

Quiero dejar constancia de mi gratitud a todos los que han sido mis profesores durante la carrera universitaria.

Hago extensivo este agradecimiento a aquellas personas, que en forma desinteresada, me han prestado su valiosa ayuda en la realización del presente trabajo.

T E S I S D E G R A D O

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LAS SAPONINAS Y SAPOTOXINAS
PRESENTES EN ALGUNAS PLANTAS DE
NUESTRA FLORA

Yolanda Méndez Arrieta.

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

- 1958 -

T E M A R I O

- 1.) Introducción.
- 2.) Generalidades sobre saponinas y sapotoxinas.
- 3.) Clasificación botánica y descripción de las especies estudiadas.
- 4.) Trabajo Experimental.
 - a) Métodos Ensayados para la Extracción y purificación de Saponinas.
 - b) Pruebas de Identificación.
 - c) Clasificación en Saponinas y Sapotoxinas.
 - d) Posibilidad de un Método Cuantitativo.
- 5.) Resultados Obtenidos.
 - a) Pruebas Cualitativas.
 - b) Cuadro de Hemólisis.
- 6.) Discusión y Conclusiones.
- 7.) Bibliografía.

C A P I T U L O P R I M E R O

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

Sabiendo que son las saponinas un grupo de sustancias tóxicas muy repartidas en la naturaleza, y de cuya identidad y métodos de investigación se conoce relativamente poco, he creído ver en él un campo de investigación muy amplio, del que pueden sacarse conocimientos útiles tanto a la química, como la bromatología y a la toxicología.

Debo advertir, que ante la ausencia de un método práctico y satisfactorio para la investigación cuantitativa de saponinas, el presente trabajo está hecho únicamente en forma cualitativa, aunque en él se deja expuesto, como producto de las observaciones personales basadas en las experiencias realizadas, un método para valoración cuantitativa.

Recordemos además que en los últimos años, las saponinas esteroideas han tomado gran prominencia industrial, utilizándoseles como materia prima para la elaboración de aquellas hormonas, cuyo núcleo fundamental es el ciclopentano-perhidro-fenantreno.

Este éxito industrial, podemos decirlo sin lugar a dudas, ha venido a constituir uno más, de los brillantes éxitos alcanzados por la industria sintética moderna.

C A P I T U L O S E G U N D O

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

Las saponinas son un grupo de glicósidos no nitrogenados muy repartidos en la naturaleza.

Casi todas son amorfas, pero unas pocas como digitoxina, gitoxina, zarsaponina, se obtienen en forma cristalina. (8).

Aunque en general son incoloras, con frecuencia los extractos que las contienen son coloreados, debido a que atraen y retienen fuertemente materias colorantes. Lo mismo hacen con el ion sulfuro y el CO₂. (7)

Son muy higroscópicas. Producen soluciones coloidales con el agua; éstas se caracterizan por formar espuma persistente al ser agitadas. (5). Son agentes humectantes, emulsionan aceites fijos y materias resinosas. (1).

Insolubles en alcohol etílico absoluto, aumentando la solubilidad a medida que éste se hidrata, sobre todo si se eleva la temperatura. La solubilidad es mayor en alcohol metílico que etílico. Son insolubles en éter, cloroformo, éter de petróleo y benceno. (7)

Por hidrólisis con un ácido mineral, las saponinas se desdoblán en un azúcar (glucosa, galactosa y xilosa, principalmente), y una sustancia de naturaleza distinta, denominada aglicona o sapogenina cuyo carácter sirve para cla-

sificarlas. Así, atendiendo a las propiedades de dicha porción de la molécula, podemos dividir las en dos grandes grupos: saponinas esteroideas y saponinas triterpenoides; (5).

Las primeras son aquellas, cuyas sapogeninas, producen el hidrocarburo de Diels al ser destiladas con selenio. También se les llama neutras por presentar ese carácter químico.

