADIO DE VARIANZAS: 1.67901

INTERVALO DE CONFIANZA DEL RADIO DE VARIANZAS: 0% .

MUESTRA 1 ÷ MUESTRA 2

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA HO: DIFERENCIA= 0

VS. Alt: NO HAY DIFERENCIA, con alfa= 0.05

VALOR DE t= 4.8923, NIVEL DE SIGNIFICANCIA: 3.5722E-6

SE RECHAZA LA HIPOTESIS HO .∴ SI HAY DIF. SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MUESTRAS .

Las pruebas realizadas nos indican que la hipótesis HO, en la cuál se indica que no hay diferencia entre los procesos, y que por lo tanto son iguales; se rechaza, indicando que sí existe una diferencia significativa entre los procesos, siendo mejor el realizado en el extractor Goldfisch, ya que los promedios para los títulos de hemólisis detectados son mayores comparando con los del extracto salino para las dos muestras analizadas; alfalfa y maguey. Esto se ejemplifica en las figuras 14 y 15 .

Ya definido el proceso de extracción, se realizó un análisis de varianza y rango múltiple para el tiempo que se debe fijar y el peso más adecuado para la muestra. En estas pruebas se utilizó el mismo material vegetal (alfalfa y maguey) .

GRAFICA DE CAJAS MULTIPLE.
(MUESTRA DE ALFALFA)

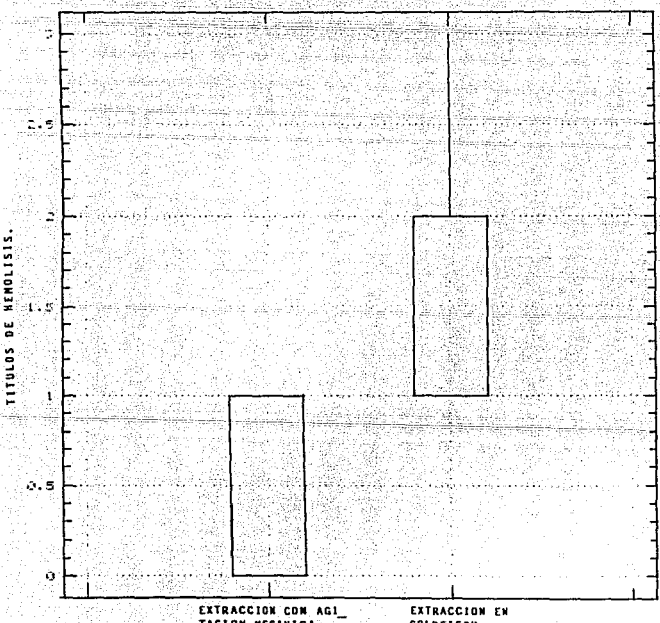


FIGURA 14

GRAFICA DE CAJAS MULTIPLES

(MUESTRA DE MAGUEY)

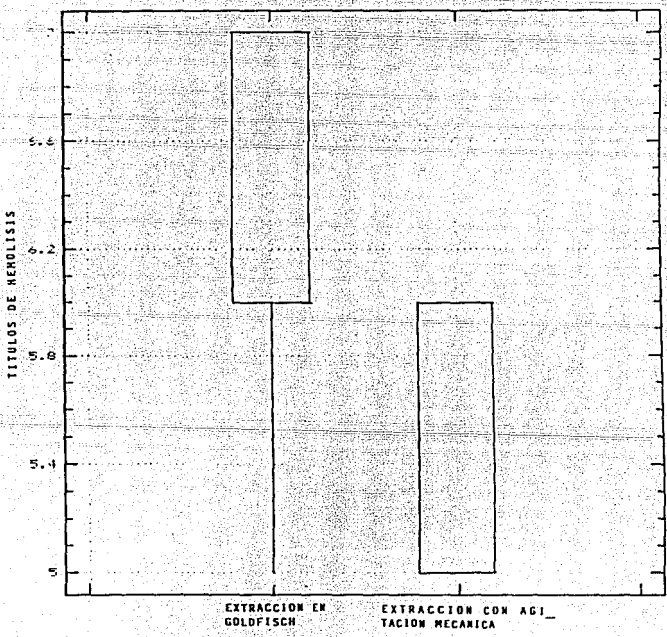


FIGURA 15

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS TITULOS DE HEMOLISIS.

