

Tesis de Posgrado

Los Espumígenos en Bromatología

Bombelli, Angel A.

1932

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bombelli, Angel A. (1932). Los Espumígenos en Bromatología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0170_Bombelli.pdf

Cita tipo Chicago:

Bombelli, Angel A. "Los Espumígenos en Bromatología". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1932.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0170_Bombelli.pdf

1932

TESIS

Presentada para optar al título de doctor en química

AGUSTO A. BOMBALDI



1932



TODOS LOS DIAS

TOMAS J. RUMI

H

En el vaivén eterno de las eras, el porvenir es siempre de los visionario

La interminable contienda entre el idealismo y la mediocridad tiene su símbolo: no pudo Cellini clavarlo en más digno sitio que la maravillosa plaza de Florencia.....

.....
.....
..... Y en el gesto del bronce parece que el Idealismo decapitara a la Mediocridad, entregando su cabeza al juicio de los siglos.

José Ingenieros

Señores Consejeros:

Señores Profesores:

He aquí mi tesis.

Al presentar este modesto trabajo, producto de la poca experiencia que he recogido en el estudio del problema, lo hago, por que no decirlo, con el espíritu embargado en un indefinible sentimiento, mezcla de alegría y de tristeza.

De alegría, por que entreveo un más allá hermoso. Hermoso por la atmósfera de libertad con que a mis ojos se presenta circundado. De libertad de estudios, de libertad de selección, de libertad de espíritu, y la libertad fué siempre causa de la más recóndita alegría.

De tristeza, pensando, al contemplar la modestia del trabajo, que tal vez no habré correspondido en la mínima medida de lo debido.

Pero, buenos o malos, acertados o equívocos, sus juicios tienen la virtud de ser personales, dentro de lo que entiendo que de tal puede exigirse a un joven que está por abandonar recién las aulas para lanzarse a la vorágine del mundo.

No tengo la más remota pretensión que los juicios que formule sean definitivos. Tal vez, yo mismo con el tiempo llegue a ser el primer convencido de la inexactitud de algunos o de todos los conceptos que hoy expreso. Y, en este caso, también sería el primero en proclamarlo, por cuanto, entiendo por principios que no es delito ni vergüenza estar equivocado, cuando el error es de buena fé.

Antes de terminar estas líneas, quiero ratificar, Señores Profesores, los conceptos que quedan expresados, y, entendiendo que el espíritu de justicia y agradecimiento es ley en las personas bien criadas, debo expresar mi reconocimiento al Doctor Tomás J. Rumi, quien en esta ocasión ha tenido la gentileza de acompañarme como padrino de tesis y a todos aquellos, que de algún modo, me han ayudado a dar término al presente trabajo.

Buenos Aires, Agosto de 1932.

PLAN DE TESIS

PARTE I

A) Algunos conocimientos de orden general necesarios para el estudio analítico de las saponinas:

1º) Concepto.

2º) Problema de su estructura:

a) Los productos de hidrólisis.

b) La series de Kobert y de Flückiger.

c) Fórmula general para las saponinas.

3º) Propiedades de las saponinas.

a) Solubilidad

b) Tensión superficial, índice hemolítico y actividad biológica

c) Propiedades eléctricas

d) Reacciones químicas

e) El reactivo biológico

f) Saponinas, enzimas y levaduras.

4º) La glicirricina.

B) Difusión de las saponinas en la naturaleza.

1º) Antecedentes.

2º) Enunciación de las técnicas empleadas por los diferentes autores para el reconocimiento y la localización de las saponinas en los vegetales.

3º) Contenido de saponinas en las plantas.

4º) Las saponinas de la zarzaparrilla.

5º) Algunos vegetales glicirricínicos y saponínicos más conocidos.

6º) Vegetales de uso alimenticio que contienen saponina. .

7º) Indices de plantas con saponinas.

8º) Hay saponinas de origen animal?

PARTE II

Fundamentos y ejecución de los métodos analíticos propuestos para la investigación de las saponinas

A) Métodos químicos:

- a) De Rosenthaler; comentario.
- b) De Brunner-Rühle; idem.
- c) De Halberkann; idem
- d) De Carlinfanti y Marzzocchi; idem
- e) De Vamvakas; idem
- f) Métodos cuantitativos del Ba; etc., y del MnO₄K.

B) Métodos bioquímicos:

- 1º) Concepto del método hemolítico.
- 2º) Las técnicas de Müller-Hossley y de Sormani; sus comentarios.
- 3º) El índice hemolítico.
- 4º) El número espuma.
- 5º) El cociente veneno-espuma de Kofler; comentario.

PARTE III

Fundamentos y antecedentes para aconsejar un criterio de legislación bromatológico respectivo a los espumígenos.

- 1º) Fundamentos toxicológicos; acción de la introducción per os.
- 2º) Legislaciones de algunos países extranjeros
- 3º) La legislación argentina.
- 4º) Criterio aconsejado.

Parte I

Generalidades

Concepto sobre los espumígenos:

Si quisieramos definir los espumígenos hallaríamos grandes dificultades por cuanto no es bien conocida, y dista mucho de ser lo medianamente, la estructura química de sus moléculas. Apenas, si se tiene una idea, como luego se indicará, de la estructura de los grandes fragmentos en que se descompone la misma - estudio que se complica todavía debido al carácter micelar, pues son coloides - al ser tratada por determinados agentes químicos. Nos limitaremos, pues, a decir, a manera de definición, como lo hace Calatoni⁽¹⁾ en su trabajo "Bioquímica de las saponinas", que son productos vegetales glucosídicos, añadiendo por nuestra cuenta, que se hallan dotados de la importante propiedad de producir sus soluciones acuosas, al ser agitadas, una espuma persistente, aun cuando se trate de soluciones muy diluídas.

Se comprende que la definición es muy amplia; luego, no debe sorprender el hecho de que se incluya en el grupo de los espumígenos, al lado de las saponinas, cuerpos como la glicirricina, la solanina, etc., cuyas propiedades los apartan un tanto de los mencionados anteriormente. Así, por ejemplo, la toxicidad de la glicirriina, como su poder hemolítico, difieren en la generalidad de los casos, de lo que se observa en las saponinas; la solanina es un cuerpo nitrogenado, mientras que las saponinas no llevan nitrógeno, etc.

Estructura de las saponinas

A los efectos del estudio de las moléculas o micelas de las sapo-

(1) Artículo publicado en "Temas de químicas" Tomo 2, año 1928 - 29 pág. 53a 63. Asociación química Argentina (A.C.A.)

se recurrió, por una parte, al análisis elemental orgánico y por otra parte al estudio de los productos originados en la hidrólisis.

La primera ha permitido la composición centesimal, dar algunos pesos moleculares, etc.; lo segundo a dejado entrever algo, con respecto a las grandes agrupaciones que integran esas micelas. Pero, en honor a la verdad, hay que decir que lo único que puede llegar a resolver el problema de la constitución de las saponinas, el análisis funcional, aún no ha sido abordado prácticamente.

Para seguir un orden que facilite la comprensión del problema comenzaremos por exponer lo relativo a:

Producto de hidrólisis:

Para prevenir al lector de las posibles sorpresas que pudiera encontrar en la literatura, y a la vez, para que sepa apreciar los trabajos realizados por diferentes autores, con un criterio de cierta tolerancia, adelantaremos estas páginas palabras: no se tiene la certeza que los productos empleados como saponina, tenga un cien por ciento de saponinas, ni mucho menos; en efecto, las saponinas no han sido aún aisladas al estado de pureza, y, puriss. alb. Merck ~~de Kofler(2)~~ que es la más empleada para fines científicos, según expresa el mismo Merck(1), no es un producto puro, sino se trata de extractos de planta purificados, con más o menos hidrato de carbono". Al decir de Kofler(2) el mayor defecto que tiene la saponina puriss. alb. Merck es su propio nombre puesto que hace pensar en un producto puro, cosa que no es.

La importancia de estos hechos es algo que resulta obvio recalcar.

(1) L. Kofler, "Die Saponine", pág. 257. año 1927. Cita sacada de este libro

(2) L. Kofler, "Die Saponine", pág. 257. año 1927

Las saponinas dan por hidrólisis ~~en~~ hidratos de carbono, y un resto orgánico complejo.

Los hidratos de carbono que se obtienen en dicha hidrólisis son variables con las saponinas. Numerosos autores se han ocupado de este asunto y Kofler, en su libro "Die Saponine", dedica un capítulo: "Die Kohlenhydrate der Saponine", (pág. 95 a 98,) en el que se indica en cada caso la bibliografía especial, y del que extraigo el siguiente resumen: Los hidratos de carbono que se producen son hexosas (glucosa, levulosa y galactosa), pentosas (arabinosa, xilosa y ramnosa); y, ácidos derivados de la oxidación de la glucosa y ~~galactosa~~ galactosa: glicurónico y galacturónico.

Doy a continuación algunos ejemplos, indicando en cada caso, el nombre de la planta de la cual proviene el hidrato de carbono, aislado de la respectiva saponina, y el nombre del autor del trabajo:

H.de C.	Planta	Autores
Glucosa	Yucca filamentosa	Chernoff, Viehoveer, John
"	Agave Lechuguilla	" " "
"	Aralia Montana	Van der Haar
"	Polyscias nodosa	idem
"	Sarsaparrilla	Kaufmann y Fuchs
Levulosa	Bassia longifolia	Spiegel
"	Phytolacca abyssinica	Kueny
"	Sapindus utilis	Winterstein y Blau
Galactosa	Pseudophoenix vinifera	Van der Haar
"	Aralia saponina	Idem
"	Phytolacca abyssinica	Kueny

Arabinosa		Polycias nodosa	Van der Haar
"		Sapindus utilis	Winterstein y Blau
Xilosa	en la	Digitonina	Kiliáni
Ramnosa		Sapindus utilis	Winterstein y Blau
"	en la	Heredia Gipsofila	Van der Haar
Acido Glicurónico		Styrax Japonica	idem
"	Galacturónico	Aralia Montana	idem

etc.

La identificación de los hidratos de carbono separados en la hidrólisis, no resulta cosa fácil. Las reacciones empleadas para su reconocimiento fueron las corrientes.

Al recorrer la lista anterior, llama la atención el hecho de que en una misma planta se hallan encontrado diferentes hidratos de carbono, a partir de sus saponinas; el origen de este hecho tiene que buscarse en una de estas dos explicaciones: 1ª) Ya sea que una saponina determinada lleve en su moléculas o micela, más de un hidrato de carbono; 2ª) O bien, admitiendo que cada saponina no llevase sino un solo hidrato de carbono, en cuyo caso, sería menester que en un mismo vegetal se hallase más de una saponina.

La primera hipótesis lleva en su apoyo lo que se dirá al hablar de las prosapogeninas; la segunda, aunque ha sido discutida, el hecho de existir vegetales con más de una saponina. (Léase más adelante el caso de la zarzaparrilla)

Las sapogeninas:

Decíamos que en la hidrólisis de las saponinas se obtenía, además de hidratos de carbono, un resto orgánico complejo. Pues bien, a éste se le denomina sapogenina.

Poco se sabe sobre la constitución de las sapogeninas. Son cuerpos relativamente ricos en oxígeno, aunque tienen menor porcentaje de este elemento que la respectiva saponina de la cual provienen. La función de los átomos de oxígeno, no es conocida. La ^{de la} ciclamina tiene 37,27 % de O₂ (Dafert); la de la ciclamiiretina, 14,39 % (idem), etc. Rosenthaler y Ström⁽¹⁾ determinaron los grupos carboxilos por metilación, en frío. Está demostrado que las sapogeninas no salifican sus funciones ácidas con los alcális, es decir, las sapogeninas son indiferentes a los álcalis (aún al KOH en caliente); tampoco reaccionan con NH₂ OH, H₂N.CO.NH.NH₂; etc.⁽²⁾ Los dos autores citados anteriormente determinaron los grupos alcohólicos por acetilación; luego, Winterstein y Blau,⁽³⁾ dosaron los grupos cetónicos transformando los en semicarbazonas.

Killiani,⁽⁴⁾ en 1893, sospechó que la digitogenina, es decir, la sapogenina de la digitonina, estuviese en estrecha relación con los terpenos, basándose en el olor terpénico que desprendíase de sus productos de combustión, al ser incinerados sobre lámina de platino. Además, estudió el ácido de la digital, del que dice: "es indudablemente un compuesto saturado y considerando su contenido de hidrógeno debe colocarse entre las combinaciones hidrógenadas, con ciclos de carbono."

(1) L. Kofler, Obr. cit. pág. 99; L. Rosenthaler y Knut F. Ström, Arch. d. Pharmazie 250, 290 (1912)

(2) H. P. Kaufmann y C. Fuchs, Las saponinas de la raíz de zarzaparrilla, Chemical Abstracts, 28:1492 (6).

(3) L. Kofler, obr. cit. pág. 99; del Zeitschr. f. physiol. Chemie 75, 431 (1912)

(4) L. Kofler, obr. cit. pág. 100; cita sacada de Arch. d. Pharmazie 231, 450 (1893)

Fué Van der Haar⁽¹⁾ quien estableció de un modo definitivo el parentesco de las sapogeninas con los terpenos. Para ello destiló con polvo de Zn. y en presencia de una corriente de hidrógeno, la Hidrogenina. El producto de esta operación lo arrastraba por vapor de agua, y en el destilado lograba identificar un sesquiterpeno de fórmula $C_{15}H_{24}$, el que, con ácido sulfúrico, y aún mejor en presencia de ácido glacial, da un hermoso color violeta. Hace luego las mismas operaciones con otras sapogeninas (la del guayaco, de la saponaria, de la seneguina, de las digitoninas y de las α heredinas) llegando a los mismo resultados, de lo que deduce esta hipótesis:

"Todas las sapogeninas tienen un núcleo terpénico común al que deben la reacción del ácido sulfúrico."

Posteriormente, como la fitosterina daba también las reacciones de Liebermann, Salkowsky, etc., el mismo Van der Haar se ocupó de relacionar las sapogeninas con los esteroides vegetales, llegando, como última conclusión, a que las sapogeninas estaban unas veces relacionadas a los terpenos, y otras, a los esteroides. Luego, Windaus⁽²⁾ amplió la observación anterior relacionando las sapogeninas con los esteroides animales (colesterina).

En resumen, Killiani fué el primero que se ocupó de la constitución química de las sapogeninas, y Van der Haar, fué, hasta el presente, el continuador más eficaz.

Las prosapogeninas:

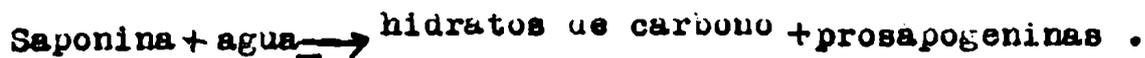
La transformación de las saponinas, por hidrólisis, en hidratos de carbono más sapogeninas, no se verifica de una manera inmediata pues se

(1) L. Kofler obr. cit. pág. 100; ~~xxxx~~ Biochem. Zeitschr 76, 333 (1916) et

(2) L. Kofler obr. cit. pág. 100 - 101; Nachr. d. Ges. d. Wiss. zu Göttingen, Math - phys. Kl.; Sitzg. vom 24. Juli 1925.

forman intermediariamente unos productos, también orgánicos y complejos los que, son más o menos ricos en hidratos de carbono y cuya formación es anterior a la de las saponinas. A esos productos citados se les llama prosapogeninas.

El esquema de la hidrólisis de una saponina, puede hacerse así:



Digo, prosapogeninas, en plural, pues serán posibles tantas de ellas como ^{moléculas de} hidratos de carbono haya en la molécula de saponina y de la manera ^{moléculas} como se separen de la misma. Las prosapogeninas son, por lo tanto, productos formados a partir de las saponinas por separación incompleta de los hidratos de carbono.

Son términos sinónimos: sapogeninas iniciales o sapogeninas secundarias (Kobert), o prosapogeninas (Rosenthaler y Ström).