Las segundas son las que por un tratamiento similar, producen el sapotaleno (1-2-7-trimetil-naftaleno). Estas forman el grupo de las saponinas ácidas: generalmente contienen un grupo carboxilo en su molécula. (5)

El primero de estos grupos ha adquirido gran importancia en la industria moderna, debido a que algunos de sus miembros se han utilizado como materia prima en la obtención sintética de hormonas esteroideas. (8)

En forma de polvo son irritantes para las mucosas y producen estornudos y mucosidad. Si se inyectan directamente en la circulación, algunas producen hemólisis (sapotoxinas). En general provocan rápida hipotensión, con extrema dilatación cardíaca (casi todas las saponinas son tóxicas para el corazón de la rana), además diuresis y acciones directas sobre el sistema nervioso central: convulsiones, parálisis, especialmente del centro respiratorio. El efecto en los peces también es paralítico y se manifiesta aun a pequeñas dosis dada la rápida absorción por las agallas;

por esta razón algunas de ellas han sido usadas por los pe
cadores como barbasco. (4)

La toxicidad es proporcional, aunque no siempre a la
acción hemolítica. (4)

El colesterol previene la hemólisis causada por las sa
potoxinas, pues se combina con ellas formando sustancias in
solubles, no tóxicas, llamadas colestéridos, pero su acción
protectora no se extiende a las acciones centrales de las
saponinas. (4) Las sapotoxinas combinadas con la lecitina
no pierden su toxicidad. (3)

Para los animales superiores las saponinas no son tan
tóxicas por vía digestiva, lo que se explica en parte por
su acción nauseante, pues si se ingieren en cantidades gran
des provocan la emesis, pero también porque la hidrólisis
ácida que sufren en el estómago, las priva de su poder hemo
lítico y porque el intestino generalmente las absorbe muy
poco; de ahí, que los síntomas más comunes sean gastroente-
ritis, vómitos, diarrea persistente, etc. Sin embargo, la
acción local violenta puede producir corrosión, y ósto au-
menta el poder absorbente de la mucosa, como sucede con la
quilaya.

La saponina del grano de cizaña común se absorbe muy
fácilmente y por eso es capaz de producir intoxicación gene
ral. Esto es importante pues su semilla puede mezclarse
con el trigo. Los síntomas generales concuerdan con los de
la inyección intravenosa. (4)

El hígado parece tener alguna acción desintoxicante para las saponinas, pues hay evidencia de que la hidrólisis se produce en él. En animales de experimentación se han encontrado sapogeninas en las heces y saponinas no cambiadas en la orina. (2)

También se ha logrado producir anemia en ratas, administrándoles por vía intravenosa, "Saponina purísima" de Merck, la cual es extraída de la Quillaja saponaria. (4)

Se les ha usado extensamente para el lavado de tejidos delicados; como agentes espumantes en refrescos, uso que está prohibido en la actualidad; además en extinguidores de fuego, en preparaciones cosméticas y manufacturas cerámicas.

C A P I T U L O T E R C E R O

CLASIFICACION BOTANICA Y DESCRIPCION

DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

JABONCILLO.

Sapindus saponaria. Familia Sapindaceae.

Arbol de mediano porte. Sus hojas son pinnadas, alter_{nas} y compuestas, sin estípulas.

Frutos no dehiscentes, con dos lóbulos: uno muy pequ_{ño} derivado de una celda abortiva.

Flores pequeñas y regulares. Estambres insertos en un disco.

El fruto es una baya globosa, hasta de tres cuartos de pulgada de diámetro, con carnosidad coriácea, de color amarillo naranja. Las semillas son esféricas y cubiertas por un tegumento coreáceo negro.

Es un árbol común en las Antillas, Centro y Sur América.

MAME.

Dioscorea alata. Familia Dioscoreaceae.

Este es el Mame blanco, el más común de los mameg en Costa Rica.

Trepadora herbácea. Tallo alado con cuatro alas. Raíz tuberosa. El fruto es una cápsula coriácea elíptica con tres alas.

Tiene hojas largamente pecioladas. Flores pequeñas y dioicas en panojas axilares las masculinas y en espigas las femeninas.

Se cultiva en Costa Rica, pero es planta de origen asiático posiblemente.

TIQUISQUE.

Xanthosoma violaceum. Familia Araceae.

Planta herbácea, con tallo subterráneo. Hojas de largo pecíolo con tinte purpúreo. Lámina sagitada y entera. Inflorescencia con espata persistente alrededor del espádice.

Tiene raíces gruesas comestibles cuando se cocinan.

Se cultiva en las Antillas, Centro y Sur América.

PATA.

Xanthosoma roseum. Familia Araceae.

Planta de hojas ovadosagitadas que alcanzan gran tamaño, hasta de 1.5 mts. de longitud.

Tallo generalmente tendido sobre los bordes de las coquecillas de agua donde crecen, llega a tener a veces más de tres metros de longitud y hasta 20 cms. de diámetro. Tiene espata grande, blanca o rosada.

Crece en Centro América y México.

REMOLACHA.

Beta vulgaris. Familia Chenopodiaceae.

Hierba bianual, rara vez anual. De raíz engrosada, de

formas, tamaños y colores diferentes. Raíces y hojas comestibles. Flores numerosas en panoja abierta.