(EXTRACCION EN EL APARATO GOLDFISCH PARA EL MAGUEY)

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	d.f.	MEDIA CUADRADA	VALOR DE F
METMAG.GR	14.3703	2	7.1851	194
METMAG.HO	1.5925	2	0.7962	21.5
INTERACCION DE METMAG HOR.Y GRA.	2.5185	4	0.62969	17.0
RESIDUO	1.6666	45	0.0370	-
TOTAL(CORR.)	20.148	53		

0 valores fueron omitidos

El nivel de significancia en todos los casos es de 0.

*METMAG.GRA.= cantidad de muestra en gramos, con la cual se realiza el extracto metanólico en el aparato Goldfisch para el maguey.

*METMAG.HOR.= tiempo en horas para la extracción metanólica realizada en el aparato Goldfisch, con maguey.

ANALISIS DE RANGO MULTIPLE CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE MUESTRA EN LA EXTRACCION PARA EL MAGUEY.
CON INTERVALO DEL 95% DE CONFIANZA.

NIVEL (gramos)	CUENTA	PROMEDIO	GRUPO HOMOGENEO
2.5	18	5.6666	*
5.0	18	6.0000	*
7.5	18	6.8888	*

ANALISIS DE RANGO MULTIPLE CON RESPECTO AL TIEMPO DE EXTRACCION PARA EL MAGUEY.
CON INTERVALO DEL 95% DE CONFIANZA.

NIVEL (horas)	CUENTA	PROMEDIO	GRUPO HOMOGENEO
1	18	5.9444	*
2	18	6.2777	*
4	18	6.3333	*

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS TITULOS DE HEMOLISIS.

(EXTRACCION EN EL APARATO GOLDFISCH PARA LA ALFALFA)

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	d.f.	MEDIA CUADRADA	VALOR DE F
METALF.GR	25.3333	2	12.6666	1000
METALF.HO	5.3333	2	2.6666	1000
INTERACCION DE MATALF HOR.Y GRA.	2.6666	4	0.6666	1000
RESIDUO	2.13E-29	45	4.735E-3	-
TOTAL(CORR.)	33.33	53		

0 valores fueron omitidos.

El nivel de significancia en todos los casos es de 0.

*METALF.GRA.= cantidad de muestra en gramos, con la cual se realiza el extracto metanólico en el aparato Goldfisch, para la alfalfa.

*METALF.HOR.= tiempo en horas para la extracción metanólica realizada en el aparato Goldfisch, con alfalfa.

ANALISIS DE RANGO MULTIPLE CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE MUESTRA EN LA EXTRACCION PARA LA ALFALFA.

CON INTERVALO DEL 95% DE CONFIANZA.

NIVEL (gramos)	CUENTA	PROMEDIO	GRUPO HOMOGENEO
2.5	18	1.0000	*
5.0	18	1.6666	*
7.5	18	2.6666	*

ANALISIS DE RANGO MULTIPLE CON RESPECTO AL TIEMPO DE EXTRACCION PARA LA ALFALFA.

CON INTERVALO DEL 95% DE CONFIANZA.

NIVEL (horas)	CUENTA	PROMEDIO	GRUPO HOMOGENEO
1	18	1.3333	*
2	18	2.0000	*
4	18	2.0000	*

En éstas pruebas estadísticas se observa que en cuanto al tiempo de extracción, dentro de la prueba de rango múltiple, el grupo homogéneo señala que para dos y cuatro horas, no hay diferencia significativa entre las mismas, pero sí con respecto a una hora, por lo que el tiempo de extracción más adecuado resultaría ser el de dos horas para el método aplicado en Goldfisch; ya que esto cumpliría con uno de los objetivos fijados para el método semicuantitativo, el cuál se refiere a que éste sea lo más rápido posible.

Esto se ejemplifica en la figura 16 y 17 .

En la prueba estadística para realizar una selección entre la relación muestra/disolvente, se observa una diferencia significativa entre 2.5, 5.0 y 7.5 gramos, en el grupo homogéneo para la prueba de rango múltiple, y resulta ser respectivamente mayor, lo que nos indica, que mientras más cantidad de muestra vegetal se utilice para la extracción, mayor será el título de hemólisis obtenido y por lo consiguiente el contenido de saponinas también. Esto se ejemplifica en la figura 18 y 19 .