Para Kobert las prosapogeninas no son otra cosa que las saponinas ácidas que se obtienen en los laboratorios. Más concisamente: este autor admite la existencia de dos clases de saponinas ácidas: las naturales, que se forman en las plantas, y las artificiales, productos de laboratorio con los que identifica las prosapogeninas.

En cuanto a la estructura de las prosapogeninas se sabe menos aún que con respecto a las saponinas y sapogeninas. Como se comprende, es muy difícil aislarlas pero parece que existen preformadas, juntos con las respectivas saponinas, en la planta del castaño .

Kofler hace notar en la obra tantas veces citada ("Die Saponine"), pág. 103, una observación más o menos general que consiste en que las hexosas son los primeros hidratos de carbono que se separan en la hidrólisis,

Haciéndolo luego las pentosas. Kofler dice que no puede pensarse, a pesar de lo dicho, en dar como esquema del proceso de la formación de las prosapogeninas y sapogeninas, lo siguiente:



Las fórmulas y las series:

Con lo expuesto anteriormente quedan demarcadas las grandes líneas según las que se escinde la molécula o micela de saponina, adquiriendo una idea de su estructura esquelética. Nos ocuparemos ahora, después del estudio cualitativo que hemos hecho, de la aplicación del análisis elemental orgánico que ha permitido, primero, establecer fórmulas para las saponinas, y luego, con esas fórmulas se han hecho series de las que, a su vez, ha sido posible deducir una fórmula general para las saponinas.

Como veremos más adelante en la zarzaparrilla hay tres saponinas⁽¹⁾ a las que los autores han asignado diferentes fórmulas:

Parfillina	$C_{26}H_{44}O_{10} \cdot 2\frac{1}{2} H_2O$
Smilacina	$(C_{22}H_{32}O_{10})_5 \cdot 12 H_2O$
Zarzaponina	$(C_{22}H_{36}O_{10})_{12} \cdot 24 H_2O$

La saponina de la raíz de saponaria tiene por fórmula $C_{32}H_{54}O_{18}$ la soneguina, que se extrae de la Polígala de Virginia, le asignan una fórmula en $C_{32}H_{52}O_{17}$. Kobert dió a la digitonina la fórmula $C_{55}H_{94}O_{23}$, mientras que para Windaus es $C_{55}H_{90}O_{29}$.

Podrían darse una serie de fórmulas de otras muchas saponinas, pero en realidad no tiene ningún objeto pues con revisar la literatura, aunque sea a la ligera, se encontrarán en gran número. Lo que interesa es conocer el hecho de que los autores no están de acuerdo frecuentemente con

(1) Journal de Pharm. et de Chimie, Tomo 9, año 1914 pág. 290 - 293

las fórmulas dadas, como sucede en el caso citado de la digitonina. A Flückiger, primero, y a Kobert, después, se les ocurrió formar con las fórmulas que se conocían agrupaciones a las que dieron nombre de series. Creyendo que las saponinas variaban en su estructura, a partir de unas pocas fórmulas básicas, según una ley sencilla crearon verdaderas series homólogas.

Flückiger estableció la serie de su nombre, que responde a la fórmula general: $C_n H_{2n-10} O_{13}$; es decir, un término constante en O_{13} llevan las saponinas que responden a esta serie, en la que, los valores de C varían entre 27 y 55.

Kobert creó dos series: la de la digitonina, o segunda serie de Kobert, que lleva un término constante en O_{23} , de fórmula general: $C_n H_{2n-18} O_{23}$, en la que C va de 42 a 86; y, la llamada primera serie de Kobert, cuyo término constante es O_{13} , de fórmula general: $C_n H_{2n-8} O_{13}$, donde C varía entre quince y treinta.

En la obra de Kofler tantas veces citada, en las páginas 92 y 93 hay una interesante formulación de estas series, las que no reproducimos por no juzgarlo apropiado para el caso.

Los cocientes C/H son estas series:

para la primera de Kobert: de 8,2 a 6,9

" " segunda de " : " 7,4 a 6,6

" " de Flückiger: de 7,4 a 6,6

Como término medio, puede tomarse para las tres series: $C/H = 7,5/1$ multiplicando, arbitrariamente, por 3 el numerador y denominador del segundo miembro, se tiene: $C/H = 7,5 \times 8/1 \times 8 = 60/8$.

Dividiendo por los pesos ¹⁰atómicos respectivos:



de modo que se obtiene así la relación de 5 átomos de C por cada 8 átomos de Hidrógeno, relación que la experiencia demuestra que existe no solo para la mayor parte de las saponinas, sino también para sus productos de hidrólisis. Luego, como las saponinas son productos ternarios, si se fija previamente el valor del tercer término, puede asignarseles una fórmula general del siguiente tipo:



donde "y" es el término constante.

Las fórmulas vistas permitieron hacer un esbozo de clasificación de las saponinas, pero, más tarde, Van der Haar y Windaus demostraron que las saponinas no siguen rigurosamente dichas series, como al principio habían creído. ⁽¹⁾ Por esta razón las series estudiadas perdieron su valor.

A pesar de todo, con las salvedades hechas, podemos adoptar para las saponinas la fórmula general dada.

En el capítulo "Elementare Zusammensetzung" de la obra de Kofler "Die Saponine", págs. 92 y 93, se hallan desarrolladas las tres series que hemos estudiado.

Propiedades de las saponinas

Solubilidad

Las saponinas son solubles en agua y en las soluciones hidroalcohólicas. En etanol son solubles en caliente, pero ~~precipitan por enfriamiento~~ precipitan por enfriamiento; lo mismo se observa en metanol, en ~~el~~ el que son algo más solubles.

(1) L. Kofler, pág. 93, obr. cit.

Además, son solubles en acetato de etilo, y, aunque poco, en los alcoholes amílico e isobutílico. Son prácticamente insolubles en los en los disolventes orgánicos de los lípidos: éter, éter de petróleo, benzol, cloroformo, etc. Repetimos, en alcohol absoluto son insolubles. Reacción de las soluciones acuosas de saponinas :

Al papel de tornasol presentan reacción neutra o ácida. Esto ha justificado la división de las saponinas en dos grupos, neutras y ácidas. En el caso de estas últimas se favorece su solubilización por neutralización con un álcali. (Cita sacada de la publicación "Bioquímica de saponinas", publicada en Temas de Química, tomo 2, 1928-29, pág. 53, A. G. A.). Las saponinas ácidas y neutras^y presentan, como más adelante se indicará, diferentes propiedades químicas.

Por el contrario, las sapogeninas son insolubles en agua y en éter, pero son solubles en los álcalis y en los carbonatos alcalinos, en caliente, dando sales alcalinas solubles en agua) e insolubles en alcohol. En cuanto a la solubilidad en alcohol, Kofler⁽¹⁾ y Galatoni⁽²⁾ las dan como poco solubles, mientras O. de Almeida Costa⁽³⁾ dice que son solubles en el alcohol concentrado.

Las prosapogeninas son solubles en álcalis diluidos, poco solubles en agua más en alcohol, fácilmente solubles en acetato de etilo, e insolubles en cloroformo y éter común. (4)

Actividad superficial; su relación con la actividad biológica.

Las saponinas son sustancias tensioactivas. A ello se debe la característica de formar espuma - por disminución de la tensión superficial del medio - . Kofler midió la disminución de tensión superficial que producen

(1) Obr. cit. pág. 98. L. Kofler.

(2) Obr. cit.: Bioquímica de saponinas.

(3) Contribuição á pesquisa das saponinas. Rev. d. Soc. Brasileira de Química
Ano 2, núm. 10. pág. 479.

(4) L. Kofler, obr. cit., pág. 102.

muchas saponinas cuando se disuelven en agua, por medio del estalagmómetro de Traube, usando soluciones al 0,1% y 1%. Además, ensaya el poder tóxico de las mismas soluciones colocando para ello peces pequeños en su interior y anotando el tiempo que tardan en morir. Reproducimos parte de los valores hallados por Kofler:

Saponina	Número de gotas		mint. que tardan en morir	
	sol. 0,1%	sol. 1%	sol. 0,1%	sol. 1%
Digitonina Merck	142,3	149,6	4	3
Glicirricina	123,4	150,6	31	8
Sapindus saponina	116,3	123,8	11	5
Saponina del castaño	103,1	139,1	25	9
Sap. pur. alb. Merck	107,5	112,0	8	3

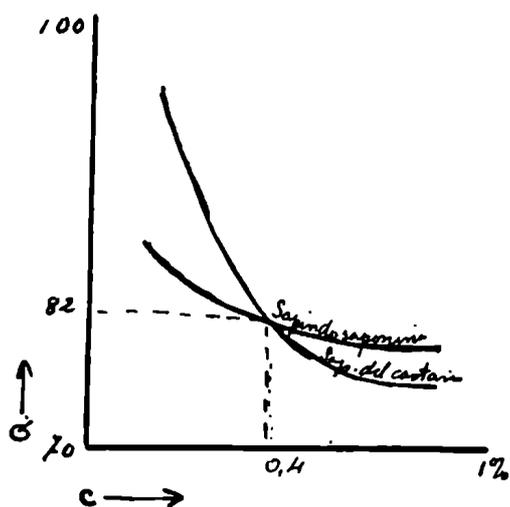
etc..

Los números de gotas dadas están referidas al agua, quiere decir ésto: Ha tomado un volumen de agua, tal que al ser estudiado en el estalagmómetro ha producido un número de gotas igual a 100 (agua = 100), y luego, ha tomado volúmenes iguales de solución de saponina y ha contado el número de gotas obtenido en cada caso.

Como primera consecuencia se desprende de la observación del cuadro anterior lo siguiente: La glicirricina no es absolutamente inofensiva, aunque también podría ser idiosincrasia, en el caso de los peces. Sin embargo, conviene tener presente este hecho para lo que se dirá en el último capítulo de este trabajo.

Luego, Kofler, construye gráficos colocando en las ordenadas la tensión superficial de las soluciones de saponinas y en las abscisas las concentraciones de las mismas. Es decir, construye gráficos calculando la tensión superficial a diferentes concentra-

ciones, como el que se adjunta y que ha sido tomado de la obra de Kofler tantas veces citado, pag. 46.



Lo primero que llama la atención en el gráfico es la existencia de puntos en los que las curvas se cortan, hecho éste que se observa, también, en el caso de las representaciones de las curvas correspondientes a digitoninas y glicirricina, sapindus y raman saponinas, etc.

Kofler (1), creyó al observar esos puntos en los que las curvas se cortan que podía existir una relación entre la tensión superficial de las soluciones de saponina y la toxicidad de las mismas. Es decir, se trataba de ver si las curvas toxicidad-concentración, y, tensión superficial-concentración, se podían identificar. El mismo llegó a la conclusión que no existe ninguna relación entre ambas curvas mencionadas; más aún, la toxicidad no solo no sigue dicha curva (tensión superficial-concentración) sino que, en cierto modo, es independiente de la misma concentración. Resulta evidente que no puede tomarse a la disminución de tensión superficial que experimenta el agua al disolver la saponina, como una medida de la actividad biológica de ésta.

Tensión superficial, índice hemolítico y toxicidad:

Woodward y Alsverg (2) compararon el comportamiento de la tensión superficial de las soluciones de 12 saponinas con su respectivo índice hemolítico y hallaron que tampoco existe relación.

En cuanto a la relación entre índice hemolítico y toxicidad, que es

(1) L. Kofler, Chemical Abstracts 15:2519 (5); obr. cit. pag. 46; del Biochem. 2. 129, 64-72 (1922).

(2) L. Kofler, obr. cit. pag. 47; del Journ. of pharm. and exp. therap. 16, 237 (1920).

que es la más interesante desde el punto de vista analítico, diremos que Kofler y Schrutka (1) se ocuparon del asunto llegando a la conclusión ^{de} que tampoco existe ninguna relación definida entre el índice hemolítico, por un lado, y la toxicidad por el otro. Así, por ejemplo, la toxicidad de la Saponina de Sapindus saponaria es una cien veces más débil que la de la saponina del quillay (gatos) o de la digitonina (ratones), aunque estas saponinas no difieren mucho en su acción hemolítica. Gaistböck y Bayer (2) han hecho este interesante estudio: toman cantidades de guayaco y quillaja saponinas, que hemolíticamente se equivalen (0,96 y 0,0066 gr. respectivamente de cada una) y estudian su acción tóxica por inyección intravenosa. Resulta que la guayacosaponina mata a los conejos a las dos horas, mientras que la del quillay lo hace recién a los dos días. Obsérvese que la guayacosaponina a pesar de ser relativamente mucho menos hemolítica que la del quillay, es sin embargo mucho más tóxica. Este hecho es de una extraordinaria importancia bromatológica, por cuanto establece de una manera decisiva que no se puede tomar como base para la legislación referente a saponinas, el poder hemolítico de las mismas.

En cuanto a la tercera relación (tensión superficial-toxicidad) ya fué considerada al hablar de la relación entre la actividad superficial y la actividad biológica.

Propiedades eléctricas:

La mayor parte de las saponinas tienen carga eléctrica negativa. Zeehuisen (3) dice que frotando pequeños discos de aluminio con polvo de dife-

(1) L. Kofler, obr. cit. pag. 200 y 201; del Biochem. Zeitschr. 159, 327 (1925).
C. Sagastume y L. Pelanda Ponce; Datos bioquímicos sobre la curro-saponina, Univ. de la Plata, 16 Julio 1931.

(2) A. Ceriotti, *Subst. Espum. Rev. Farm. exp. 154, tomo 74, marzo y julio 1932*
(3) L. Kofler, *ibid. pag. 201 de G. y B. Wien. klin. Wochenschr. 1924. núm. 39*
(3) L. Kofler, *ibid. pag. 43.*

rentes saponinas: amilacinas, sapotoxinas del quillay, solanina, etc, los discos adquieren pequeñas cargas positivas.

Luego, de acuerdo con las leyes fundamentales de la electricidad, las saponinas deben cargarse negativamente.

En la electroforesis, las partículas de saponinas se dirigen hacia el ánodo.

Las soluciones acuosas de saponinas tienen carácter coloidal y no dializan, o lo hacen muy difícilmente, a través de membranas de pergamino (Kofler y Wolkenbey (1)).

Actúan como coloides protectores y por esta propiedad han sido usadas para estabilizar las emulsiones. Wedekind y Krecke (2) determinaron el número de oro de la saponina del Agrostema y hallaron que de 0,004 a 0,010 grs de saponina, en solución coloidal, son suficientes para proteger a 10 cm^3 de sol de oro de la floculación por los electrolitos; luego, el número de oro de dicha saponina oscila entre 4 y 10 .

Además, las soluciones de muchas saponinas, tienen actividad óptica y adsorben los colorantes (3 y 4).

Propiedades químicas

Conviene tener presente lo que se ha dicho al principio con respecto a la pureza de las saponinas.

Las saponinas reaccionan con una gran cantidad de sustancias, reacciones que no son siempre generales. Algunas, como la prueba del ácido sulfúrico, son ~~diríamos~~, más constantes que otras, pero será conveniente citarlas todas.

Existe a propósito en el Chemical Abstracts un extracto hecho por A. Varisek de un trabajo publicado por Reichard en una revista alemana (Pharm. Zentralhalle 51, 1199 - 1204). En dicho trabajo, que es suma

(1) L. Kofler, Obr. cit, pág. 44 ; (2) L. Kofler; Obr. cit. pág. 55
(3) L. Kofler, Obr. cit. pág. 43; (4) Kofler y Calatroni.
(5) Chem. Abst: 5: 969(3). A.Q.A.

mente extenso, se da una síntesis de las reacciones aunque la mayor parte de ellas no son de uso práctico.

Kofler dedica en su libro "Die Saponine", un capítulo entero a dichas reacciones ("Reaktionen zum Nachweis der Saponine", pág. 62 a 65 citando solo las más usuales.