Existen variedades usadas como legumbres, otras para extracción de azúcar.

Una variedad, la var. cicla, no engruesa la raíz, pero las hojas son muy desarrolladas.

Existen razas con hojas coloreadas, y se usan como plantas de ornato.

ESCOBILLA BLANCA - (Escoba amarga o Mastuerzo)

Scoparia dulcis. Familia Scrophulariaceae.

Hierba abundante en diferentes partes del país. Tiene aproximadamente un metro de altura; lampiña.

Hojas pequeñas, dentadas, ovadas o lanceoladas, sin estipulas. Flores perfectas, muy pequeñas, blancas, pediciladas. El fruto es una cápsula dehiscente, con numerosas semillas.

GUINIA.

Zizyphus mauritiana. Familia Rhamnaceae.

Árbol generalmente pequeño, pero algunas veces logra alcanzar hasta 15 metros de altura. Ramas armadas con espinas cortas y fuertes; las jóvenes densamente tomentosas.

Hojas pecioladas, verdes y lisas por la cara superior, mientras la inferior está cubierta por densa pubescencia rumbrosa.

Flores con peciolo corto, que pueden ser umbelas axilares o cimos. Fruto subgloboso de 12 a 20 mm. de diámetro

de color anaranjado rojizo cuando está maduro. Este es co
mestible, y usado en algunos lugares en mermeladas y medi-
cinas.

Se cultiva en Costa Rica en la región del Pacífico.

C A P I T U L O C U A R T O

TRABAJO EXPERIMENTAL

Partes utilizadas de las especies estudiadas.

Del Jaboncillo	:	Frutos
Del Ñame	:	Raíces
Del Tiquisque	:	Raíces
De la Pata	:	Hojas
De la Remolacha	:	Raíces
De la Escobilla Blanca:		Tallos
De la Guinda	:	Frutos
De las Cabuyas	:	Hojas
De la Pacaya	:	Frutos

Métodos ensayados para la Extracción y Purificación de saponinas.

a) - Extracción con agua y purificación del extracto acuoso.

La extracción de las saponinas presentes en las plantas se realiza utilizando agua como disolvente. A partir de este extracto acuoso, puede efectuarse la purificación siguiendo dos métodos distintos:

- 1) - Por purificación directa del extracto (decoloración etc.)
- 2) - Separando por precipitación la saponina disuelta.

La forma más sencilla de decolorar la solución que con

tiene la saponina, es agitándola con carbón, pero en ocasiones tal tratamiento no es suficiente para la purificación total, como sucede cuando hay mucílago presente.

En cuando a la precipitación de la saponina, puede llevarse a cabo por los métodos que se exponen a continuación: (7).-

1) - Método del Plomo.

En este método se utiliza el acetato y el subacetato de plomo, a continuación uno del otro, para precipitar las saponinas ácidas y neutras respectivamente. El precipitado se separa y se descompone por adición de ácido sulfúrico diluido en exceso. Se elimina el plomo que haya podido quedar mediante H_2S . Filtrese y evapórese la solución hasta consistencia de extracto. Si el residuo estuviese demasiado coloreado, se agita con alcohol o con mezcla de cuatro partes de cloroformo y una parte de alcohol absoluto. De la solución acuosa concentrada, puede precipitarse la saponina mediante éter o alcohol etílico.

2) - Método de la Barita.

El líquido que constituye el extracto acuoso, se trata con solución saturada caliente de hidróxido de bario. El precipitado obtenido se descompone por CO_2 o el H_2S , y se continúa como el caso anterior.

3) - Método del Hidróxido de Plomo.

Puede utilizarse en la purificación de saponinas neutras, haciendo actuar sobre sus soluciones, solución alcohólica hirviente de $Pb(OH)_2$.

4) - Método de la magnesia.

Mézclese el extracto acuoso con magnesia calcinada y evapórese hasta sequedad. Pulverícese finalmente el residuo, hiérvase con alcohol metílico o etílico de graduación apropiada (60° - 70°),, y filtrese. Del líquido filtrado puede precipitarse la saponina por enfriamiento o mediante éter.

5) - Método del sulfato de Amonio.

El sulfato de amonio usado en soluciones saturadas precipita las saponinas de sus soluciones acuosas muy concen-[']tradas, particularmente las saponinas ácidas.

6) - Investigación Micrográfica.