INTERVALO PARA FACTORES DE MEDIAS
(MUESTRA DE ALFALFA)

95 % DE CONFIANZA

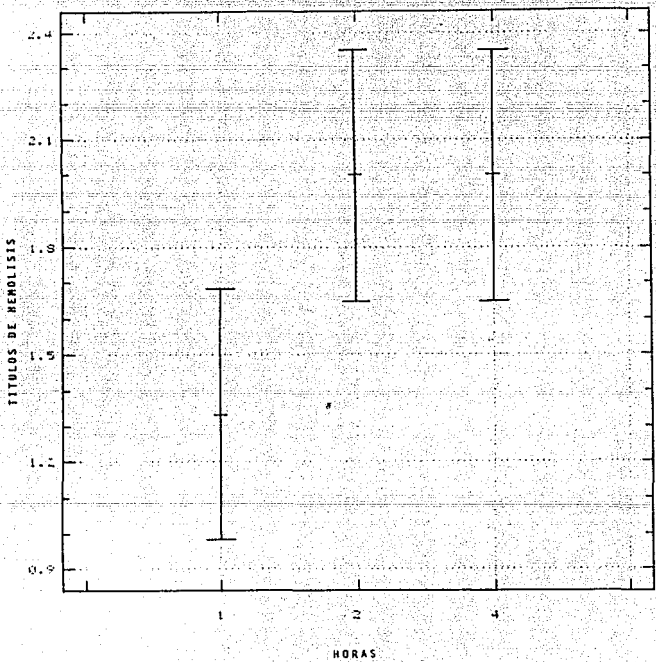


FIGURA 16

INTERVALO PARA FACTORES DE MEDIAS

(MUESTRA DE MAGUEY)

95 % DE CONFIANZA

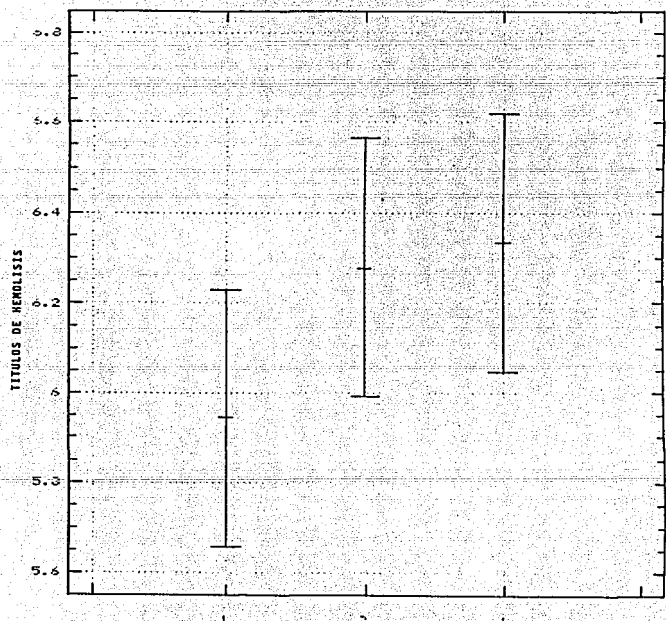


FIGURA 17

INTERVALO PARA FACTORES DE MEDIAS.

(MUESTRA DE ALFALFA)