Las principales son;

1ª) Reacción de Rosoli: Con ácido sulfúrico concentrado las saponinas dan color amarillo que pasa al rojo y luego al violeta. Es la más característica de todas las reacciones. Con las saponinas que nos trabajamos no hemos observado tan nítidamente el color rojo intermedio. Diríamos mejor, que se produce toda una gama de colores la que comienza en el amarillo y remata finalmente en el violeta. Esta reacción se obtiene también, dice Kofler, empleando como reactivo una mezcla de partes iguales de ácido sulfúrico concentrado y alcohol a 96°.

Sieburg cree que esta reacción es debida al furfurool originado a partir del componente hidrocarbonado de la saponina, con los grupos metilos e hidroxilos del resto de la molécula de saponina, y concluye diciendo que la misma reacción se obtiene cuando se mezcla la sapogenina, sea cual sea, con una glucosa o pentosa pura y con ácido sulfúrico concentrado.

Van der Haar cree que la explicación de Sieburg no se ajusta a los hechos pues por un lado, las sapogeninas libres de azúcar dan la reacción, y por otro, las sapogeninas exentas de grupos metilos e hidroxilos también la dan (Polysíansapogenina) Van der Haar cree que la reacción del sulfúrico se debe a los núcleos terpénicos de la molécula.

2ª) Reactivo de Mecke: un gramo de ácido selenioso disuelto en 200

grs. de ácido sulfúrico. Se obtienen reacciones coloreadas con algunas saponinas.

3º) Con anhídrido acético y ácido sulfúrico; reaccionan las saponinas y sapogeninas. Disolver un poco de la sustancia en anhídrido acético y añadir igual volumen de ácido sulfúrico de modo que ambos líquidos queden separados. Se forma un anillo rojo que vira al violeta y luego al azul. A menudo, al cabo de algunos minutos, toda la capa superior resulta coloreada en verde esmeralda.

4º) Reacción de Mitschell; con ácido sulfúrico y nitratos se forman productos coloreados.

5º) Reactivo de Millón (nitrato mercurioso y nitrito mercurioso). Da con algunas saponinas en caliente color rojo. Esta reacción es característica de los grupos fenólicos (1).

6º) Reacción de Lafon. Es la misma reacción de Rosoli pero hecha con ácido sulfúrico y alcohol de 96º ; luego añade unas gotas de cloruro férrico y aparece desde una coloración hasta un precipitado verdeazulado.

7º) Reacción de Vamvakas; usa el reactivo de Nessler, con el que las saponinas dan coloración y precipitado amarillo sucio que luego se va obscureciendo. A veces conviene calentar.

8º) Richard hace esta reacción; Las masa/vegetales que contienen saponinas las macera con agua, bicromato de potasio y ácido clorhídrico. Aparece un color amarillo huevo, siendo los bordes más oscuros, y al fin, después de horas sobrenada un líquido verde/claro.

9º) Con reactivo de Frøde; un gramo de molibdato de amonio disuelto

(1) Rondoni: Bioquímica. pag. 112 .

en cien centímetros cubicos de ácido sulfúrico. Se obtiene un color amarillo que vira luego al verde y finalmente al violeta.

Las reacciones citadas son las más importantes, y de ellas, a su vez, la primera y la última, pues todas las demás son pocas características y casi siempre debidas fundamentalmente a la parte hidrocarbonada de la molécula.

Las saponinas reaccionan además con los siguientes cuerpos:

H Cl al 25% ; coloración

H N O₃ concentrado: coloración

Cr O₃ o Cr₂ O₇ K₂ más agua; solución amarilla que luego enturbia

Mo O₄ (N H₄)₂ más N O₃ H; color azul.

Con los metavanadatos alcalinos: por evaporación, se obtiene un residuo amarillento que luego oscurece.

W O₄ Na₂; por evaporación, residuo amarillo que con H Cl se pone azul eléctrico.

Con: N O₃ Hg, SO₄ Cu, (CH₃.CO.O)₂Cu, (NO₃)₂Mg, Cl₂Hg más ClNa, NO₃Ag, etc.

Es decir, con sales de ciertos metales pesados, se obtienen reacciones de reducción.

Con Cl₃Fe; coloración.

Con Fe (CN)₆K₄, Fe(CN)₆K₃, o la mezcla de ambos, se obtienen por evaporación masas coloreadas.

Con: (OH)₂Ba, (OH)₂Mg, (OH)₂Pb, OHNH₄, dan precipitado.

Con ácidos titánico y sulfúrico, en caliente, se obtiene un color violeta que desaparece por enfriamiento.

Con los compuestos de As, Co, Ni, Sn, y con los demás compuestos no citados del Fe, no dan reacciones características.

Algunos reactivos orgánicos actúan de una manera característica; el alfa-naftol da coloración con las saponinas, en ausencia de agua y de HCl.

Con formol se obtienen unas masas más o menos características.

Con difenilamina más NO_3H más SO_4H_2 ; coloración.

Otros reactivos, como el ácido pícrico, no dan nada.

Después de todas las reacciones citadas, diremos que a los fines analíticos corrientes casi todas ellas, por no decir todas, a excepción de la reacción de Rosoll y de la de Früdhe, tienen un valor casi nulo. Interesa retener el siguiente hecho: las saponinas dan reacciones de reducción con la mayor parte de las sales de los metales pesados (Ag, Hg, Cu, especialmente) las que se deben al grupo hidrocarbonado de la molécula.

A propósito de las propiedades reductoras de las saponinas he observado este hecho, que si bien no tiene nada de extraordinario, por lo menos, no está citado en la literatura; las saponinas reducen el permanganato de potasio, decolorándolo; se explica teniendo en cuenta que se trata de sustancias orgánicas. Este hecho simple se ha servido como base para ensayar, como más tarde se indica, una permanganimetría de saponinas, con resultados no del todo desalentadores (ver el cap. de los métodos analíticos).

Para la reacción cualitativa del MnO_4K , la técnica es muy simple; se lleva a sequedad la solución acuosa de saponina, en una capsula de porcelana, y luego se añade dos o tres gotas de MnO_4K al 1%. Se remueve con una varilla de vidrio y se vé, al cabo de unos minutos, que el color violeta del permanganato ha desaparecido. También puede hacerse

añadiendo el reactivo a una solución acuosa de saponina. La cantidad de permanganato destruída está en estrecha relación con la cantidad de saponina en presencia.

Creo que esta reacción del permanganato tiene más valor que aquella del CO_3Na_2 que se encuentra citada en todos los libros corrientes de Bromatología (Spica, Manual Suizo, etc.) y que consiste en tomar el residuo de llevar a sequedad la solución de saponina en una cápsula de porcelana por un poco de solución de CO_3Na_2 , agitar fuertemente, y ver si se forma una espuma persistente. Y digo que tiene más valor la reacción del permanganato que la del carbonato, por cuanto, aquella por lo menos, identifica materia orgánica, mientras que la otra nada dice, por cuanto cualquier medio alcalino, por agitación, producirá una espuma más o menos persistente.

Para concluir con las reacciones químicas se dirá que las saponinas ácidas precipitan de sus soluciones acuosas por adición de acetato neutro de plomo, mientras las saponinas neutras lo hacen con acetato básico. (1) Kobert dice que existen unas terceras saponinas que no son precipitadas ni por uno ni por otro de los reactivos citados (Del "Chemical Abstracts 11 : 1723 , 2).

El reactivo biológico: Su acción in vivo e in vitro.

Existe para las saponinas un precioso reactivo biológico: La sangre.

~~En xxx~~ Las saponinas tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos. Todas las saponinas, in vivo no tienen igual acción fisiológica, ni, in vitro, igual poder hemolítico. Las sapogeninas, por regla general, tienen menor poder hemolítico y menor acción fisiológica que la saponina de la cual derivan (Laube) a excepción de la sapogenina de la

(1) Estudio sobre "Solidago Microglossa D. G." 3a. pte. por el Dr. F. P. Rey. Rev. Farm. Junio 1932 T. 74 , N° 6 pág 137 - 138.

Polígala amara, que es más hemolítica que la respectiva saponina, pero ambas tienen igual acción sobre el corazón de rana.

En cuanto a las prosapogeninas no hemos hallado bibliografía especial pero, después de lo dicho para saponinas y sapogeninas, hay derecho a pensar que su acción fisiológica y su poder hemolítico las acercan más a las saponinas que a las sapogeninas. Recuérdese que Kobert las compara con las saponinas ácidas.

La glicirricina

Es considerada por la mayor parte de los autores como no hemolítica; Leach, por ejemplo, refiriéndose a la búsqueda de saponinas, dice hablando de la reacción del sulfúrico (1): "De los varios tests propuestos estos ninguno es especialmente característico, sobre todo si la glicirricina está presente", y más adelante: "El método hemolítico es más digno de confianza, aún en presencia de glicirricina".

Junto con la solanina, la helleboreína, etc., la glicirricina forma parte de un grupo de sustancias que poseen algunas de las propiedades de las saponinas, mientras otras las apartan de este grupo.

Para simplificar diremos que Kobert (2) fue quien estudió bien el problema y Tocco Tocco, dice que no existe en la glicirricina realmente una saponina hemolíticamente activa, y que la única sustancia que tiene acción biológica en la glicirricina es una prosapogenina preformada, que se halla en la corteza de la planta. Calatroni, en su resumen de la obra de Kofler que ya hemos citado, escribe textualmente lo siguiente: "Ciertas saponinas carecen de algunas de las

(1) Food Inspection and Analysis . Leach, 4th. Edition pág. 1015.

(2) Chemical Abstracts 10 : 250 (6).

propiedades anotadas o presentan otras que las alejan del grupo, ocupando un lugar intermedio entre éstas y los glucósidos generales. Tales son la glicirricina, de escasa acción hemolítica; la solanina, etc."

Este es sin duda el mejor lugar donde se debe ubicar la glicirricina. Además, las experiencias de Kofler, recordemos que ~~xxx~~ demuestran la existencia de una cierta toxicidad en la glicirricina, por lo menos para los peces.

En cuanto a la acción hemolítica de la glicirricina nosotros hemos ensayado con diluciones de extracto de regaliz, que contiene glicirricina, sin obtener hemólisis:

c.c. de hematies de carnero, lavados, y diluidos al 2% en sol.fis.	c.c. de sol.fis.	c.c. de dilución de extr. regaliz al 4%	observación
1	1,00	0,00	no hay hemól.
1	0,95	0,05	idem
1	0,90	0,10	idem
1	0,85	0,15	idem
1	0,80	0,20	idem
1	0,75	0,25	idem
1	0,70	0,30	idem
1	0,65	0,35	idem
1	0,60	0,40	idem
1	0,55	0,45	idem
1	0,50	0,50	idem
1	0,45	0,55	idem
1	0,40	0,60	idem
1	0,35	0,65	idem
1	0,30	0,70	idem
1	0,25	0,75	idem
1	0,20	0,80	idem
1	0,15	0,85	idem
1	0,10	0,90	idem
1	0,05	0,95	idem
1	0,00	1,00	idem

Nota: Las lecturas fueron hechas a las 24 horas y a la temperatura ordinaria.

Entre otras propiedades químico-biológicas, citaremos, nada más que a

título ilustrativo, los siguientes hechos, (1); las saponinas inhiben las reacciones luéticas de floculación, tales como la Sachs-Georgt, Meinicke, etc. Sería interesante ensayar con la moderna reacción de Kahn. Parece que las saponinas tienen la misma acción sobre aquellas reacciones basadas en el fenómeno de Bordet-Gengou, tales como la Wassermann, ~~Russ~~ etc. En cambio, no tiene según parece influencia alguna en la reacción de precipitinas de Uhlenhuth.

Saponinas y enzimas:

La relación entre las enzimas y las saponinas es aún poco conocida. Solo pueden citarse algunos hechos observados experimentalmente, pero, sin aventurarse a formular conclusiones de carácter general. Por ejemplo: a) las saponinas favorecen la acción de la lipasa pancreática, según Flohr (2), debido a que aquéllas disminuyen la tensión superficial del medio en el que se halla la lipasa; en los ensayos hechos con aceite de ricino se halló que la acción óptima se produce cuando se hace actuar la lipasa citada sobre una mezcla de tres partes de aceite de ricino con dos partes de saponina al 2%; b) la ureasa, lo mismo que la lipasa del ricino, son inhibidas por las saponinas (Bayliss); c) es conocido el hecho que el fermento lab se inhibe por el carbono y por el suero normal (Johnson-Blohm), pues bien, si ese lab inhibido se trata por saponinas recobra su acción.

En cuanto a la acción inversa, de las enzimas sobre las saponinas, puede decirse, en general, que aquellas saponinas que son escindidas por los ácidos minerales, también lo son por la acción de enzimas apropiadas.

(1) L. Kofler. Obr. cit. pág. 155 y 156.

(2) L. Kofler Obr. cit. pág. 104 y 105. ver allí bibl. especial.

das. Los fermentos digestivos, in vitro, escinden las saponinas. Además (Sieburg), se hallaron sapogeninas en los excrementos de animales que habían ingerido saponinas. Kobert y Bäck, confirmaron estos trabajos dando saponinas a perros y a gallinas. No hay duda pues que las saponinas son hidrolizadas por las enzimas digestivas.

Van der Haar en los hojas de las Araliaceas Polysceas, y Rosenthalert en la raíz de Senega, hallaron enzimas capaces de hidrolizar las respectivas saponinas que poseen estos vegetales. Se admite, hoy en día, que todo vegetal que posee una o más saponinas, tiene, a la vez, las enzimas capaces de hidrolizarlas.

Las levaduras y las saponinas

Sin llegar a resultados precisos este tópico fué estudiado por diferentes autores, y sobre todo, la acción de las saponinas en el proceso de la fermentación alcohólica por las levaduras.

Las diferentes clases de levaduras se comportan distintamente frente a las saponinas. A veces, ha sido posible conseguir una especie de aclimatación de la levadura. Influye, además de la levadura empleada, en la acción que estudiamos, la composición química del líquido a fermentar, y así se tiene, que la acción de las saponinas en estos procesos, que es una acción inhibente, resulta ~~sumamente~~ atenuada por la adición de ácidos.

Boas (1), cree, por el contrario, que las saponinas poco activas aceleran el proceso de fermentación; y observó, en esos casos, que la adición de sales mono o bivalentes (concentración N/5) matan la levadura, y que la acción nociva del K se elimina por adición de Ca, Ba, Sr, Rb o aumentando el pH, etc, etc. A nosotros, nos interesa este hecho:

(1) L. Kofler, Obr. cit. pág. 110, 111; Chemical Abstracts 15: 2901(5)

"la fermentación alcohólica tiene lugar aún en presé^ucia de saponinas."

Otras propiedades de las saponinas:

Poco nos queda que agregar en cuanto a las propiedades y comportamiento de las saponinas. La importancia de las ya citadas se comprenderá durante el curso del desarrollo del presente trabajo. Así, por ejemplo, la propiedad que poseen las saponinas de hemolizar los glóbulos rojos es la base del método analítico más importante que se posee para el reconocimiento de estos productos, etc. Sobre algunas propiedades se insistirá más adelante en su debido lugar (acción toxicológica, en el capítulo de legislación, etc.)

Añadiremos, para terminar con estas generalidades, que las saponinas se presentan como polvo amorfo, y solo por rara excepción cristalizan como sucede en los casos de la digitonina, alfa-heredina, ciclamina, Jcg saponina⁽¹⁾, etc. Son más o menos higroscópicas, y en forma de polvo irritan la mucosa nasal provocando el estornudo.

.....

(1) L. Kofler, obr. cit. pag. 40
Calatroni, trabajo citado.

Difusión de las saponinas en la naturaleza

Las saponinas fueron descubiertas en el año 1715 por Hermbstadt(1) y a fines del siglo pasado ya Kobert(2) declaraba la existencia de saponinas en más de 400 especies vegetales, distribuidas en cerca de 60 familias de mono y dicotiledóneas, y aún de algunas criptógamas. Schær(3) en el XI Congreso Internacional de Farmacia, realizado en la Haya, en 1911 presentó un trabajo sobre la difusión de las saponinas en el reino vegetal, y en ese trabajo indicaba la presencia de ellas en más de 70 familias, al mismo tiempo que ponía en duda cual fuese el verdadero papel de estos principios glucosídicos en los vegetales, llamando la atención en el siguiente hecho: la presencia simultánea, en muchos casos, de saponinas, con glucósidos cianhídricos.