Tómense cortes de las plantas de tamaño conveniente y sumérjense en solución concentrada de hidróxido de bario por 24 horas. Luego sepárense y lávense con agua de cal, que elimina el exceso de $Ba(OH)_2$ sin disolver la saponina bárica. Por último sométanse a la acción de una solución al 10% de bicromato de potasio. En las células que contengan saponinas, se formará precipitado amarillo de $BaCrO_4$.

Lógicamente este método sólo será aplicable, a aquellas saponinas que precipitan con el agua de barita.

b) - Método del Alcohol Etílico.

Divídase la muestra vegetal en pedazos pequeños y sométase a la acción del alcohol de 95° en frío; remuévase éste a intervalos convenientes por espacio de 24 a 48 horas, o hasta que el alcohol de los lavados sea incoloro.

Extráigase la saponina contenida en la muestra Median

te alcohol hirviente de 60° hasta agotarla. Concén-
trese hasta un volúmen adecuado, para eliminar el alco-
hol presente en la solución.

Las saponinas, como glicósidos que son, se hidro-
lizan en medio acuoso por acción de las enzimas presen-
tes normalmente en las plantas (glicosidasas. (10)
Esta hidrólisis trae como consecuencia la pérdida del
poder hemolítico en aquellos miembros que la poseen,
(9) haciéndose necesaria la inactivación de las enzi-
mas hidrolíticas, para poder mantener inalteradas las
saponinas en solución acuosa. Tal efecto se logra me-
diante la ebullición con alcohol, (10) lo que constitu-
ye una ventaja adicional del método del alcohol etíli-
co.

Después de ensayar todos los métodos expuestos
para la extracción de saponinas de las plantas, excep-
to el micrográfico, se llegó a la conclusión de que el
método del alcohol etílico es el más satisfactorio.
Este fue exclusivamente, el que se siguió en la extrac-
ción de las saponinas estudiadas en el presente traba-
jo.

b) - Pruebas de identificación.

Los ensayos utilizados para poner de manifiesto la presencia de saponinas, se basan particularmente en el poder de reducción de las mismas. A continuación se citarán algunas de estas pruebas, todas las cuales han sido ensayadas en la realización del presente trabajo.

Reactivo de Nessler.

Al agregar reactivo de Nessler frío a una solución hirviente de saponina, se aprecia primero la aparición de coloración amarilla, luego formación de precipitado naranja que pasa a verde y por último a gris, después de pocas horas. Si se usa reactivo de Nessler caliente, la aparición del precipitado gris es inmediata. (1)

Permanganato de potasio.

La solución acuosa de permanganato de potasio es decolorada por las saponinas, con aparición simultánea de precipitado pardo. (7)

Bicloruro de Mercurio.

Si se hierve la solución de saponina con $Hg Cl_2$, aparece precipitado blanco que cambia a gris. (1)

Reactivo de Fehling.

La solución de Fehling es precipitada en frío o en caliente por las saponinas, quedando en ambos casos sedimento rojizo. (7)

Ferricianuro de Potasio. (1)

Las saponinas precipitan azul de Prusia, al ponerse las en presencia de un reactivo formado de solución de ferricianuro de potasio y unas gotas de cloruro férrico.

Agua.

Al agitar una solución acuosa de saponina, se produce espuma persistente. (8)

Acido Sulfúrico.

Con el ácido sulfúrico, las saponinas dan color rojo.
(7) -

Reactivo de Fröde. (2)

En frío o hirviendo, las soluciones que contienen saponinas se tornan azules en presencia de este reactivo.

Calor.

Las saponinas al quemarse, dan olor a caramelo.

c) - Clasificación en saponinas y sapotoxinas:

La división que se hace del grupo de los saponósidos, en saponinas y sapotoxinas, se basa exclusivamente en la capacidad que tienen algunos de sus miembros de lizar los glóbulos rojos. (2)

El primero de estos grupos es inactivo en presencia de eritrocitos, mientras que el segundo produce la hemólisis de los mismos.

Para la realización del ensayo, se separan los flóbulos rojos de una porción de sangre desfibrinada, y se lavan repetidamente con solución salina normal, para privarlos totalmente del suero sanguíneo, pues la presencia del mismo interfiere en reacción. (3) Por último, se dejan suspendidos en solución salina. Esta suspensión debe ser preparada en el momento de la experiencia.

La solución que contiene la saponina debe hacerse también isotónica, y su pH debe regularse hasta que sea aproximadamente 7. (3)

La velocidad de la hemólisis es directamente proporcional a la concentración de la sapotoxina, si la de glóbulos rojos se mantiene constante. Sin embargo, esta prueba no nos puede dar un dato definitivo acerca de la concentración de sapotoxina, a menos que pudiera trabajarse con soluciones estandarizadas y condiciones especiales de labora

torio para controlar temperatura, pH, etc. Por otra parte, la actividad de la saponina es distinta en cada uno de los casos.