95 % DE CONFIANZA

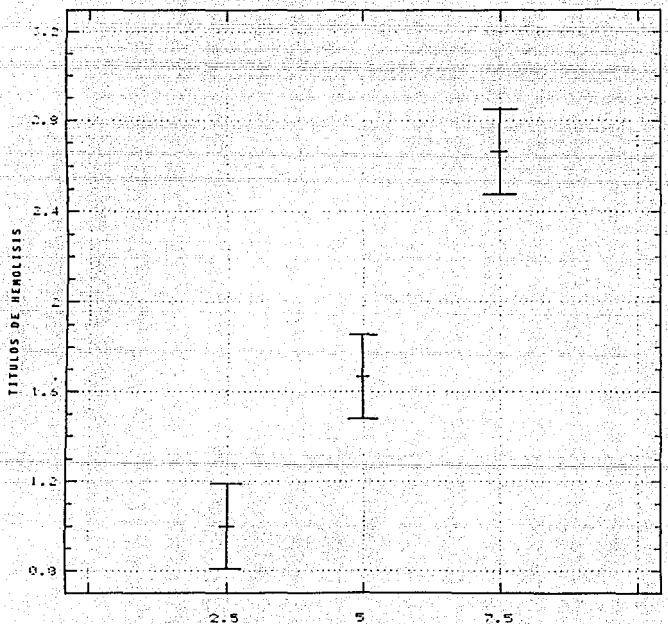


FIGURA 18

INTERVALO PARA FACTORES DE MEDIAS .

(MUESTRA DE MAGUEY)

95 % DE CONFIANZA

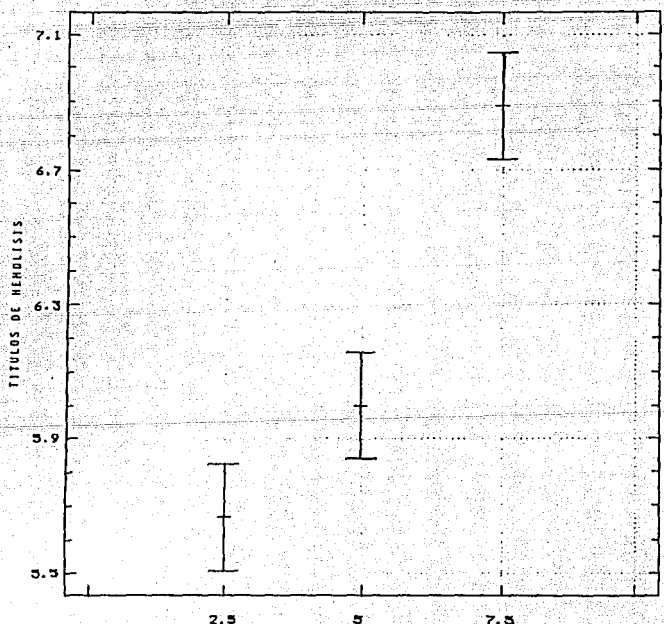


FIGURA 19

Ya realizados los experimentos y estudios estadísticos con respecto a la extracción de las saponinas, el método más adecuado resultó ser el siguiente:

Se desengrasó la muestra problema con éter de petroleo (en el extractor Goldfisch). De la muestra ya desengrasada se pesaron 7.5 gramos en el cartucho de celulosa, se colocaron en los portadedales y en el extractor Goldfisch. La extracción se realizó a la máxima temperatura del aparato por 2 horas, con metanol-agua (85:15) como solución extractora de las saponinas.

Una vez que se terminó el tiempo de extracción, el extracto se concentró a sequedad en el rotavapor, a una temperatura aproximada de 65°C: la muestra se redisolvió con solución salina 0.9%, se filtró con ayuda de vacío y se aforó a 100 ml con la misma solución.

Si no se realizara la determinación de inmediato, el extracto se debe refrigerar ó congelar para evitar contaminación.

Ya que se preparó el extracto de la muestra se procedió a la microtitulación, con los eritrocitos de conejo sensibilizados y preparados como se indica en la sección IV.1.7.3 de la tesis.

Toda la determinación semicuantitativa de saponinas se resume en el diagrama general que se presenta en la figura 20.

DIAGRAMA DEL METODO GENERAL SEMICUANTITATIVO SELECCIONADO

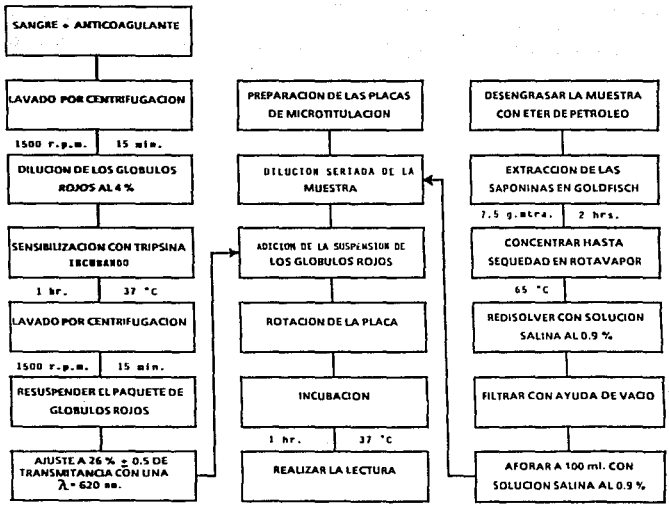


FIG. 20

IV.2.3) GRADO DE RECUPERACION DEL METODO SEMICUANTITATIVO.