Mlle. Korsakoff, en 1912, estudiando los granos de la *Lychnis Githago* y en 1920, los ~~antiguos~~ trabajos de Moycho sobre las raíces de saponaria, dicen estos autores que parecen ser las saponinas productos residuales de la vida vegetal, pues se forman "in loco" y no disminuyen en las diferentes fases del ciclo evolutivo de la planta.⁽⁴⁾ Ludwig Kroeber(5), en su trabajo "Distribución de las saponinas en las plantas en los diferentes estados de crecimiento", llega a la conclusión opuesta, y dice, por ejemplo, que en la *Solidago Serotina*, el contenido en saponinas de las hojas crece con el desarrollo de la planta, alcanzando el máximo a la caída de las hojas, etc. En fin, hay que recordar que las saponinas son glucósidos, y no hay por que pensar que no tengan las funciones de tales

(1) Revista Brasileira cit. pag. 479; (2) idem, (4) idem.

(3) E. Schmidt, Tratado de Química Farmacéutica, pag. 980

(5) Chemical Abstracts, 4299 (2), año 1931. Del "Heil-Gewurz Pflanzen 12 131-7 (1930).

Un gran número de autores se ocuparon del estudio y de la extracción de las saponinas de los diferentes vegetales, en las diferentes épocas : Diegart, Rosenthaler, Gmelin, Bucholz, Van Rijn, Weil, Schrader, Boerhave, Bussy, Tromsdorff, Christophsohn, Fluckiger, Korsakoff, Kobert, Kofler, Bley , etc, etc.

Nosotros renunciamos a hacer la historia de la evolución de los conocimientos que se poseen con respecto a las saponinas, por juzgar que no interesa a los fines de este trabajo. Nos limitaremos a citar, a nuestro criterio, aquellos datos de mayor importancia.

Reconocimiento y localización de las saponinas en los vegetales

Rosoli, Kobert, Manausk, Hoffmann, Combes, Mme. Ducher, etc. se ocuparon de esto. Ensayaron para el fin indicado, preferentemente, las técnicas microquímica. (1) Por desgracia, no existen reacciones microquímica que permitan localizar de un modo indudable las saponinas en los tejidos. Se usan para ellos las mismas reacciones indicadas anteriormente, comprobándose entonces la menor especificidad de las mismas al ser aplicadas en los cortes vegetales donde se investiga saponinas.

Las partes vegetales ricas en saponinas, como ser las raíces de Saponaria y de Gypsophyla, ofrecen en la mayor parte de sus células parenquimatosas un líquido incoloro; en cambio, en las células secas de parénquima de la corteza de la madera y de los radios medulares, se observa al microscopio, cuando se hacen preparados en aceite, en glicerina o en alcohol concentrado, la existencia de unas formaciones sólidas y compactas, en el interior de dichas células. Esas formaciones no tienen color ni forma definida, pero, si la preparación se imbe en agua se las ve disolverse poco a poco, y por ulterior agregado de alco

(1) Kofler obr.cit. pag. 84

hol vuelve nuevamente a precipitar. Esos cortes que contienen saponina, dan con el SO_4H_2 , positiva la reacción de Rosoli. Kofler hace notar que para evitar los errores a que puede inducir la presencia de albúmina y de azúcar (reacción de Raspail) hay que tener presente los siguientes hechos: a) En la reacción de saponinas, los colores, al añadir ~~xxx~~ SO_4H_2 , comienzan por el amarillo, siguen con el rojo y concluyen con el violeta; b) En cambio, la reacción de Raspail se inicia con el rojo y termina con el violeta. En una palabra; falta el amarillo.

Rosoli aconseja hacer siempre ensayos comparativos con cortes que contienen saponinas y con otros cortes que contienen mayor o menor cantidad. Pero, a pesar de todas las precauciones, los resultados son siempre muy dudosos.

Hanausck (1) parece que obtiene resultados algo mejores colocando el corte en una mezcla de partes iguales de SO_4H_2 concentrado y alcohol a 96° . Ya sea en frío o calentando suavemente se produce un color amarillo que pasa al rojo y luego al violeta. Añadiendo una gota de Cl_3Fe diluido se produce un precipitado marrón o marrón azulado. Esta técnica, no es otra cosa que la aplicación de la reacción de Lafon ya citada.

Combes (2) sigue otra técnica con la que pretende una mejor localización de las saponinas; Deja el corte 24 horas en una solución de $(\text{OH})_2\text{Ba}$ saturada. De esta manera, donde hay saponina se forma un precipitado de saponina-bario. Luego saca el corte, lo lava varias ve-

(1) Chem. Zeitg. 16, Nº 71 y 72 (1892); L. Kofler, obr. cit. pág 85
(2) Compt. rend. de l'Acad. des scienc. 145, 1431 (1907);
L. Kofler obr. cit. pág. 85.

ces con agua de cal para eliminar el exceso de $(OH)_2Ba$, agrega solución de $Cr_2O_7K_2$ al 10%. De esta forma el cuerpo Saponina-bario se descompone con formación de CrO_4Ba , apareciendo al hacer la observación ^{con} microscópica los cristales amarillos de CrO_4Ba , en el lugar donde se hallaba primitivamente la saponina.

Luft (1) quizá localizar las saponinas bajo el microscopio por el lugar donde se producía la hemólisis cuando se trataban los cortes por sangre defibrinada al 1%, diluida en solución fisiológica. Pero la presencia por un lado, del colesterol del suero sanguíneo, y por otro, de los materiales tanantes del corte, son factores que dificultan la hemólisis. Los materiales tanantes producen una aglutinación de los hematíes que puede observarse a la par que la hemólisis de los glóbulos no aglutinados. La hemólisis comienza por los bordes del corte y es anterior a la aglutinación producida por los materiales tanantes. Luft quiso corregir el inconveniente de estos últimos por adición de un 1% de gelatina a la sangre defibrinada, y además, neutraliza los ácidos vegetales libres con un poco de CO_3HNa . De esta forma la gelatina precipita a los tanantes anulando así su acción aglutinante sobre los eritrocitos. Cuando hay pocos tanantes el método da buen resultado, no así, en cambio, cuando hay poca saponina y mucho de aquéllos, pues el precipitado tanino-gelatina impide el reconocimiento preciso de la hemólisis.

Kofler y Köning (2) preparan un medio-gelatina sangre como se hace en bacteriología. La gelatina lleva un 0,9 % de $ClNa$, la funden a

(1) L. Kofler, obr. cit. pág. 85.

(2) L. Kofler, obr. cit. pág. 86. Del "Unveröffentlichte Versuche".

40° y entonces le añaden la sangre defibrinada al 1%. Una gota de la masa fundida se coloca sobre un porta-objetos y se deja enfriar; entonces, se coloca el corte sobre la gelatina-sangre solidificada y se adapta un cubre. De esta manera aparece solo la hemólisis en aquellos lugares en los que hay células cortadas que contienen saponina. Las células intactas no abandonan su saponina o a lo sumo lo hacen muy despacio, sobre todo, si aún están vivas.

Contenido de saponinas en las plantas

Para orientarse en cuanto al contenido de saponina en las plantas han sido ensayados todos los métodos cuantitativos que citamos en el capítulo próximo (a excepción del del MnO_4K). Debido al carácter de estos métodos, cuya crítica expondremos en su respectivo lugar, los resultados distan mucho de ser concordantes. Más aún, podemos decir, que salvo contadas excepciones, los resultados dados carecen prácticamente de valor. Para corroborar esta afirmación citaremos como ejemplo, el caso de la *Gypsophila paniculata*, la que según el método del bario contiene en su raíz (Kofler y Dafert) un 8½ % de saponina, y en cambio, según determinaciones hechas por otros métodos, tiene el 20 %. Se comprende que el resultado obtenido depende mucho del método seguido, por lo que, antes de dar un número fijo conviene ensayar el vegetal por varios métodos diferentes y ver si se hallan resultados más o menos concordantes, cosa que rara vez sucede.

A pesar de todo, para algunos vegetales se admiten valores que se consideran más o menos buenos, y Blau, en un trabajo publicado en el "Dissert. Zürich 1911." da una tabla, que se halla reproducida en la pag. 83 de la obra de Kofler: "Die Saponine", en la que se indica el

nombre de la planta, su contenido en saponina por ciento, el lugar del vegetal en el que se halla la saponina, y el nombre del autor que hizo la determinación.

Recorriendo dicha tabla, de la que nosotros sacamos algunos valores, se observa que el contenido de saponina en las plantas puede alcanzar cifras muy diferentes oscilando entre números sumamente altos, como en el caso de la *Sapindus utilis*, que tiene un 68,5 % , en sus semillas, según Gastine, y valores mucho más bajos como en el caso de las semillas de la *Camelia Theifera*, estudiada por Weil, y el caso de las hojas y las raíces del *Arum maculatum*, estudiadas por Chanliagnet, que contienen respectivamente un 0,05 grs % y 0,10 grs % de saponina.

A continuación damos otros valores, para otras plantas, sacados de la tabla de Blau. Se citan estos ejemplos porque en el curso del presente trabajo algunas de esas plantas se mencionan con bastante frecuencia:

Plantas	Porcentaje de saponinas	Parte del Vegetal	Autor
<i>Sapindus utilis</i>	68,5 %	semilla	Gastine
" "	50 %	pulpa del fruto	"
<i>Cereus gummosus</i>	24 %	toda la planta	Heyl
<i>Panax repens</i>	20,8 %	rizomas	Rosenthaler
<i>Gypsophila paniculata</i>	20 %	raíz	Kofler y Duff
<i>Aesculus hippocastanum</i>	13 %	semilla	E. Laves
Njuju (Deutsch-Ostafrika)	10,5 %	fruto y semilla	Schaer
<i>Sapindus Mukorossi</i>	10,5 %	cáscara del fruto	Weil
<i>Aesculus Hippocastanum</i>	10 %	cotiledones	"
<i>Samuelia carnerosana</i>	10 %	fruto	Blach y Kelly
<i>Chamaelirium luteum</i>	9,52 %	raíz	Kruskal
<i>Illipe latifolia</i>	9,50 %	cotiledones	Weil
<i>Yucca gloriosa</i>	8-10 %	Abott
<i>Quillaja saponaria</i>	8,7 %	corteza	Christophson
<i>Agrostemma Githago</i>	8,17 %	semilla	Kruskal y ^{Kofler}
<i>Sapindus saponaria</i>	6,13 %	pulpa del fruto	Kruskal
<i>Saponaria officinalis</i>	5,09 %	raíz	Christophson

Verbascum cinuatum	6,13 %	frutos	Rosenthaler
Acacia concinna	5 %	pulpa del frt.	Weil
Primula officinalis	5 %	rizomas y raíz	Kofler
Polygala Senega	2,4 %	raíces	Christophson
Sarsaparilla-Droga	1,31-3,29 %	raíces	Otten
Saponaria officinalis	2,10 %		
Sapindus saponaria	0,17 %	corteza	Pekolt
Arum maculatum	0,10 %	Hojas y raíz	Chaniagnet
etc....			

Las saponinas de la zarzaparrilla:

Ya hemos dicho anteriormente que en un mismo vegetal pueden hallarse más de una saponina. A lo menos, ya Schulz, en 1892, había establecido con sus estudios sobre la raíz de zarzaparrilla la existencia de tres glucósidos del grupo de las saponinas, en dicho vegetal.

Extraemos de la publicación hecha en el ~~Journal~~ "Journal de Pharmacie et de Chimie", tomo 9º (noveno), 1914, pag. 290-93, el siguiente resumen sobre la composición de la raíz de zarzaparrilla;

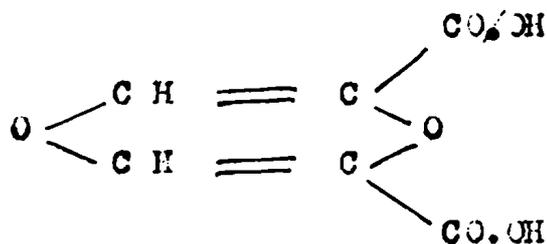
Según Schulz, la raíz de zarzaparrilla contiene tres glucósidos del grupo de las saponinas: 1º) La parrillina (Pabsta, 1824 y Flückiger, 1877 o Smilacina de Berzelius (1826), principio cristalizado, levógiro, casi insoluble en agua, funde a 176º, de fórmula $C_{26}H_{44}O_{10}, 2H_2O$; 2º) La Smilasaponina o Smilacina de Merck, levógira, amorfa, soluble en agua y de fórmula $(C_{20}H_{32}O_{10})_5, 12H_2O$, y, 3º) La zarzaponina, levógira, cristalizada, funde a 220-226º, fácilmente soluble en agua, de fórmula $(C_{22}H_{36}O_{10})_{12}, 24H_2O$.

En la citada publicación no se dice de una manera terminante con que liliácea del género Smilax (que es de donde provienen las zarzaparrillas comerciales, y especialmente, de las de Méjico, Jamaica y Honduras (1)) se ha hecho la investigación, pero, más adelante habla de la Smilax ornata, Hooker (zarzaparrilla de Jamaica).

(1) J. Herail; Materia Médica. Farmacografía. 1911. 2ª edit. pag. 446-53.

La Smilax ornata fué luego estudiada por Power y Solway y dichos autores opinan que de las zarzaparrillas, en general, no se puede extraer más que un solo glucósido del tipo de las saponinas, el cual cristaliza y tiene en general las propiedades de la zarzaparrillina, de Schulz. Dichos autores agregan que la smilosaponina y la parrillina no son otra cosa que zarzaparrillina mezclada con otros productos, es decir, más o menos pura.

Power y Solway identificaron además en la zarzaparrilla de Jamaica los siguientes productos: un fitosterol (alfa-glucosídico) C₃₃H₅₆O₆, un sitosterol C₂₇H₄₆O, un stigmasterol C₃₀H₅₀O, una dextrosa, E03K, ~~xx~~ ácido behénico C₂₂H₄₄O₂, ácido oleico, ácido linoleico, y un ácido bibásico, el ácido sarzápico, que cristaliza en agujas incoloras, funde a 305°, y para el que dichos autores proponen la siguiente fórmula, derivada del pirano:



Citamos estos trabajos porque existen unas bebidas a base de zarzaparrilla, cuyo uso es permitido por nuestra legislación bromatológica. Diremos, de paso, que estas bebidas no tienen gran consumo y que las fabrican también con sazafrán.

En conclusión, nos interesa lo siguiente: Ya sean tres, según Schulz, o una, según ~~Klein~~ Power y Solway, queda establecido de una manera categórica la existencia de productos saponícos en la raíz de zarzaparrilla.

Algunos vegetales glicirrícicos y sapónicos más conocidos.

Nos referimos a continuación a las principales plantas de uso médico y farmacéutico que contienen espumígenos. Volveremos, en parte, sobre la cuestión planteada anteriormente de la existencia de más de una saponina en los vegetales o no, haciendo la numeración, en cada caso, de los productos glucosídicos que hay en cada una de las plantas consideradas. Indicaremos, además, la composición química, el origen y el uso de cada planta citada.

Se ha tomado como fuente bibliográfica, la: "Materia Médica, Farmacografía" de J. Herail, II^a edición, 1911, págs. 446-55.

Familia de los glicirrícicos:

	Raíz de las Glycyrrhizas	glabra echinata glandulifera aspérrima hirsuta
Se halla glicirricina en los siguientes vegetales	Raíz del Abrus precatorius (liana o regaliz de América)	
	Raíz del Astragalus Glycyphyllos.	
	Raíz del Ononis spinosa (gatuna)	
	Raíz del Trifolium alpinum (es el trébol de los Alpes y al producto se le llama regaliz de montaña)	
	Rizomás del Pulypodium vulgare (da el regaliz de los bosques)	

De todas las drogas con glicirricina la más importante es la raíz de regaliz que se obtiene a partir de la Glycyrrhiza labra, planta que crece en las regiones cálidas de Europa y del Asia Oriental. Se cultiva sobre todo en Sicilia y en Calabria, y en Francia, España y el resto de Italia.