Método:

Se toma una pequeña porción de cada uno de los extractos a ensayar se les adiciona unas gotas de la suspensión de glóbulos rojos recientemente preparada. Se deja reposar por espacio de 48 horas, haciendo varias lecturas durante la primera hora, y luego a las 12 - 24 - 36 y 48 horas. Los tubos deben agitarse cada seis o doce horas, pero sin brusquedad, haciéndolos rotar suavemente en una sola dirección.

Para asegurarse que la destrucción de los glóbulos es producida por la saponina, se repite el ensayo con cada una de las muestras que presentaron hemólisis, adicionando previamente colesterol. Si la lisis no se presenta ahora, se trata efectivamente de una saponina, que al fijarse al colesterol agregado, ha quedado inactiva. Pero en caso de presentarse, se deberá a otra sustancia distinta y habrá necesidad de investigar su identidad y la manera de eliminarla, para poder clasificar con corrección el saponósido, como saponina o como saponina. (2)

El tiempo requerido para que aparezca la hemólisis es un factor que debe tomarse, pues no es igual para todas las saponinas. Este puede oscilar entre pocos minutos

y 36 o 48 horas.

Hay que hacer notar al respecto, que la hemólisis producida en 36 horas o más, podría no deberse a la saponina, sino a la lisis espontánea de los glóbulos por factores tales como tiempo de exposición al ambiente, temperatura, etc.

Existen además otras circunstancias que afectan al proceso de la hemólisis y que podrían llevarnos a obtener resultados no correctos. En efecto, la hemólisis es más rápida en medio ácido (pH 5.3), y se retarda si el medio es alcalino (pH 9). (3) Esto resalta la importancia de usar siempre soluciones aproximadamente neutras.

La presencia de iones de Mg, Sr y Ba, citados en orden decreciente de su efecto, retardan la hemólisis; por el contrario, los iones citrato la aceleran (3) y los iones oxalato son hemolíticos por sí mismos.

En efecto, ensayando con el extracto acuoso del jaboncillo, me di cuenta que hemolizaba inclusive después de agregar colesterol. Esto se debe, según pude determinar después, a que es rico en oxalato, el cual debe eliminarse para realizar la clasificación de su saponina.

El proceso que se siguió fue el siguiente: precipitar el oxalato mediante iones de calcio y eliminar el exceso de éste por adición de fluoruro de sodio.

La acidez que se produce por la reacción del oxalato y la sal de calcio no es tan marcada, y en todo caso' puede controlarse agregando unas gotas de solución diluida de amoníaco.

La presencia de ion fluoruro, así como de otras sustancias formadas como productos secundarios en el curso' de la reacción (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl), experimentalmente se comprobó que no afectan los glóbulos rojos.

d) - Posibilidad de un método cuantitativo.

Después de usar diversos reactivos en la determinación cualitativa de las saponinas, se pudo observar, que la reacción de las mismas con ferricianuro de potasio en presencia de cloruro férrico, era la más sensible y más rápida; además es común a todas las saponinas ensayadas y de fácil apreciación.

Basada en dichas observaciones experimentales, he creído en la posibilidad de realizar la valoración cuantitativa de las saponinas por el método que se expone a continuación:

Prepárese una solución de saponina tipo, de concentración determinada con exactitud. Agréguese a ella, solución de ferricianuro de potasio de normalidad conocida, en una cantidad tal, que después de efectuada la reacción en su totalidad, quede un ligero exceso de ferricianuro. Úcese solución de cloruro férrico como indicador.

Sepárese el precipitado por filtración, y valórese en el filtrado el ferricianuro sobrante.

Con la cantidad de ferricianuro gastada en la oxidación de la muestra, averíguese la equivalencia de los miligramos de ferricianuro en relación a la saponina. Dicha equivalencia constituye factor experimental que llamaremos: F.

$$F = \frac{\text{mgms. de saponina.}}{\text{mgms. de ferricianuro.}}$$

Valoración:

Pésese con exactitud una cantidad determinada de la muestra, y extráigase completamente la saponina contenida en ella.

A la solución que contiene la saponina, agréguese un exceso de solución de ferricianuro de potasio de normalidad conocida. Sepárese el precipitado por filtración, y valórese el exceso de ferricianuro en el líquido filtrado.