Una vez establecido el método semicuantitativo que comprende la detección de las saponinas mediante la prueba de hemólisis y el proceso de extracción aplicado en el aparato Goldfisch, y como parámetros: 7.5 gramos del meterial vegetal y 2 horas de extracción con metanol-agua (85:15); se realizó un estudio del grado de recuperación del método general, en forma personal, aplicado en un material vegetal (cacahuanano) que no contenía saponinas, se adicionó una cantidad conocida del estándar (0.5 gramos) y se comparó con una solución del estándar de saponinas (triterpenoide y esteroide) al 0.5% en sol. salina (0.9%).

Los resultados de la prueba fueron los siguientes:

TITULOS DE HEMOLISIS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE RECUPERACION

EXPERIMEN_ TADOR	MUESTRA	TITULOS DE HEMOLISIS
1	CACAHUANANO	A)7,7,7,7,8,8 B)7,7,7,7,7,8
	ESTANDAR DE SAPONINAS	A)8,8,8,8,8,9

Con los títulos de hemólisis se realizó un estudio estadístico simple con los datos directamente en porcen_ tajes de recuperación.

Esto se muestra en la siguiente tabla:

RESULTADOS ESTADISTICOS PARA EL % DE RECUPERACION.

PRUEBAS ESTADISTICAS DE LA MUESTRA	VALORES OBTENIDOS POR EL EXPERIMENTADOR
No.de obs.	12
Promedio	88.84*
Varianza	30.69*
Desv.est.	5.54*
Mediana	85.78*

* Datos representados en %.

De las pruebas estadísticas se observó que el promedio del porcentaje de recuperación tiene un valor del 88.8% ± 5.5, el cual es aceptable para el método general semicuantitativo ya que el trabajar con material vegetal y la sangre no es fácil dado que depende de muchos factores externos.

IV.2.4) APLICACION DEL METODO SEMICUANTITATIVO EN MUESTRAS VEGETALES.

La última parte del trabajo es aplicar el método general semicuantitativo sobre varias muestras vegetales de interés.

Para esto las unidades asignadas en el método se definieron como unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H./mg M.), lo cual se explica de la siguiente forma:

La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroide (1:1) tiene una concentración de 0.5% en la solución estándar; si en la microtitulación se toman 0.05 ml se tiene entonces una concentración de 0.25 mg de saponina en dicho volumen.

En una dilución seriada se tiene la fórmula:

$$\frac{\text{concentración del extracto}}{2^{t}}$$

t= título de hemólisis

Si la solución estándar de saponinas tiene un valor promedio de 8 para el título de hemólisis, entonces en este pozo se tiene la siguiente concentración:

$$\frac{0.25\ \text{mg}}{2^{8}} = 0.001\ \text{mg} = 1\ \mu\text{g}$$

Por definición 1 microgramo del estándar de saponinas es equivalente a 10 Unidades Hemolíticas (U.H.) .

El cálculo para las muestras vegetales sería así:

La concentración del extracto vegetal para todos los casos es de 75 mg/ml, en 0.05 ml tendríamos 3.75 mg; para un título de hemólisis con valor de 1 se tendría la siguiente concentración:

$$\frac{3.75}{2^{1}} = 1.870 \text{ mg de muestra}$$

Y por definición se obtendrían las unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H./mg M.) .

$$\frac{10 \text{ U.H.}}{1.87 \text{ mg M.}} = \underline{5.3 \text{ U.H./mg M.}}$$

RESULTADOS DE LA DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE SAPONINAS EN MUESTRAS VEGETALES.