La Glycyrrhiza echinata, que crece en la Apulia, tiene los mismos usos que la G. labra, y hoy se usa poco. No debe ser confundida con la G. glandulifera, que crece en la Europa Meridional, pero más hacia el Este y así se halla extendida en Hungría, Rusia Central Y Meridional, Turquistán, Asia Menor, etc.

Con las hojas de la G. aspérina preparan los kalmucos una bebida refrescante.

Herail, describe en su obra tan solo la variedad labra de la que dice que tiene de un 20 a un 30 % de almidón, un aminoácido: la asparagina (2,4%), goma, glucosa, sacarosa y un cuerpo muy azucarado, de estructura amorfa, que se llama glicirricina o ácido glicirricínico, al que da la fórmula $C_{44}H_{64}O_{19}$, y el que, por hidrólisis, fija dos moléculas de agua, dando: glucosa, ácido ~~glicirricínico~~ glicurónico y ácido glicerritínico ($C_{31}H_{47}O_5 \cdot CO_2H$).

La glicirricina tiene usos farmacéuticos e industriales pero se usa preferentemente al estado de su sal sódica o amónica. Como dice Moeller y Thoms en la Enciclopedia Completa de Farmacia, II edición, tomo VII, págs. 71-73, las preparaciones a base de glicirricina tienen el inconveniente de que dan un sabor dulce empalagosa a las bebidas, y que, además, precipita la glicirricina de las soluciones fuertemente acidas de los jugos de frutas. El doctor Hoffmann subsanó este último inconveniente extrayendo del regaliz un espumante sin glicirricina e inalterable por los ácidos (patente 240.035; ver la Enciclopedia citada).

Familia de los saponicos:

Herail describe en el libro ya citado; La Polígala de Virginia, la Zar-

zarzaparrilla de Méjico, la corteza llamada de Panamá y la raíz de Saponaria.

La Polígala de Virginia no es más que la raíz de la Polígala Senega, que crece en los lugares arenosos de la América del Norte (Canadá y Carolina del Norte). Lleva un aceite graso (3,70-4,30%), resinas, es-

terinas, ésteres, ácido salicílico libre (0,06%), azúcar, pero lo a nosotros nos interesa es la existencia de una saponina libre en dicho vegetal la seneguina, y de un segundo glucósido no bien estudiado.

La seneguina, por hidrólisis, fija dos moléculas de agua dando una de seneguenina más dos de glucosa.

La seneguina tiene aplicaciones terapéuticas; se prescribe así, para ciertas afecciones, el jarabe de polígala.

Las zarzaparrillas, cuyas variedades comerciales ya han sido indicadas, lo mismo que su constitución, crecen en las regiones cálidas de ambas

Américas, desde Méjico hasta el Amazonas, especialmente en Venezuela, Tampico, Veracruz y Brasil. Herail, que admite la existencia de tres saponinas diferentes en la zarzaparrilla, dice que talvez las tres sean activas. Tienen usos medicinales.

La llamada corteza de Panamá procede de la corteza de la Quillaja saponaria, árbol de la familia de las rosáceas, originario de Chile y extendido en toda la América tropical. Lo notable es que lleva tres glucósidos; uno de naturaleza ácida, llamado ácido quilláico; uno neutro, la saponina, y la sapotaxina. Todos son hidrolizables con formación de un hidrato de carbono y saponina. Existe, además, un hidrato de carbono particular, la lactosina: C₃₂ H₆₂ O₃₁, H₂ O.

En farmacia se usa como sucedáneo de la raíz de polígala, porque no es tan desagradable; la tintura de quillaya sirve para emulsionar las sustancias resinosas; de la corteza se extraen saponinas, y además, se usa para el blanqueado de fibras.

La raíz de Saponaria proviene de la Saponaria officinalis, que crece en los lugares húmedos de la Europa templada. Lleva una sáponina de fórmula $C_{32}H_{54}O_{18}$, que por hidrólisis fija dos moléculas de agua dando tres de glucosa y una de sapogenina. Tiene aplicaciones médicas y su tintura alcohólica, puede servir, lo mismo que la de quillaja, para emulsionar sustancias oleosas o resinosas.

Para completar extraemos de la Enciclopedia Completa de Farmacia, de Moeller y Thoms, segunda edición, tomo 7, pág. 71-73:

"Los espumantes de saponinas se preparan generalmente a base de la corteza de quillay, y circulan en el comercio con los siguientes nombres: crema de goma, muselina de goma, gonalina, cremolina, espuma talina, licol, etc. Las saponinas dan un sabor picante a las bebidas, el que se disimula por agregado de otros productos. En la industria debe tenerse presente que no es indispensable añadir saponinas a las limonadas efervescentes."

Del mismo libro, y de la misma cita, sacamos: "Usos: para lavar cuando el jabón puede dañar el color del tejido, se emplea corteza de quillay, palo de jabón, herniaria y otras sustancias de saponinas; para pastas dentífricas, aguas de lavado para la cabeza, para mejorar la calidad de ciertos jabones, etc."

Se ve que los usos de los espumígenos son múltiples.

Algunos alimentos vegetales con saponinas.

En muchos vegetales que se usan corrientemente en la alimentación, o que están relacionados con ella de un modo más o menos directo, existen saponinas. Este hecho es de enorme importancia para el bromatólogo, en el momento en que se ve en la necesidad de legislar.

Kobett se ocupó mucho de la búsqueda de las saponinas en los alimentos

y hay un resumen de sus trabajos en el libro "Die Saponine", de Kofler pag. 224, donde a la vez se hallan indicadas las memorias originales; el rol de las saponinas en estos alimentos es enteramente secundario por cuando actúan solo como condimento (excitantes de las glándulas salivales, mucosas estomacal e intestinal, etc.). Parece, que en esas condiciones las saponinas facilitan la reabsorción; está probado que los alimentos, lo mismo que los tóxicos, por adición de saponinas atraviesan más rápido la barrera intestinal, sobre todo, si hay sales de calcio en presencia. Así se han hecho ensayos con saponina, azúcar y sales de calcio, en animales; y se ha comprobado que el azúcar en estas condiciones pasa más fácilmente a la sangre. Ahora bien, debe tenerse presente ~~que~~ que esto vale para las saponinas ensayadas en el laboratorio, pero, no hay ningún derecho a afirmar que las saponinas que se hallan en los alimentos produzcan la misma acción al ser ingeridas.

Kobert ha hallado dos saponinas en la remolacha; una neutra y otra ácida. La neutra sería igual a la glicuronóidea, aislada por Smolensky de los residuos de una fábrica de azúcar de San Petersburgo. Es una saponina muy activa, que hace perder el conocimiento y mata a los peces, aún en diluciones de 1 en 160.000 y 1 en 170.000; su índice hemolítico es 50.000 con casi todas las sangres, pero con glóbulos lavados de alrededor de 100.000; además, tiene una acción notable sobre el corazón ~~aislado~~ aislado. Precisamente, la existencia de saponinas, es lo que hace que el jugo de remolacha produzca una espuma persistente, cuando, por ejemplo, se hace burbujear en él una corriente de C O₂.

En las zanahorias de la alimentación halla Blanchard(1) dos saponinas
 (1) E. Blanchard, in Kobert, Neue Beitr. I, S. 126.

una ácida y otra neutra. La primera es análoga a la correspondiente a la remolacha, y es más abundante que la otra. Ambas saponinas se hallan repartidas en todo el vegetal. Sostiene Blanchard que los ^{alimentados} hervíboros con zanahorias no sufren trastornos mayores porque su flora intestinal hace fermentar primero, y destruye luego las saponinas, acción esta última que se extiende también a la mayor parte de las sapogeninas.

Pero hay un hecho importante: Durante la guerra, época en que se hizo en ciertos países de Europa gran consumo de remolachas y zanahorias, se vio que aún el uso regular de estos productos produce perturbaciones en la salud.

Kobert demostró la existencia de saponinas en las espinacas: *Spinacia oleracea*, *Atriplex hortensis*, *Chenopodium Bonus Henriques*, *Tetragonia Expansa*, *Glytonia cubensis*, *Basella alba*, *Phytolacca esculenta*, *Amarantus oleraceus*, *Talinum paniculatum*, etc.

Una planta oriunda de los Andes, la "Abisneide", tiene según Kobert un poco de saponinas en las semillas. Esta planta es empleada por los nativos en la alimentación.

Quedan citados los alimentos vegetales más conocidos que llevan saponinas.

Indices de plantas con saponinas:

Existe un índice de plantas con saponinas, que tiene como base el cuadro de Rosenthaler, de la Real Enciclopedia de Farmacia, y completado con datos de Waage, Frieboes, Czapek y Luft, ~~1911~~ y que se halla reproducido en el libro "Die Saponine", de Kofler, pág. 7-40. No lo reproducimos por su extensión excesiva. En dicho cuadro, que consta de 4 columnas, se hallan: el nombre de la planta, la parte del vegetal donde está la saponina, el nombre y la fórmula de la saponina, y la literatura respectiva.

Además, en nuestro país existe un interesante trabajo publicado por el Instituto de Botánica y Farmacología, de la Facultad de Ciencias Médicas de Bs. Aires. Dicho trabajo se denomina: "Contribución al estudio de la composición química de las plantas argentinas". Consiste en: "investigaciones fitoquímicas en plantas indígenas o naturalizadas", y ha sido realizado por los Drs. Juan A. Dominguez, José F. Molfino, y Emilia L. de Gallelli. Existen dos ediciones; la segunda, que es la más completa, fué editada por la Casa Peuser en el año 1928. y contiene cinco series de plantas estudiadas con indicación de la especie, el nombre de la planta, la época de recolección, la procedencia y la presencia de: cianoglucósidos, saponinas, alcaloides, oxidasas, peroxidasas, otros principios, bibliografía y observaciones. Se indica de una manera cuantitativa, a grosso modo, la cantidad de saponina cuando la tienen. Es un trabajo muy extenso, 635 plantas estudiadas, razón por la que no lo reproducimos; por otra parte, entendemos que no tendría objeto.

En la pág. 259 de la obra "Die Saponine" de Kofler, existe un índice de saponinas; obtenidas más o menos puras. Se indica el nombre de la planta madre, es decir, el nombre de la planta de la que provienen y toda la literatura al respecto. Es un índice relativamente largo, y, a su vez, según Kofler, ha sido en parte extractado del cuadro hecho por Kobert y publicado en el "Biochemisches Handlexikon de Abderhalden," tomo 7, pág. 145. 1912. Berlín (J. Springer).

Hay saponinas de origen animal?

En realidad, la pregunta queda contestada recordando la definición dada para las saponinas: "Son productos glucosídicos vegetales". Pero,

Frieboes aisló más tarde del suero sanguíneo de los animales y de hombre un producto de propiedades análogas a las saponinas: acción hemolítica, fuerte poder espumante, toxicidad, etc. Faust aisló del veneno de cobra un cuerpo que llamó ofiotoxina y lo consideró como una saponina animal. Este término, saponina, que tantas veces hemos citado, se debe a Robert quien propuso esa denominación para todas aquellas saponinas que respondían a la fórmula $C_{17}H_{26}O_1$; luego, él mismo abandonó esa idea. Ahora bien, la ofiotoxina de Faust carece de fracción hidrocarbonada, es curarizante (lo que no sucede con las saponinas), y en pocas palabras, se aleja un poco del grupo de los saponícos.

Luego, diremos, que no hay saponinas animales.

Citamos estos hechos solo a título ilustrativo.

Bibliografía: L. Kofler, obr. cit. pag. 6-7; del "Dtsch. Med. Wochenschr" 1914, Nº 12 (W. Frieboes); y del: Arch. f. exper. Patho u. Pharmacol. 56, 236 (1907).

Calatroni: "Bioquímica de Saponinas", trabajo ya citado.

.....

PARTS II

Fundamentos y ejecución de los métodos analíticos propuestos para la investigación de las saponinas

Me ocuparé de los métodos químicos, cualitativos y cuantitativos, de los métodos bioquímicos y de algunos conceptos introducidos por los autores modernos. Los métodos se aplican una vez a soluciones acuosas puras, otras a bebidas, a emulsiones, etc. En cada caso detallo el método tal como lo anuncian los respectivos autores y acompaño cada método de un comentario donde expongo los inconvenientes que he hallado en su ejecución, haciendo la crítica del método y permitiéndome, en algunos casos, hacer ciertas indicaciones, que a mi juicio, simplifican la búsqueda de las saponinas o subsanan las deficiencias del método.

MÉTODOS QUÍMICOS

Diré ante todo que los métodos químicos son susceptibles de ser combinados entre sí, cosa que se hace frecuentemente, y también con el hemolítico. Sin embargo, trataré en este capítulo, de exponer las cosas de tal modo que no se pierda de vista la fase química del problema, limitándome solo a indicar en qué casos conviene completar con un ensayo hemolítico.

MÉTODOS CUALITATIVOS

Método de Rosenthaler(1)

A la solución a investigar se le añade HCl hasta que alcance una concentración del 2,5 %. Si se forma algún precipitado, se separa por fil-

(1) L. Rosenthaler, Zeitschr. Unters. d. Nahrungs. u. Genussm., 25, 154 (1913)
 L. Kofler, "Die Saponine", pág. 79.
 Chemical Abstracts 7:1558.
 Manuel Suisse des Denrées Alimentaires, 3ª edit. 1919, Berne, pág. 18.
 Revista da Sociedade Brasileira de Química, anno II, nº 10, Dezembro 1931, pág. 463 (Contribuição á Pesquisa das Saponinas, por Oswaldo de Almeida Costa).

tración . El filtrado se calienta a baño maría hasta que no se produzca más espuma por agitación. El líquido se extrae con la mitad de su volumen de éter acético. La emulsión se rompe con un poco de alcohol.

Se separa el extracto etéreo-acético y se lava repetidas veces con porciones de 5 a 10 cc. de agua destilada, hasta eliminar todo el HCl que pudiera haber pasado a él (controlar los líquidos acuosos con NO_3Ag ; el último ^{líquido de} lavado no debe acusar precipitado con dicho reactivo) Cuando todo el HCl fué eliminado se lleva a sequedad la capa etéreo-acética, en la que ha pasado la saponina. Si la solución resultase coloreada debe procederse, antes de llevar a sequedad, a la decoloración con carbón animal.

Sobre el residuo, dividido en dos partes, se hacen estas reacciones:

- 1ª) Con SO_4H_2 ; sucesión de colores que rematan al final en el violeta;
- 2ª) Disolver la otra porción del residuo en CO_3Na_2 (solución) y observar si por agitación se produce espuma persistente.

Comentario;

Hice numerosos ensayos con soluciones acuosas con saponinas al 0,2% y al 0,1%, de las marcas Poulenc y Merck; además, ensayé en bebidas artificiales que yo mismo he preparado con: agua, CO_2 , sacarosa, ácidos tártrico o láctico, y un colorante, que era caramelo o carmín XL. Los métodos siguientes los ensayé con las mismas bebidas, estudiando, además, en cada caso, la influencia de cada componente por separado cuando están en presencia de saponina, y haciendo los respectivos ensayos en blanco. Luego ensayé en vinos, x blancos y tintos, y en sidras a los que previamente yo mismo les había añadido saponinas. El método de Rosenthaler aplicado a los líquidos que acabo de enunciar, me ha sugerido las sig-

guientes observaciones:

la hidrólisis para liberar la prosapogeninas, pues para éso es el tratamiento con HCl, es sumamente larga y penosa ; tarda una tres o cuatro horas en producirse, y no es fácil precisar el momento en que termina. Algunos colorantes , como sucede con el caramelo, son de difícil eliminación; en estos casos he usado carbón activado y así mismo no he logrado eliminarlo del todo. Por otra parte , no conviene abusar del uso de los decolorantes a base de carbón, por qué éstos fijan parte de las saponinas y en los casos en que éstas están en pequeñas cantidades la decoloración puede resultar una operación peligrosa.