Los miligramos de ferricianuro gastados en la oxidación de la muestra, multiplicados por el factor de conversión F ., nos da el número de miligramos (S) de saponina, presentes en la muestra tomada.

$$S = F. \times \text{mgms. de ferric. gastados.}$$

Como el fundamento de la reacción, es el poder de reducción de las saponinas, la presencia posible de otras sustancias reductoras en los extractos acuosos, tales como oxalatos o azúcares reductores, podría introducir error al método.

El oxalato es posible separarlo en forma cuantitati-

va, por adición de iones calcio en un medio neutro o ligeramente alcalino, y en cuanto a los azúcares, quizá no introduzcan un porcentaje alto de error, si se toman precauciones de tiempo en la realización de la prueba. En efecto, los azúcares dan igual reacción que las saponinas con el reactivo en cuestión, pero con la diferencia que el precipitado no aparece, sino después de un tiempo relativamente grande.

Por otra parte, entre los azúcares que dan precipitado más rápidamente, están la galactosa y la xilosa, los cuales se encuentran normalmente formando la parte azucarada de las saponinas, de manera que si están presentes en el extracto acuoso, es muy probable que provengan de la hidrólisis de las mismas y en ese caso, el error que introducen sería constante.

Posiblemente queden algunas otras dificultades por obviar, pero el método puede ser útil, pues no conociéndose la estructura química exacta de las saponinas, utiliza una propiedad aceptada como común a los miembros del grupo: la de tener capacidad reductora en presencia de sustancias oxidantes.

Experimentalmente se determinó el tiempo que tardan en precipitar algunos de los azúcares más frecuentes, con el reactivo de ferricianuro de potasio. Los resultados de este ensayo pueden verse en el cuadro siguiente.

CUADRO DEMOSTRATIVO DE LA POSIBLE INTERFERENCIA DE ALGUNOS AZUCARES
EN LA PRUEBA CON FERRICIANURO DE POTASIO

Reactivo: Ferricianuro de potasio en presencia de cloruro férrico												
	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'	40'	45'	50'	55'	60'
Glucosa	-	-	-	-	-	-	o	-	-	+	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o
Arabinosa	-	-	o	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactosa	-	-	o	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	o	-	-	+	-
Fructosa	-	-	o	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Manosa	-	-	-	-	-	-	-	o	-	-	+	-
Maltosa	-	-	-	-	-	o	-	+	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	-	-	o	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

o = Coloración Verdosa.

+ = Precipitado Azul.

- = Negativo.

C A P I T U L O Q U I N T O

RESULTADOS OBTENIDOS

El primer cuadro comprendido este capítulo, reúne las reacciones que se aplicaron para la identificación de las saponinas en estudio, y los resultados obtenidos con las mismas. Hay que hacer notar que algunas de estas reacciones se producen a temperatura ambiente, y son comunes a todas las saponinas estudiadas, como las producidas con ferricianuro o permanganato de potasio, pero hay otras que dan positivas solamente efectuándolas a temperatura elevada (100°C) y no son constantes en los resultados con las diversas saponinas.

El segundo cuadro comprende la clasificación hecha de las saponinas utilizadas en el presente trabajo, en saponinas propiamente dichas y sapotoxinas. Esta clasificación se hace con base en la hemólisis producida por algunas de ellas.

Como puede deducirse de la lectura del cuadro, solamente dos de estas saponinas, la contenida en el jaboncillo y la de la cabuya # 3, son sapotoxinas. El hecho de que en presencia de colesterol no produjeron la hemólisis, nos confirma el carácter de sapotoxina

de las mismas, pues los colestéridos resultantes de la combinación sapotoxina-colesterol no son hemolíticas.

Las demás saponinas no se manifestaron activas con respecto a los eritrocitos.

**CUADRO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS PRUEBAS CUALITATIVAS
DE LAS SAPONINAS ESTUDIADAS**

	K ₃ Fe(CN) ₆		React. Nessler		React. Fröhde		React. Fehling			H ₂ SO ₄ Concent.				Sol. KMnO ₄	Hg Cl ₂	
	Fe Cl ₃		20°C	100°C	20°C	100°C	20°C	100°C	20°C	100°C	20°C	100°C	20°C	20°C	100°C	
	5'	15'	1h	1h	5'	15'	5'	1h	1h	5'	1h	5'	1h	5'	1h	1h
Jaboncillo	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Cabuya # 1	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Cabuya # 2	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Cabuya # 3	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Pacaya	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Tiquisque	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Pata	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Ñame	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Remolacha	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Guinda (*)	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Escobilla Blanca	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+

(*) = Zizyphus Mauritiana, especie llamada erróneamente "Guinda", en Costa Rica.