MUESTRA	TITULOS DE HEMOLISIS	TITULO REAL PROMEDIO	U.H./mg M.
Haba	A)4,4,4,4,5 B)4,4,4,4,4	4.0	42.7
Soya	A)2,2,2,2,2,3 B)3,3,3,3,3,3	3.0	21.3
Alfalfa	A)2,3,3,3,3,3 B)2,3,3,3,3,3	3.0	21.3
Chícharo	A)2,2,2,2,2,2 B)2,2,2,2,2,2	2.0	10.6
Avena	A)0,1,1,1,1,1 B)1,1,1,1,1,1	1.0	5.3
Nescafé	A)0,0,0,0,0,0	*aglutinación	
Parota	A)1,1,1,1,1,1	1.0	5.3
Maguacata	A)2,2,2,2,2,2	2.0	10.6
Tepehuaje	A)0,0,0,0,0,0	*aglutinación	
GÜinole	A)0,0,0,0,0,0	*aglutinación	
Jinicuil	A)8,8,8,8,8,8	8.0	684.9
Barbasco	A)2,2,2,2,2,3	2.0	10.6
F.Colorado de Suelo	A)2,2,2,2,2,2	2.0	10.6
F.Colorado de Vega	A)1,1,1,1,1,1	1.0	5.3
Palo Fierro	A)1,1,1,1,1,1	1.0	5.3
Est.Saponina	A)8,8,8,8,8,	8.0	684.9

De las muestras vegetales se observó que el nescafé, tepehuaje y güinole no presentaron hemólisis y por lo contrario, se presentó aglutinación lo cual nos puede indicar que no están presentes las saponinas pero sí otro tipo de tóxicos como podrían ser las hemaglutininas.

El palo fierro, avena, parota y frijol colorado de vega presentaron los títulos de hemólisis más bajos lo que nos dá una idea de que tienen poca cantidad de saponinas, por lo contrario el jinicuil tiene una concentración muy alta y podría ser una muestra interesante para estudiarla más a fondo, con pruebas ya de tipo cuantitativo y definir también la estructura de las saponinas presentes, las demás muestras están en un punto intermedio en cuanto al contenido de saponinas.

De las muestras analizadas, en todas menos en nescafé, tepehuaje y güinole, que no presentan hemólisis, hay espuma persistente, lo que es una prueba que corrobora la presencia de las saponinas.

En general como el método de detección para saponinas realizado es nuevo, no se puede comparar con la concentración que tienen las muestras conocidas como: haba, soya, alfalfa, chícharo y avena en la bibliografía, ya que han sido detectadas mediante otros métodos como infrarrojo ó cromatografía; sin embargo como se realizó una comparación

con el estándar que contiene los dos tipos de saponinas (triterpenoide y esteroide) y cuyo título de hemólisis promedio resulta tener un valor de 8, se hace una comparación en cuanto a la cantidad de saponinas presentes, siendo baja ó alta según el título de hemólisis que presente.

V.- CONCLUSIONES.

1) Se eligió la prueba de hemólisis para la detección de saponinas porque cumple con la mayoría de los objetivos fijados: ser sensible general, sencilla y rápida, siendo un método por lo menos de tipo semicuantitativo.
2) Para la prueba de hemólisis se eligieron los eritrocitos de conejo por tener una sensibilidad alta, ser de fácil manejo y obtención.
3) Se corroboró que el uso de tripsina como sensibilizador de los eritrocitos, es el más adecuado para visualizar perfectamente los títulos de hemólisis.
4) Se comprobó que el método de extracción en el aparato Goldfisch es el más adecuado para las saponinas, así como la solución extractora la cual fué metanol-agua (85:15).
5) El tiempo y cantidad más adecuados para una óptima extracción de las saponinas fueron: 2 horas y 7.5 gramos.
6) El grado de recuperación en la determinación semicuantitativa para saponinas fué de 88.8% $\pm$ 5.5 .
7) Se asignaron las unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H./mg M.) para la determinación semicuantitativa de saponinas.

VI.- B I B L I O G R A F I A .

1) Lindner,E., "Toxicología de los alimentos". Ed. Acribia, España (1978), pág. 10-12.

2) Bazu,N. and Rastogi,R.P., Triterpenoids saponins and sapogenins. Phytochemistry 6, 1249-1270 (1967).

3) Sotheeswaran,S., Screening for saponins using the blood hemolysis test. J. Chem. Educ. 65, 161-162 (1988).