No he podido obtener en ningún caso resultado satisfactorio con la reacción del CO_3Na_2 , que yo remplazo por la del KNO_3 , de la que ya he hablado anteriormente. En cambio, la reacción del ácido sulfúrico me ha dado muy bien el color violeta; pero, tiene dos inconvenientes:

1ª) Con glicirricina, da lo mismo finalmente un color violeta aún que al principio los colores difieren un poco, pero, yo no me atrevería a pretender establecer una diferenciación entre saponinas y glicirricinas por medio de esta reacción.

2ª) Además, cuando hay cantidades relativamente grandes de azúcares en el medio, pasan al éter acético unos productos, tal vez furfurólicos, los que luego al llevar a sequedad el residuo y añadir SO_4H_2 producen una brutal carbonización que impide ver totalmente el color violeta que debe formarse cuando hay saponinas.

Pensé, entonces, subsanar este inconveniente por eliminación ^{de la sacarosa} previa, en el líquido original, con cal viva, pero no he logrado resultados buenos ni seguros por este camino por que, sin duda, se produce también una pro

cipitación de la saponina con la cal, análogamente a lo que sucede con el bario, la magnesia, etc. Además, aún en el caso de que hubiera obtenido buenos resultados, siempre sería un recurso de aplicación restringida pues otros azúcares, como la glucosa o levulosa, no hubieran podido ser eliminados de esa manera. Entonces ensayé eliminar previamente el azúcar, por tratamiento del líquido original, con una levadura. Usé una levadura comercial que me facilitó el Dr. Pontin, llamada "levadura virgen", que se extrae de los cereales. Dicha levadura, además de hacer fermentar los monosacáridos, lleva una invertasa lo que hace innecesaria la hidrólisis previa de la sacarosa. Los ensayos en blanco demuestran que por sí sola la levadura citada no da reacciones de saponinas; y en presencia de esta última los ensayos dan resultados satisfactorios. Para producir la destrucción del azúcar dejé el líquido con la levadura uno o dos o tres días a la temperatura ordinaria, filtro a través de un papel de malla pequeña procurando que el líquido pase lo más límpido posible y luego en el filtrado hago lo que indica el método.

Queda ya dicho que cuando hay glicirricina se obtienen resultados muy semejantes al caso de la saponina. Se debe a que la glicirricina es también extraída por el éter acético. Luego con el SO_4H_2 la glicirricina me ha dado una gama de colores que comienzan en el amarillo y terminan en el violeta; el color amarillo desaparece por dilución.

En una palabra, la diferenciación de la glicirricina de la saponina por medio de la reacción del SO_4H_2 no es posible.

Opino que el Método de Rosenthaler, por sí solo, no es suficiente para afirmar o negar la presencia de saponinas, y aconsejo completarlo con ensayos hemolíticos con una porción del residuo, que a su vez puede

purificarse mediante tratamiento por disolventes adecuados; es conveniente que el disolvente solubilice las impurezas y no las saponinas, pues así, la pérdida de estas últimas es mínima.

A pesar de todos los inconvenientes señalados este método es sin duda el mejor de todos los métodos químicos propuestos, pero, eso sí, no es suficiente para afirmar o negar la existencia de saponinas en una bebida.

Este método ha sido aplicado también a la búsqueda de saponinas en las cervezas. En estos casos, su autor aconseja tomar 100cc. de cerveza y añadirle igual volumen de alcohol a 95°; se calienta, con refrigerante a reflujo, hasta que se produzca un precipitado floconoso. Se filtra, se elimina el alcohol por destilación y luego se continúa como indica el método.

El método de Rosenthaler lo he aplicado, además, a extractos de quilla y a infusiones de yerba mate. En ambos casos las reacciones del ácido sulfúrico y del permanganato de potasio me han dado resultado positivo. Hay, entonces saponinas en la yerba mate? Como el método hemolítico aplicado a las infusiones de yerba mate no me ha dado resultados positivos, me inclino más bien a creer que la coloración que se obtiene con el SO_4H_2 , se debe a las resinas del vegetal y no a la presencia de saponinas. Además, me inclina a esta suposición, el mismo carácter de la espuma que producen las infusiones de yerba al ser agitadas; es una espuma muy poco persistente.

Es de notar, que con el SO_4H_2 en el caso de la yerba se obtiene, más que un color violeta, una nítida coloración azul, la que pasa previamente por el rojizo y por el violeta,

X Método de Brunner - Rühle (1)

EN el caso del agua de soda y de los productos que contienen ácidos orgánicos o minerales, (aún CO_3H_2), a 100 cc. del líquido en exámen se le añaden un exceso de CO_3Mg para neutralizar. Si hubiera dextrinas presentes, como en el caso de los licores demalta, será necesario eliminarlas para lo que se concentrarán 100 cc. del líquido hasta un volumen de 20 cc. y luego se añadirán 150 cc. de alcohol a 96°; se agita bien y se deja reposar 30 minutos, luego se calienta a ebullición a baño maría y se filtra en caliente. El filtrado se diluye con un poco de agua destilada y se desalcoholiza llevando finalmente la solución a 100 cc.

Luego a los 100 cc. del líquido neutro y libre de dextrinas se les pasa a una ampolla de decantación donde se le añaden 20 gr. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 9 gr. de fenol, agitando fuertemente. El $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ tiene por función favorecer la separación de las capas acuosa y fenólica.

Cuando las capas han decantado bien, se pasa la capa fenólica, donde la saponina queda disuelta, a otra ampolla de decantación y allí se le añaden 50 cc. de agua y 100 cc. de éter. Se agita fuertemente dejando luego separar las dos capas; es conveniente añadir unos cuatro cc. de alcohol para romper la emulsión.

Teóricamente sucede lo siguiente: la solución fenólica de saponina se destruye, pasando la saponina al agua y el fenol al éter.

(1) J. Rühle, Zeitschr. Unters. d. Nahrungs. u. Genussm. 16, 165 (1908); 23, 566 (1912) 27, 192 (1913). K. Brunner, la misma publicación, 5, 1197 (1902)

L. Kofler, "Die Saponine", pág. 74.

Chemical Abstracts, 2: 3249 (1).

Spica; "Riassunto delle legioni di Chimica Bromatologica", 3ª edit. 1928-Padua-pág. 82.

Leach; "Food Inspections and Analysis", 4ª edit. pag. 1015-17.

O. de Almeida Costa, "Contribuição a Pesquisa das Saponinas", Rev. da Soc. Brasileira de Química, anno II, Nº 10, Dezembro 1931, pág. 482.

Se separa la capa acuosa y se lleva a sequedad por evaporación a baño maría. Rühle aconseja purificar el residuo, previamente bien seco, por tratamiento con acetona. luego, en dicho residuo se investigan las saponinas; aconsejan, en aquellos casos en que el residuo va a ser purificado por tratamiento con acetona, no llevar la solución a sequedad a baño maría sino concentrarla hasta pequeño volumen y luego terminar la deshidratación en desecador; sobre el residuo investigan las saponinas con los siguientes reactivos: SO_4H_2 , con reactivo de Fröhde, y la prueba de la espuma disolviendolo en agua o en agua alcalinizada.

Más tarde, el mismo Rühle ha aconsejado completar el método con un ensayo hemolítico para lo que disuelve un decígramo del extrato en 25 cc. de solución fisiológica, filtra, y en este líquido hace los ensayos hemolíticos (Ver en Leach, cit. ya indicada, la bibliografía especial)

Comentario:

He observado que la separación de las capas fenol-líquido madre es sumamente dificultosa y requiere a veces hasta más de 24 horas; no así, en cambio, la segunda decantación que indica el método.

Además, pasan al fenol una serie de cuerpos extraños a la saponinas como ser colorantes, etc. pues luego la capa acuosa que se obtiene al seguir el método resulta muy coloreada. Esas capas acuosas coloreadas las he ensayado decolorar con carbón animal y con carbón activado, pero nunca son del todo satisfactorio los resultados. Además, por lo que ya queda dicho, no conviene abusar del carbón.

La capa etérea que se obtiene al final, donde ha pasado el fenol de la solución fenólica de saponina, he constatado que retiene mucha saponina.

Resumiendo, diré que las desventajas de este método son las siguientes:

1º) Pasan al fenol, junto con la saponina, una gran cantidad de cuerpos ajenos a ellas pero que luego son abandonados al agua junto con ellas, de modo que se obtiene un residuo muy impurificado.

2º) La purificación del residuo no es cosa sencilla. Aconsejo, participando del criterio de Rühle, purificar dicho residuo con acetona, y de una manera general con disolventes que no solubilicen las saponinas y sí las impurezas. Un químico brasileño, Nazareth de Campos (1), sigue en cambio una dirección opuesta en la purificación del residuo por cuanto lo purifica con hidrato de bario; en realidad, no lleva a sequedad sino que concentra hasta pequeño volumen (25cc.) y de allí precipita la saponina con $(OH)_2Ba$, en solución saturada; el precipitado saponina-bario lo suspende en agua destilada y lo descompone por medio de una corriente de CO_2 , filtra para separar el CO_3Ba formado, y en el líquido que pasa queda la saponina. Con este líquido repite dos veces el tratamiento señalado. Al final, el líquido obtenido después del tercer tratamiento con $(OH)_2Ba$, lo lleva a sequedad y como contiene aún un poco de CO_3Ba , que proviene $(CO_3H)_2Ba$ que pasó soluble, lo purifica todavía tratando varias veces con alcohol caliente que disuelve las saponinas y no el CO_3Ba . Este sistema de purificación del residuo no solo tiene la desventaja de ser sumamente largo, sino, que, además, debido al gran número de veces que hay que solubilizar y precipitar las saponinas se producen pérdidas apreciables de ellas. Por todas estas razones creo más conveniente, purificar el residuo empleando todos los disolventes que se crean oportunos, siempre que no disuelvan las saponinas. Es decir, usar solo disolventes para las impurezas.

(1) Rev. Brasil, citada al comienzo, pág. 482,

3) Quedan en la capa etérea, junto con el fenol, apreciables cantidades de saponinas.

4ª) Con glicirricina he comprobado que se obtienen los mismos resultados que con las saponinas, o a lo menos, tan parecidos que no es posible diferenciarlas.

Creo, en síntesis, que el método de Brunner-Rühle es inferior al de Rosenthaler. Esta opinión es también la que los químicos brasileros se han formado del método.

Método de Halberkann (1)

Extrae directamente con fenol. Hace dos extracciones; una primero con 10 cc. y otra con 5 cc.

En cada caso deja decantar las capas perfectamente y luego las refina y las priva del agua, ya sea por centrifugación o por tratamiento con SO_4Na_2 anhidro.

Luego trata las capas fenólicas por una mezcla de volúmenes iguales de agua y éter. Sucede lo mismo que en el método anterior; la saponina va al agua y el fenol al éter.

Se separa la capa acuosa, se lleva a sequedad y luego, sobre el residuo se hacen reacciones de saponinas, como en los métodos anteriores.

Comentario:

Tiene los mismos defectos que el método de Brunner-Rühle; la capa acuosa, queda sobre todo muy coloreada. He ensayado degolorarla con carbón animal.

Además, con glicirricina da los mismos resultados que con saponinas. Creo, en síntesis, que el método no es aconsejable.

(1) L. Kofler, "Die Saponine", pág. 74; cita sacada de "Dtsch. Mineralwasserfabrik.-Ztg.", 1912, N. 25 bis 30. Nach. Chem. Zentralbl. I, 1913, I, 852/353.

Método de Carlinfanti y Marzocchi (1)

Se emplea para reconocer saponinas en las emulsiones de aceite; 100 cc. de la emulsión se diluyen con igual volumen de agua, añadiéndole luego poco a poco 400 cc. de alcohol concentrado, teniendo la precaución de ir agitando a medida que se añade el alcohol. Se deja 24 horas. De esta manera decantan ambas capas, luego se separa la capa acuosa, que conviene filtrar a través de un lienzo, para que quede bien limpia. Sobre el residuo aceitoso se hace una nueva extracción con alcohol de 60 a 65° y se repiten las operaciones indicadas anteriormente. Los filtrados acuosos reunidos se neutralizan con CO_3Na_2 y se concentran a baño maría hasta eliminar el alcohol. Luego, los líquidos acuosos privados de alcohol se tratan con éter para extraer los productos aromáticos que pudieran impurificarlos, y, más tarde se le añaden unos gramos de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y de fenol, aconsejando los autores, que a partir desde este momento se siga con el líquido acuoso el Método de Brunner-Rühle.

Comentario:

Ensayé este método con emulsiones de aceite de oliva y la separación de la saponina de la emulsión me ha dado, en general, buen resultado. No creo, en cambio, conveniente seguir el Método de Brunner-Rühle, como aconsejan los autores. Por razones que no es del caso repetir me parece más conveniente el de Rosenthaler y luego dividir el residuo obtenido, después de purificarlo, en dos partes; con una de ellas, hacer ensayos hemolíticos, y con la otra, hacer las reacciones cromáticas más usuales.

(1) L. Kofler, "DIE SAPONINE" /pág. 75; cita sacada de: F. Carlinfanti y P. Marzocchi, Boll. Chim. Farm. 50, 609 (1911).

Le he encontrado dos dificultades más a este método:

1º) La emulsión del aceite en agua no es fácil de eliminar. He ensayado romperla por filtraciones sucesivas sin resultado, luego por centrifugación obteniendo resultados algo mejores pero no del todo satisfactorios. Entonces, aprovechando la propiedad que poseen las saponinas de ser insolubles en los disolventes orgánicos de los lípidos, traté la emulsión por una cantidad apropiada de éter obteniendo un espléndido resultado: el aceite emulsionado se disolvió en el éter, y la saponina quedó en el capa acuosa.

2º-) Con emulsiones aceitosas que lleven glicirricina las cosas suceden de idéntica manera que en el caso de las saponinas, luego, no es posible diferenciarlas.

Método de Vamvakas (1)

La cantidad de saponina contenida en la bebida, dice el autor, debe ser alrededor de 0,5 grs. Se diluye a dos litros, se añade subacetato de plomo, con lo que precipita la saponina. Se filtra, se lava el precipitado, y luego se suspende en agua y se descompone por medio de una corriente ^{de} SH₂. Se filtra para eliminar el SPb, y el filtrado, en el que se halla la saponina, se hierve a ebullición para eliminar el exceso de SH₂. Si se separase azufre se separa por filtración. Luego, con agua destilada se diluye dicho filtrado hasta un volumen total de 200 cc. Se hacen, entonces, los siguientes ensayos:

1º) 10cc. de ese líquido, se calienta a ebullición y se añaden 5 cc. de Reactivo de Nessler. En presencia de saponina se forma de inmedia

(1) A. Lübeck, Pharm.Ztg. 53, 532
Chemical Abstracts 3: 84.

un precipitado gris.

2º) 10 cc. de la solución se llevan a ebullición, luego se enfrían a unos 40º y se añaden 5 cc. de Reactivo de Nessler: se forma al principio un color amarillo, y luego un precipitado del mismo color que pasa más tarde al naranja, y al verde grisáceo.

3º) 10 cc. de la solución, en frío, se le añaden 5 cc. de Reactivo de Nessler: el líquido se pone amarillo y al cabo de un tiempo aparece un precipitado amarillo permanente.

Comentario:

Este método precipita la saponina al estado de su combinación plúmbica, pero, junto con ella precipitan un enorme número de productos. No olvidar que el $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{O-Pb-OH}$, es un defecador. Además, todas las saponinas no precipitan con el acetato básico, por lo que creo que sería conveniente substituir el reactivo por una mezcla de acetato básico y acetato neutro de plomo. Sin embargo, en definitiva creo que no se habría adelantado gran cosa porque este método tiene otros inconvenientes que juzgo incompensables y que indico a continuación.