C A P I T U L O S E X T O

DESCUSION Y CONCLUSIONES

El menstruo que se emplea para extraer las saponinas de las muestras vegetales, es el agua. Sin embargo, como el agua disuelve a la vez que al principio activo, otras sustancias presentes en las mismas, los extractos resultantes son muy impuros, y con frecuencia esas impurezas interfieren las reacciones de identificación. Tal es el caso de los colorantes, (que las saponinas tienen poder de retener), los mucílagos, el ácido oxálico, los azúcares y otras sustancias reductoras.

La precipitación de las saponinas de las soluciones acuosas concentradas, por medio del alcohol etílico, no es segura, pues existe la posibilidad de que contengan otras sustancias como azúcares, ácidos, sales minerales, etc., que son solubles en agua pero no en solventes orgánicos, y que precipitan por el cambio de disolvente.

El uso de sales de plomo o bario con el mismo fin, no es recomendable porque como se dijo, es frecuente encontrar ácidos orgánicos en los extractos acuosos de drogas vegetales, los cuales, precipitarían en presencia de los reactivos mencionados. En efecto, el sedimento parti

cularmente abundante que se forma al agregar tales reactivos a las soluciones que contienen las saponinas, hace pensar en la posibilidad de una reacción de este tipo; sobre todo si tenemos en cuenta la mayoría de las muestras utilizadas, manifestaban en el agua, un pH alrededor de 5. En el caso del jaboncillo, se comprobó la existencia del ácido oxálico.

Por otra parte, la eliminación del exceso de plomo agregado, utilizando H_2S , da como resultado la pérdida de una cantidad apreciable de saponina, pues es sabido que el sulfuro de plomo retiene tan íntimamente la saponina, que ésta sólo podría ponerse de nuevo en libertad, oxidando el ion sulfuro a sulfato. (7)

Empleando $Ba(OH)_2$ como precipitante, es lógico pensar que siendo ésta sustancia básica, separa únicamente las saponinas ácidas. Lo mismo podría decirse con respecto al uso de la magnesia calcinada.

En cuanto al uso del carbón como decolorante de los extractos, hay que recordar que éste, a la vez que retiene las materias colorantes, separa cualquier otra sustancia coloidal presente en la solución, y siendo las saponinas sustancias coloidales, son también retenidas por el mismo prácticamente en forma total. Ensayé poner este carbón que contiene la saponina en un büchner, y prac

ticarle lavados con alcohol etílico de 60° hirviente, y en efecto, parte de la saponina puede recuperarse, pero en todo caso no en forma total y el extracto queda siempre muy diluido.

Los mejores resultados los obtuve utilizando alcohol de baja graduación en vez de agua para realizar las extracciones. En efecto, preparando los extractos por el método del alcohol, se obvian algunos de los inconvenientes que presentan los obtenidos mediante el uso del agua como vehículo extractivo: se eliminan los colorantes, los cuales pasan al alcohol de los lavados, y además los mucílagos en buena proporción; posiblemente la extracción de otras sustancias poco solubles, en alcohol, también se reduzca. Por otra parte al calentar con alcohol, se está estabilizando al mismo tiempo el extracto, por inactivación de las enzimas causantes de la hidrólisis de las saponinas en solución acuosa.

El resultado es un extracto de apariencia clara, que contiene la totalidad de la saponina presente en la muestra que se tomó, en forma bastante pura, ya estabilizada y que se logra con relativo poco costo, comparativamente.

Ahora, un ligero comentario, acerca de las pruebas utilizadas para la determinación cualitativa de saponi-

nas.

Prueba con Reactivo de Nessler.

Interpretando esta reacción como resultado de la reducción del reactivo de Nessler por la saponina, podemos explicar los cambios de color como pasos intermedios de reducción: así, la coloración amarilla y el precipitado naranja iniciales, se deberían al HgI_2 formado, el precipitado gris final corresponde posiblemente a una mezcla de Hg_2 , I_2 y Hg metálico, y el color verde intermedio, puede considerarse la mezcla de ambos. Esta es una prueba bastante sensible, pero puede influenciarla otras sustancias reductoras, dado el tiempo necesario para realizarla y la temperatura elevada que se utiliza.

Prueba del HgCl_2 .

Esta es otra reacción típica de reducción, en la que el bicloruro de mercurio, posiblemente es reducido a calomel y en parte a mercurio metálico, posteriormente.

Prueba con Reactivo de Fehling.