4) Fenwick,D.E. and Oakenfull,D., Saponin content of plants and some prepared foods. J. Sci. Food Agric. 34, 186-191 (1983).

5) Harborne,J.B., "Phytochemical Methods". Ed. Chapman and Hall, London (1973), pp. 116-117.

6) Wattiez,N.F., "Elements de Chimie vegetale". Ed. Masson y Cie. Paris (1942), pp. 431-438.

7) Coppola,P., Estudio de la saponina del maguey. Tesis. Facultad de Química y Farm. U.N. de Méx. (1928), pág. 5-7.

8) Muñoz,R.M., Determinación de saponinas y taninos y acción anti-biótica en algunas plantas silvestres mexicanas. Tesis. Facultad de Química, U.N.A.M., (1979), pág. 4-11.

9) Dominguez,X.A., "Metodos de investigación fitoquímica". Ed. Limusa, México (1973), pág. 149-159.

10) Kitagawa,I., Yoshikawa,M. and Yosioka,I., Saponin and sapogenol. XIII. Structures of tree soybean saponins. Soyasaponin II and soyasaponin III., Chem.Pharm.Bull. 24, 121-129 (1976).

11) Walter,E.D., Bickorff,E.M., Thompson,C.R., Robinson,C.H. and Djerassi,C., Saponin from ladino clover (Trifolium repens). J. Am. Chem. Soc. 77, 4936-4937 (1955).

12) Wagner,J. and Sternkop,G., Chemical and physiological studies of saponins of sugar beets. Nahrung 2, 338-357 (1958).

13) Tshesche,V.R. and Wullff,G., Triterpenes XXVII: Saponins of spinach (Spinacea oleracea). Justus Liebigs. Ann. Chem. 726, 125-135 (1969).

14) Kawano,K., Hiroji,S. and 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).

15) Huntress,E.H. and Mulliken,S., "Identification of pure organic compound" Ed. John Wiley and Sons Inc., Nueva York (1941) pp. 5975-5980.

16) Birk.Y., Bondi,A., Gestetner,B. and Ishaaya,I. A thermostable hemolytic factor in soybeans. Nature 16, 1089-1090 (1963).

17) Liener,I.E., "Toxic constituents of plant foodstuffs". Academic Press, Inc. U.S.A (1980), pp. 161-181.

18) Gestetner,B., Assa,Y., Henis,Y., Tencer,Y., Rotman,M., Birk,Y. and Bondi,A., Interaction of lucerne saponins with sterols. Biochim. Biophys. Acta 270, 181-187 (1972).

19) Liener,I.E., "Toxic constituents of plant foodstuffs". Ed. Academic Press, Nueva York, (1969), pp.169-210.

20) Applebaum,S.W., Marco,S. and Birk,Y., Saponins as possible factors of resistance of legumer seeds to the attack of insects. J. Agric. Food Chem. 17(3), 618-622 (1969).

21) Applebaum,S.W. and Birk,Y. In "Insect and Mite Nutrition". Ed. North-Holland Publ., Amsterdam (1972), pp. 629-636.

22) Hegsted,M. and Linkswiley,H.M., Protein quality of high and low saponin alfalfa protein concentrate. J. Sci. Food Agric. 31, 777-781 (1980).

23) Ishaaya,I., Birk,Y., Bondi,A. and Tencer,Y., Soyabean saponins IX, Studies of their effect on birds, mammals and cold-blooded organisms. J. Sci. Food Agric. 20, 433-436 (1969).

24) Cheek,P.R., Nutritional and physiological implications of saponins: A review. Can. J. Anim. Sci. 51, 621-632 (1971).

25) Merk,R. "The Merck Index" 9th. edt. (1976), pp. 8120.

26) Muzquiz,M., Burbano,C., Gorospe,M.J. and Rodenas,I., A chemical study of Lupinus hispanicus. Seed-toxic and antinutritional components. J. Sci. Food Agric. 47, 205-213 (1989).

27) George,A.J., Legal status and toxicity of saponins. Food Cosmet. Toxicol. 38, 85-91 (1965).

28) Nord,E.C. and Van Atta,G.R., Saponin- A seed germination inhibitor Forest Sci. 6, 350-353 (1960).