Cuando hay ácido tártrico en el medio precipita junto con la saponina y se obtiene una masa de la ^{que} es sumamente difícil afilar luego la saponina siguiendo la técnica que indica el método.

Pero, por encima de todos los inconvenientes señalados el Método de Vamvakas tiene un defecto máximo: el reactivo que usa al final para identificar la saponina. No hay que olvidar que el R. de Nessler reacciona con un número casi ilimitado de productos. No hay derecho por lo tanto, a pensar en la existencia de saponinas por que una prueba con Nessler dé positiva.

Creo en síntesis que el Método de Vamvakas es el que tiene menos valor de los métodos que quedan indicados.

¶

Doy por terminado lo relativo a los métodos cualitativos. Insisto en lo dicho para cada uno de ellos recordando, que, en mayor o menor grado, son todos deficientes. El mejor de todos, con las salvedades hechas, es el de Rosenthaler y luego le sigue el de Brunner-Rühle, pero que ya es muy inferior con respecto al anterior. La ventaja que tienen es que se pueden combinar con el hemolítico en la forma ya indicada y esta propiedad es, a mi juicio, lo que los hace aplicables. En efecto, no hay ningún inconveniente en hacer ensayos de hemólisis con los residuos finales que se obtienen por dichos métodos, previamente purificados como se dicho.

MÉTODOS CUANTITATIVOS/

Tienen poco o ningún valor, por lo que los trataré de una manera rápida. El principio de los métodos cuantitativos propuestos por los autores es siempre el mismo: precipitación de la saponina ya sea al estado de su respectivo compuesto bórico, magnésico o plúmbico, por medio de la solución saturada del hidróxido respectivo, añadida en exceso. Filtración del precipitado, lavado del mismo con la solución del hidróxido respectivo en un papel de filtro previamente tarado. Se seca en la estufa a unos 110°, hasta peso constante. Por diferencia entre el peso total y el peso del papel, se obtiene el peso del compuesto saponina-Ba, saponina-Mg o saponina-Pb, según el hidróxido empleado. Luego, el precipitado se calcina junto con el papel de filtro, del que se conocen las cenizas, y mediante un cálculo sencillo se deduce el peso de la sa

ponina. EN efecto, lo que sucede al calcinar el precipitado total es la destrucción de la saponina y del papel de filtro, del que quedan las cenizas cuyo peso es conocido. Además, junto con las cenizas ^{del papel de filtro}, queda la parte mineral del compuesto saponina-metal. Luego, por diferencia entre el peso del compuesto saponina-metal, ya calculado, y el peso de los productos de calcinación se obtiene el peso de la saponina. En realidad no es necesario conocer el peso de las cenizas del papel de filtro.

Todo ésto parece muy sencillo y se tiene a primera vista la impresión de que deben obtenerse buenos resultados. Sin embargo, no sucede así, pues hay innumerables causas de error. En efecto, en el método del bario, que dicen los autores que es el que da mejores resultados, (yo debo confesar que a mí no me ha dado bien ninguno), hay causas de error como éstas: Al calcinar el precipitado se forma junto con el BaO_3C , BaO y lo malo está que no se sabe cuanto de cada uno. Esto, en cierto modo, podía subsanarse fácil con tratar el producto de la calcinación es decir, la mezcla de CO_3Ba y BaO , con SO_4H_2 y pasar luego al estado de SO_4Ba ; después, mediante un sencillo cálculo se podía expresar en BaO , que me parece que es la forma más racional, pues, no hay que olvidar que ese valor hay luego que restarlo del peso del compuesto saponina-bario, y tal vez, más lógico sería expresarlo en Ba metálico. Luego, desistí de hacer todo ésto por que me convencí que no valía la pena. En efecto, al añadir $(OH)_2Ba$, junto con la saponina precipitan un gran número de cosas que nada tienen que ver con ella ni con el complejo saponina-Ba, pero que luego se pesan como tal (sulfatos). Además, como dice Kofler, hay otras grandes fuentes error: por ejemplo, no se sabe cuanto de saponina queda sin precipitar, ni se conoce tampoco

cuanto se pierde al lavar el compuesto saponina-bario.

Además, lógicamente, los errores serán tantos mayores cuanto menor sea la cantidad de saponina presente.

Para formarse una idea del valor de estos métodos como métodos cuantitativos extraigo del libro de Kofler, tantas veces citado en este trabajo, por ser dicho libro la obra más completa que se ha escrito sobre saponinas, los siguientes datos de sumo interés, (Capítulo 9, "Quantitative Bestimmung", pág. 80-82),:

En la raíz de la *Gypsophila paniculata*, hay, de acuerdo con el método del Ba, un 5% de saponina, mientras que otros métodos habían dado para dicha raíz un 20%. (Kofler no dice cuales son esos otros métodos). Por el método del Mg se halló que la cantidad de saponina encontrada correspondía a la mitad del valor hemolítico de la droga o poca cosa más. Finalmente, por el método del Pb se halló, siempre en la misma raíz, sólo una acción hemolítica que es la vigésima parte del poder hemolítico de la droga. Después de todo esto uno no puede hacer a menos de preguntarse que es lo que tienen estos métodos de cuantitativos.

El método del bario me ha dado resultados no malos, sino pésimos. Así, por ejemplo, trabajando siempre en las mismas condiciones, y partiendo del caso más simple, pues trabajaba con soluciones acuosas de saponinas, he obtenido valores como éstos:

Saponina colocada	Saponina hallada
0,050	0,0551
0,025	resultado negativo
0,010	0,0043
0,005	resultado negativo

Puedo decir, que el método no me ha dado resultado.

En cuanto a bibliografía está el citado capítulo del libro de Kofler, donde, a su vez, se indica la bibliografía especial en cada caso.

Para terminar con los métodos cuantitativos diré que ^{he} intentado una permanganimetría para el caso de las soluciones acuosas de saponinas, con resultados bastantex alentadores. He logrado comprobar que para el caso de las soluciones acuosa diluídas de saponina la cantidad de MnO4K descompuesto varía linealmente con la concentración de la saponina; es decir, que si una cantidad "a" de saponina corresponden a "b" de permanganato, una cantidad "2a", por ejemplo, de saponina corresponde a "2b" del reactivo. La ecuación que interpreta lo que acabo de senalar es una ecuación del tipo: $a = nb$, donde "a" representa la cantidad de saponina, "b" el número de cc. de solución de MnO4K de un título determinado (N/10) que corresponden a los "a" gramos de saponina, y "n" es una constante que indica que cantidad de saponina corresponde a cada cc. de solución N/10 de MnO4K.

Procedo de la siguiente manera; ~~xxx~~ A la solución acuosa de saponina le añado una cantidad conocida y en exceso de MnO4K, así, añado 10 cc. de MnO4K N/10 y caliento una hora a baño maría. Al cabo de este tiempo retiro del baño y dejo enfriar; luego acidulo fuertemente con 2,5 cc. de SO4H2 concentrado. Pongo entonces 10 cc. de ácido oxálico N/10 con lo que el líquido se decolora y queda libre una cantidad de oxálico que corresponde al permanganato destruido por la saponina. Caliento a unos 80° y titulo el ácido oxálico libre con MnO4K N/10.

He obtenido, con solución al 5% de saponina Poulenc, los siguientes valores, que hacen ver la variación lineal de que hablaba:

cc. de solución de saponina al 5% .	0,2	0,4	0,6	0,8	1
cc. de MnO4K N/10 destruidos.	0,70	1,35	1,95	2,55	3,2
diferencias :	0,65	0,60	0,70	0,55	

Los resultados los considero bastante concordantes. Debo decir que existe un factor cuya influencia es enorme y que aún no he logrado precisar debidamente. Creo que es un factor térmico. Otros numerosos ensayos que he realizados me han permitido observar, prescindiendo de los valores malos debidos a errores experimentales, lo que al comienzo he dicho.

Sin duda es cuestión de estudiar un poco más el asunto aún que ya queda demostrada o establecida la función lineal que liga a la cantidad de saponina con el permanganato destruido. De cualquier forma este ensayo de permanganimetría de saponinas, tiene dos inconvenientes

1º) Es de aplicación muy restringida, por cuanto se aplica solo a las soluciones acuosas y puras de saponina.

2º) El factor n , que liga los cc. de permanganato con la saponina, hay que determinarlo en cada caso puesto que varía con esta última,

MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Tienen como base la propiedad que poseen las saponinas, en mayor o menor grado, de producir la hemólisis de los glóbulos rojos.

En los ensayos he empleado una solución de hematíes de carnero al 2%, como más tarde se indica; dicha suspensión debe hacerse siempre en solución fisiológica (ClNa al 0,85 %), a los efectos de evitar la hemólisis de los glóbulos, por variación de la presión osmótica del medio.

No conviene usar sangre total, sino la suspensión de hematíes, por que aquélla no es tan fácilmente hemolizada por las saponinas (influencia de la colessterina, etc.)

En el caso de ~~soluciones de~~ saponinas puras resulta sencillo, como se comprende, ensayar la acción hemolítica. No hay más que disolver la

saponina en solución fisiológica (nunca en agua pura), añadir un poco de la suspensión de hemáties, agitar bien, y al cabo de un tiempo ver si se ha producido o no la hemólisis.

Dicho tiempo depende de muchos factores. Fundamentalmente está determinado por la cantidad de saponina y por el poder hemolítico de la misma; además, depende de los glóbulos usados (según la especie animal), y de otros factores como la tensión superficial de la solución, el pH, la presencia de otros cuerpos (colesterina, lecitina, etc.).

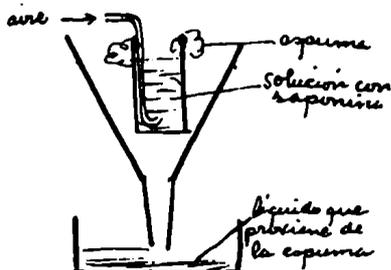
En el caso de las bebidas lo primero que debe hacerse es tratar de aislar la saponina al estado de mayor pureza posible, y todas las operaciones que se hacen, previas al ensayo hemolítico propiamente dicho, van dirigidas a este fin. Ya hemos visto como se podían combinar los métodos químicos con los ensayos hemolíticos. Ahora me referiré solo a estos últimos.

Existen métodos que si bien tienen una base un tanto empírica, no dan, en cambio, tan malos resultados.

Método de Müller-Hüssley (1)

Se basa en el hecho conocido de que la espuma de un líquido que contiene saponina es más rica en saponina que el mismo líquido.

Estos autores toman de 500 a 1000cc. del líquido previamente neutra-



lizado y los colocan en una probeta, la que se halla, a su vez, dentro de un embudo mayor debajo del que se halla un recipiente donde se recoge la espuma producida por el burbujeo de una

- (1) L. Kofler "Die Saponine" pag. 79. cita sacada del "Mitt. Lebensmittelunters. u. Hygiene 8, 113. Nach Chem. Zentralbl. 1917. II, pag. 430. Chemical Abstracts: 11:3342 (4).
Leach, "Food Inspection and Analysis", 4 edit, pag 1015-17

corriente de aire en el líquido de la probeta, como indica el esquema de la página anterior. El líquido recogido debajo del embudo y formado por la destrucción de la espuma, se ensaya en su poder hemolítico como luego se indicará.

Yo creo que la neutralización previa del líquido, como aconsejan los autores, no es conveniente por cuanto se corre el riesgo de impurificar la espuma con una sustancia ajena a la saponina, y porque, según muchos autores (Kofler etc.) la neutralización disminuye el poder hemolítico de la saponina. Yo no neutralizo. Además, el líquido proveniente de la espuma, lo llevo a sequedad a baño maría, y al residuo, previamente purificado por tratamiento con disolventes que no solubilizan las saponinas, lo ~~simplemente~~ divido en dos partes; con una, hago reacciones cromáticas, y con la otra, previamente disuelta en solución fisiológica, hago ensayos hemolíticos, de la manera que indico más adelante.

La gran idea de los autores del método está en recoger la espuma, producida como queda dicho. Esto no es más que un sistema de concentración y purificación de las saponinas.

Método de Sormani (1)

Prescinde de un aislamiento de la saponina, y procede así:

Neutraliza el líquido a investigar, le libra del CO₂ y del alcohol y luego por agregado de citrato de sodio lo hace isotónico con la sangre. Después, investiga directamente el poder hemolítico.

Este método tiene la desventaja que quedan en el líquido colorantes, a-

(1) L. Kofler, "Die Saponine", pág. 78; cita sacada del "Zeitschr. Unters. d. Genusssm. 23, 561 (1912)
Chemical Abstracts 6:2267

dehídos, etc. junto con la saponina; además, no solo no se purifica la saponina sino que tampoco se concentra, y por otra parte, como se desconocen la concentración de las sustancias disueltas en el líquido resulta difícil hacerlo isotónico con la sangre. Por todas las razones indicadas, no hay duda alguna, que el método de Sormani es inferior al de Muller-Hüssley.

Cuando en una bebida el ensayo hemolítico ha dado ~~resultado~~ positivo, no puede decirse que sea debido a la presencia de saponinas, puesto que no son las únicas sustancias capaces de producir hemólisis. En efecto, (1) "el agua misma, urea, sales amoniacales, álcalis, ácidos diluïdos, sublimado, alcoholes, éter, aldeïdos, acetonas, coloides inorgánicos (sílice coloidal), precipitados minerales (SO_4Ba , recién precipitado), glucósidos (saponina, solanina, digitalina, jabones y singularmente el oleato de sodio), bilis y sales biliares, diastasas (jugo pancreático), toxinas vegetales (ricin, abrina), hemolisinas de origen bacteriano (tetano-lisinas) o de origen animal (hemolisinas del suero, de las abejas, de las arañas y de las serpientes) son todas sustancias capaces de producir hemólisis".

Por lo tanto, cuando el ensayo hemolítico da positivo conviene hacer la contra-prueba del colesterol, ya aconsejada por Leach, y que consiste en lo siguiente: Se toman diez cc. de la solución de saponinas en solución fisiológica o del líquido donde se presume que hay saponina y se le añade 1 mgr. de colesterol disuelto previamente en una pequeña cantidad de éter; se agita bien, y se deja unas horas a 36° para elimi-

(1) Lambling: Química Biológica, pag. 237.

minar todo el éter. Luego, con este líquido al que se le ha añadido colesterol, se repiten los ensayos hemolíticos y si la hemólisis que se obtenía al principio era debida a la presencia de saponinas, ahora el ensayo hemolítico debe dar resultado negativo. En efecto, la colestestina tiene la propiedad de inhibir la acción hemolítica de las saponinas.

En el caso en que haya muy poca saponina puede observarse el ensayo hemolítico bajo el microscopio, con un aumento de unos 300 diámetros, colocando una gota del líquido en examen en un porta y añadiendo luego otra gota del reactivo.

Quedan ya vistos los métodos más comunes; pasaré ahora a ocuparme de un concepto nuevo introducido por Kofler; el cociente veneno-espuma, para lo que es menester ocuparse antes de dos cuestiones previas, que son ; el índice hemolítico y el número espuma.

Indice Hemolítico (1)

Este concepto fué introducido por Kobert cuando estudiaba el poder hemolítico de ciertas drogas.

Consiste en lo siguiente; Se determina la concentración mínima a la que la droga o el residuo en estudio determina la hemólisis total de un volumen determinado de una suspensión de hematíes de una concentración dada, haciendose la lectura a las 24 horas.

En realidad está no muy standarizada la determinación del índice hemolítico por que revisando la literatura se halla con que unos emplean suspensión de hematíes de un título determinado, otros de otro, unos leen a las 24 horas, otros antes, etc. por lo que me voy a limitar a

(1) L. Kofler, "Die Saponine", Pág. 148 a 155.

R. Kobert, "Ber. D. Dtsch. pharmaz. Ges. 22, 203 (1912)."

exponer las cosas tal como las he hecho.