En esta prueba el precipitado formado puede interpretarse como Cu_2O , dadas las propiedades reductoras de las saponinas, pero algunos autores creen en la posibilidad de un complejo de Cu-Saponina, del mismo color.

Prueba con ferricianuro de potasio.

De esta prueba ya se habló extensamente en otro capítulo, pero me resta agregar algo más: todas las saponinas utilizadas en la experiencia, dan reacción positiva inmediata con este reactivo (precipitado azul), excepción hecha del jaboncillo que da primeramente precipitado amarillo, el cual cambia a azul después de quince minutos aproximadamente. Este precipitado amarillo inicial, pudo comprobarse que se debe a la presencia del ion oxalato, el cual precipita con la coloración indicada, al agregarle reactivo de ferricianuro de potasio.

Prueba con H_2SO_4 .

Aunque diversos autores mantienen la idea, de que todas las saponinas dan coloración roja con H_2SO_4 , las utilizadas en el presente trabajo no la manifestaron, a excepción del jaboncillo.

Prueba con Reactivo Fröhde.

Al reportar la aparición del color azul, al tratar las saponinas con reactivo de Fröhde, lo hago basada en las experiencias realizadas personalmente, ya que distintos autores no coinciden en cuanto a la coloración obtenida con este reactivo. Para Koberg, tal coloración es

roja. Según bamford, aparece color azul violeta en quin
ce minutos, el cual cambia a verde en los próximos quin-
ce minutos.

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

- 1.) The Merk Index.
1940. Fifth ed. 1060 p.p. Merk & Co. Inc. Rahway
N. J. Philadelphia.
- 2.) Bamford, F.
1951 Poison their Isolation and Identification.
Third ed. VIII-305 p.p. J & A. Churchill Ltd.
104 Gloucester Place W 1. London.
- 3.) Chemical Abstracts.
1950 Vol. 44 número 22 pág. 10929.
1950 Vol. 44 número 7 pág. 3115.
1951 Vol. 45 número 8 pág. 3444.
1951 Vol. 45 número 8 pág. 3560
- 4.) Sollmann, T.
1955 Farmacología y sus Aplicaciones a la Terapéu-
tica y a la Toxicología. Séptima ed. XV - 1577,
p.p. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España.
- 5.) Zappi, E. V.
1952. Tratado de Química Orgánica. Segunda Edi-
ción, Tomo V. 667-1311, p.p. Librería "El Ateneo"
Editorial. Florida 340. Córdoba 2099. Buenos Ai-
res.

6.) Standley, P. C.

1937. Flora of Costa Rica.

Field Museum of Natural History. Chicago, U.S.A.

7.) Enciclopedia completa de Farmacia.

1926. Traducción española. Segunda Edición.

Tomo XIII _ VI _ 925 p.p. Editorial "Saturnino Calleja". Madrid.

8.) Fieser L. F. y Fieser M.

1948. Química Orgánica. Traducción española.

XII - 1112 p.p. Editorial Atlante S. A. México, D. F.

9.) Fühner.

1956. Toxicología Médica. 2a. ed. Traducción Española. XXII - 315 p.p. "El Ateneo" Barcelona.

10.) Ferguson, N. M.

1956. A Textbook of Pharmacognosy. IX - 374 p.p. The Macmillan Company. New York.

I N D I C E

	Pág.
<u>CAPITULO PRIMERO:</u>	
Introducción	1
<u>CAPITULO SEGUNDO:</u>	
Generalidades.....	2
<u>CAPITULO TERCERO:</u>	
Clasificación Botánica y Descripción de las Especies Estudiadas.....	6
<u>CAPITULO CUARTO:</u>	
Partes Utilizadas de las Especies Estudiadas...	10
Métodos Ensayados para la Extracción y Purificación de Saponinas.....	10
Pruebas de Identificación.....	14
Clasificación en Saponinas y Sapotoxinas.....	16
Posibilidad de un Método Cuantitativo.....	20
Cuadro Demostrativo de la Posible Interferencia de algunos azúcares en la prueba con ferricianuro de Potasio	23
<u>CAPITULO QUINTO:</u>	
Cuadro de los resultados obtenidos con las pruebas cualitativas de las saponinas estudiadas...	24
Cuadro comparativo de la acción hemolítica de las saponinas y sapotoxinas estudiadas, sobre glóbulos rojos humanos.	25

	Pág.
<u>CAPITULO SEXTO:</u>	
Discusión y Conclusiones.....	26
<u>CAPITULO SEPTIMO:</u>	
Bibliografía.....	32