29) Pedersen,M.N., Zimmer,D.E. and McAlister,D.R., Comparative studies of saponins of several alfalfa varieties using chemical and biochemical assays. Crop. Sci. 7, 349-352 (1967).

30) Shany,B., Birk,Y., Gestetner,G. and Bondi,A., Preparation, characterization and some properties of saponin from Lucerne tops and roots. J. Sci. Food. Agric. 21, 131-135 (1970).

31) Ishaaya,I. and Birk,Y., Soybean saponins IV. The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzimes. J. Food Sci. 30, 118-120 (1965).

32) Carroll,K.K., The role of dietary protein in hypercholesterolemia and artherosclerosis. Lipids 13, 360-365 (1977).

33) Clavert,M.A., Dinole,J.T. and Lucy,J.A., Action of saponins on biological cell membranes. Nature 196, 952-955 (1962).

34) Kaplan,L.A. and Pesce,A.J., "Química Clínica". Ed. Médica Panamericana. Argentina (1988), pág. 721-769.

35) Schlösser,E., Interaction of saponins with cholesterol, lecithin and albumin. Can Jour. Physiol. and Pharmacol. 47, 487-489 (1969).

36) Schmidt-Thome,J. and Prediger,F., Hemolysis with saponins. Z. Physiol. Chem. 286, 127-138 (1950).

37) Gestetner,B., Shany,S., and Assa,Y., Medicagenic acid, the factor responsible for hemolytic activity of lucerne saponins. Experientia 27(1), 40-41 (1971).

38) Gestetner,B., Assa,Y., Henis,Y. and Bondi,A., Lucerne saponins IV. Relation ship between their chemical constitution and hemolytic and antifungal activities. J. Sci. Food Agric. 22, 168-172 (1971).

39) Furniss,B.S., Hannaford,A.J., Smith,P.W.G. and Tatchell,A.R., "Vogel's textbook of practical organic chemistry". Ed. Longman Scientific & Fechnical. U.S.A. (1989), pp. 195-206.

40) Fenwick,D.E. and Oakenfull,D., Saponin content of soya beans and some commercial soyabean products. J. Sci. Food Agric. 32, 273-278 (1981).

41) Wagner,H., Bladt,S. and Zgainski,E.M., "Plant Drug Analysis" (a thin layer chromatography atlas). Ed. Spring-Verlag. Berlin, N.Y (1984), pp. 225-233.

42) Oakenfull,D., Saponins in food- A review. Food Chem. 6, 19-40 (1981).

43) Fessenden,R.J. and Fessenden,J.S., "Techniques and experiments for Organic Chemistry". Ed. Willard Grandt Press. Boston (1983), pp. 108-115.

44) Adamson,A.W., "Physical Chemistry of surfaces". Ed John Wiley & Sons, U.S.A. (1982), pp.478-433.

45) Castellans,G.W., "Physical Chemistry". Ed Addison-Wesley Publ. Comp., U.S.A. (1973), pp.424-430.

46) Kopsic,T. y Lauric,V., Saponinas de soja. Métodos para su determinación. Alimentación Moderna 3, 26-30 (1974).

47) Baccou,J.C., Lambert,F. and Sauvaire,Y., Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. Analyst 102, 458-465 (1977).

48) Cook,R.P., Reactions of the steroids with acetic anhydride and sulfuric acid (the Liebermann-Burchard test). Analyst 86, 373-380 (1961).

49) Uribe,L.A., "Métodos usados para la determinación de saponinas" Trabajo monográfico. Facultad de Química, U.N.A.M. (1987), pág. 33-36.

50) Bazu,N. and Rastogi,R.P., Triterpenoid saponins and sapogenins. Phytochemistry 6, 1249-1270 (1967).

51) Statistical Graphics Corporation., "Manual Statgraphics", ver. 2.6 Ed. East Jefferson Street. U.S.A. (1987), pp. 11-1/14-19.

52) Daniel,W., "Bioestadística" (base para el análisis de las ciencias de la salud). Ed. Limusa, México (1979), pág. 193-230.

53) Jaffé, W.G., Leney,A. and González,D.I., Isolation and partial characterization of beans phytohemagglutinins. Phytochemistry 13, 2685-2693 (1974).

54) Conrath,T.B., "Microtiter Procedure". Ed. Dynatech Corporation. U.S.A. (1972), pp.1-29.