He seguido la siguiente técnica:

Se toma una serie de tubos pequeños, de los que se usan para la reacción de Wassermann, y se coloca en cada uno de ellos un cc. ^{de} suspensión de hematiés de carnero al 2%, suspendidos en solución fisiológica. Se añade, luego, en cada tubo 0; 0,05; 0,10; 0,15, 0,90; 0,95 y 1 cc. de solución fisiológica. El residuo donde está la saponina se disuelve en un volumen conocido de solución fisiológica y luego se añade de esta solución a cada uno de los tubos hasta completar el volumen total de cada uno de ellos en 2cc. Se agita bien cada tubo para que los líquidos se mezclen, se vuelve a agitar al cabo de 15', y se hace la lectura a las 24 horas dejando a la temperatura ordinaria.

Algunos autores recomiendan neutralizar el líquido sobre el que se va a hacer ensayos hemolíticos; pero, parece ser que la neutralización resta poder hemolítico a la saponina, a más de impurificar el líquido, por lo que juzgo que es una técnica no aconsejable. La técnica que he seguido no es más que la técnica que cita Kofler (pág. 150-151) y Adams, pero que yo he simplificado enormemente a los efectos de hacerla de uso práctico.

He calculado el índice hemolítico de las saponinas Menck y Poulenc en soluciones acuosas puras, y en bebidas preparadas artificialmente.

A los efectos de que se vea como se hace el cálculo del índice hemolítico doy a continuación un ejemplo, con todos los detalles del caso, limitado en las otras determinaciones que he realizado a enunciar simplemente los valores leídos y el resultado final.

Resultados

Ejemplo:

Con solución de saponina Poulenc al 0,05 %:

cc. solución al 2% de glóbulos rojos de carnero.	cc. de solución fisiológica.	cc. solución de saponina Pou- lenc al 0,05%	lectura a las 24 horas
1	1,00	0,00	no hay hémól.
1	0,95	0,05	idem.
1	0,90	0,10	escasa hémól.
1	0,85	0,15	+
1	0,80	0,20	+
1	0,75	0,25	+
1	0,70	0,30	++
1	0,65	0,35	++
1	0,60	0,40	++
1	0,55	0,45	+++
1	0,50	0,50	hémól. total(+++)
1	0,45	0,55	idem.
1	0,40	0,60	idem.
1	0,35	0,65	idem.
1	0,30	0,70	idem.
1	0,25	0,75	idem.
1	0,20	0,80	idem.
1	0,15	0,85	idem.
1	0,10	0,90	idem.
1	0,05	0,95	idem.
1	0,00	1,00	idem.

El índice hemolítico se calcula así: El primer tubo en el que se produce hemólisis total es aquel que lleva 0,50cc. de solución de saponina al 0,05%. La cantidad total de saponina que hay en ese tubo es:

$$5 \times 1/10.000 \times 0,50 = 2,5/10.000 = 1/4.000$$

Como el tubo tiene un volumen total de 2cc. de líquido, en loc. de líquido habrá de saponina: $1/4.000 \times 2 = 1/8.000$, que es la concentración de la saponina en dicho tubo. El índice hemolítico es la inversa de esa dilución. Luego, se halló:

Índice hemolítico 8.000.

Las determinaciones que he realizado con otras soluciones me han dado los siguientes resultados:

a) Con solución al 0,1% de saponina Poulenc:

La hemólisis total comienza en el tubo que lleva 0,25 cc. de solución. Luego, el índice hemolítico es: 8.000.

b) Con solución al 0,05% de saponina Merck:

La hemólisis total comienza en el tubo que lleva 0,25 cc. de solución. Luego el índice hemolítico es: 8.000.

c) Con solución de saponina Merck al 0,2% :

La hemólisis total comienza en el tubo que lleva 0,15cc. de solución. Luego el índice hemolítico es: 6,666.66

Debo hacer notar que una determinación con saponina Merck al 0,05% hecha después, me dió también el mismo valor 6,666,66

d) Bebida con saponina Merck al 0,05% que lleva como colorante caramelo:

La hemólisis total comienza en el tubo que lleva 0,55 de solución. Luego, el índice hemolítico es: 7272.

e) Bebida con saponina Merck al 0,1%, que lleva caramelo como colorante:

La hemólisis total comienza en el tubo que lleva 0,35 de solución. Luego el índice hemolítico es: 5.714.

Y otras muchas determinaciones que he realizado y no cito para no hacer el asunto demasiado extenso.

Abreviaremos índice hemolítico de la siguiente manera: I.H.

El índice hemolítico es sin duda un número de singular valor por cuanto depende de la saponina y no de otros agentes, quiero decir, que depende fundamentalmente de la naturaleza de la saponina.

Una misma saponina debe dar siempre el mismo I.H. por lo que acabamos de decir. Pero, en la práctica, no siempre sucede esto debido a las condiciones experimentales, como nos sucedió en el caso de la saponina

Merck. ⁽²⁾ Las diferencias de concentración tienen una influencia enorme en el cálculo del I.H. y, un pequeño error que se cometa en la lectura influye grandemente. A veces, ~~estas~~ grandes diferencias observadas para el I.H. de una misma saponina, depende fundamentalmente de la concentración de la solución saponíca con las que se trabaja. Cuanto mayor sean dichas diferencias de concentración, entre sí, mayor será la diferencia en el índice hemolítico hallado. Para obtener un buen I.H. es menester que las diferencias de concentración entre los tubos de la escala sean los más pequeñas posible; Así el error es siempre menor, y la aproximación, por lo tanto, mayor.

A pesar de todo, estas consideraciones no son de gran utilidad por cuanto en la práctica, no es posible aún identificar una saponina por el índice hemolítico hallado.

Número Espuma (1)

Es un concepto totalmente empírico que tuvo su origen en las infructuosas tentativas realizadas por numerosos autores para dosar las saponinas por la cantidad de espuma producida.

El I.H. es por lo menos un valor, por así decir, que depende de la naturaleza de la saponina. No así, en cambio, el número espuma (N.E.) como lo indica claramente la técnica a seguida en su determinación, sea cual sea .

Yo he seguido para determinar el N.E. el método de Sieburg y Bachmann o más propiamente de Kofler, que consiste, suprimiendo la neutra-

(1) L. Kofler, "Die Saponine", pag. 52-55, y: Pharmazeut. Monatshefte 3, 117 (1922)

(2) Solo todo en ausencia de otras sustancias.

lización ,en lo siguiente :

En el mismo líquido con el que se determina el I.H. se hace la determinación del N.E.

Se toman 10 tubos de ensayo de igual diámetro (Kofler usa tubos de 16 mm.) y se coloca en cada tubo 1, 2, 3, 4..... hasta 10 cc. de la solución cuyo N.E. se quiere determinar. Se completa cada tubo con agua destilada hasta 10 cc. Se agita fuertemente cada tubo, reloj en mano, durante 15" (segundos), se deja reposar 15' y al cabo de este tiempo se hace la lectura tomando para el cálculo aquel tubo en el que la espuma tiene 1 cm. de altura. La inversa de la concentración de la saponina en este tubo es el N.E.

Con un ejemplo se comprenderá mejor:

En el caso de la solución de saponina Poulenc al 0,05% el tubo en el que la espuma tenía 1 cm. de altura era el tubo 2; es decir, aquel tubo que contenía 2cc. de solución más 8 cc. de agua. Luego, la cantidad total de saponina contenida en el tubo es:

$$2 \times 0,0005 = 0,001 = 1/1.000$$

como el tubo tiene 10 cc. de líquido la concentración de la saponina será;

$$1/1.000 \times 10 = 1/10.000$$

luego se tendrá ; N.E. ; 10.000

He determinado el N.E. para otras soluciones y para bebidas preparadas artificialmente obteniendo valores muy poco concordante/aún tratándose de la misma saponina. Se explica esta discordancia por que el N.E. es una cosa condicionada por factores totalmente extraños a la saponina: Diámetro del tubo, energía de agitación, altura de la espuma, etc.

Además, está demostrado que el N.E. no es proporcional al contenido en saponina y el N.E. no puede remplazar al índice hemolítico.

Tampoco la altura de la espuma es rigurosamente proporcional a la concentración de las saponinas.⁽²⁾

En síntesis, el N.E./ tiene muy poco significado analítico.

Doy a continuación los resultados hallados para otras soluciones:

- a) Solución saponina Poulenc al 0,4% : N.E.: 20.000
 - b) Solución saponina Merck al 0,35% : N.E.: 6.666
 - c) Solución saponina Merck al 0,2% : N.E.: 5.000
- etc...

El Cociente Veneno - Espuma de Kofler (1)

Lo introdujo Kofler creyendo que era una cifra característica de cada saponina. En realidad, no sucede tal cosa.

Se define como cociente veneno-espuma de Kofler (V.E.) al cociente que se obtiene dividiendo el I.H. por el N.E.:

$$V.E. = \frac{I.H.}{N.E.}$$

Determinados como queda dicho, el I.H. y el N.E. no hay más que dividir aquél por éste para obtener el cociente veneno-espuma.

He aquí algunos valores hallados para algunos líquidos con saponina:

- a) Solución de saponina Merck al 0,2%

N.E. : 5.000
I.H. : 6.666

$$V.E. = \frac{5.000}{6.666} = 0,75$$

- b) Solución saponina Merck al 0,06%

N.E. : 6.666
I.H. : 8.000

$$V.E. = \frac{8.000}{6.666} = 1,20$$

(1) L.Kofler "Die Saponine" págs. 75-78.

(2) Pequeñas variaciones de la concentración originan grandes variaciones en la altura de la espuma, sin ninguna proporcionalidad.

e) Solución saponina Poulenc al 0,1% :

N.E. : 20.000

I.H. : 8.000

$$V.E. = \frac{8.000}{20.000} = 0,40$$

f) Solución saponina Poulenc al 0,05% :

N.E. : 10.000

I.H. : 8.000

$$V.E. = \frac{8.000}{10.000} = 0,80$$

g) Bebida con saponina Merck al 0,1%, azúcar y caramelo :

N.E. : 5.000

I.H. : 5.714

$$V.E. = \frac{5714}{5.000} = 1,14$$

h) Bebida con saponina Merck al 0,05%, azúcar y caramelo :

N.E. : 5.700

I.H. : 7272

$$V.E. = \frac{7.272}{5.700} = 1,27$$

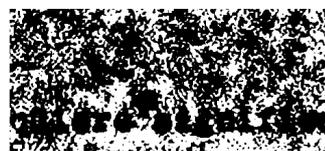
Con los datos dados podemos afirmar que el cociente V.E. no es una cifra característica de cada saponina, como afirma Kofler. A lo menos, ~~mi~~ a mí no me ha dado tal resultado.

Kofler sostiene que ese cociente V.E. es tan característico de la saponina, que si ésta se halla impurificada con un 50% de productos extraños, de modo que haya solo un 50% de saponina, el I.H. y el N.E. ^{variarán} se ~~variarán~~ de tal modo que el cociente V.E. se mantiene constante.

Para ello, ambos términos, I.H. y N.E. se reducirían a la mitad.

Yo creo que no sucede tal cosa porque ni el índice hemolítico tiene por que reducirse, en ese caso, a la mitad, ni el N.E. varía según leyes sencillas. Más aún, este último, no guarda relación con el I.H. ni con la concentración de la saponina. Tal es, en síntesis, la impresión que tengo del cociente V.E.

Kofler usó para sus experiencias sangre de ratón; yo empleé sangre



tes íntimos de la naturaleza de la saponina, tales podrían ser, por ejemplo, el índice hemolítico, por un lado, y el límite de sensibilidad de la reacción de la saponina en cuestión para una sangre determinada por otro lado. (*potencia hemolítica*)

En cuanto a los factores que influyen en la hemólisis no es del caso considerarlos dada la índole del trabajo, y por que, por otra parte se requiere una serie de citas teóricas. Como síntesis completa de esto, me permite recomendar el capítulo íntegro que trae Kofler en su libro (123) pág. sobre acción hemolítica.

Creo, en definitiva, que nada se ha hecho de valor, en lo referente a apreciaciones cuantitativas de saponinas, y muy poco en las cualitativas.

Por que no decirlo, el estudio de las saponinas, antes que desde el punto de vista analítico, hay que encararlo desde el punto de vista orgánico. Recien entonces aquéllo fluirá de ésto, y una vez más, quedaría demostrada en la historia de la ciencia, la importancia de las soluciones teóricas.

.....

P A R T E I I I

Fundamentos y antecedentes para aconsejar un criterio de legislación Bromatológico respectivo a los espumígenos

A los efectos de fundamentar el criterio que aconsejo respectivo a la legislación bromatológica de los espumígenos, incluyo los antecedentes de las legislaciones extranjeras y los fundamentos toxicológicos citados en este capítulo.

En cuanto a los criterios aconsejados por los diferentes autores, diré que son sumamente variados, y a veces un mismo autor ha emitido en diferentes épocas diferentes criterios, tal es el caso de Kobert, quien en unos momentos se inclinaba a la prohibición absoluta de las saponinas, mientras, que en otros, solo se limitaba a restringir el uso de los espumígenos.

No es el caso hacer la historia de los diferentes criterios, con que en diferentes oportunidades se ha encarado este asunto, por lo que paso directamente a considerar los:

FUNDAMENTOS TOXICOLÓGICOS: (1)

Ha sido demostrado de una manera evidente que las saponinas introducidas en el organismo por inyección intravenosa son mucho más tóxicas que cuando se administran per os. A nosotros nos interesa, desde el punto de vista bromatológico, los efectos que producen las saponinas a ser ingeridas conjuntamente con los alimentos o las bebidas, es decir, los efectos de la introducción per os. Sin embargo, a los efectos de fijar ideas con respecto a las diferencias de toxicidad por vía bucal y por vía intravenosa, diré que Kofler y Wolkenberg trabajando con sa-

(1) L. Kofler, "Die Saponine", pág. 201, 204.

tones, con saponina Sthamer, hallaron que era 300 veces más tóxica por vía intravenosa que por vía bucal; idem. 30 veces para la Gypsophila-saponina; idem. 66 veces para la saponina puris. albis. Merck; idem. 50 veces para la sapotoxina Merck. Estos valores han sido sacados del cuadro de dichos autores y que se halla reproducido en la pág. 204 del libro de Kofler.

Añade este último, que por lo visto la pared del estómago y del intestino es muy impermeable para las saponinas. No puede sorprendernos la impermeabilidad de la pared del estómago, puesto que sabemos que por allí no se absorbe nada, ni agua. Agrega Kofler, refiriéndose a la impermeabilidad de la pared intestinal para las saponinas, que sólo existe cuando dicha pared se halla intacta, pero, si en cambio, en el intestino dicha pared se ha dañado anteriormente por la acción de venenos o de grandes cantidades locales de saponina, puede por esas zonas lesionadas, absorberse fácilmente las saponinas y obtenerse el mismo síndrome que en el caso de la intoxicación por vía intravenosa. Yo creo que lo que dice Kofler con respecto a la absorción intestinal de saponinas puede ser discutido si se aplica algunos conceptos biológicos elementales.

La resistencia de las mucosas del tubo digestivo frente a la acción irritante de las saponinas es relativamente grande; no así, en cambio, las mucosas de los ojos y de la nariz.

Al ingerir dosis relativamente grandes de saponinas se siente un sabor desagradable y una sensación de molestia en la garganta, experimentándose, luego, una fuerte necesidad de beber al mismo tiempo que se intensifica la secreción salival. Dice Kofler, quien ha hecho la experiencia en carne propia tomando alrededor de dos grs. de sa-

ponina Gypsophila, que hasta la voz se enfronquece y el rostro se congestiona. En el estómago experimentó ardor alrededor de unas dos horas y además tuvo un fuerte dajeo de devolver, pero el vómito no se produjo. En otros casos, como veremos, el vómito llega a producirse. Horas más tarde, si el sujeto no parece víctima de la intoxicación, todos los síntomas desaparecen.

El peristaltismo del estómago y del intestino es activado, y por eso es frecuente observar en los animales que han ingerido fuertes dosis de saponina la producción de intensas diarreas, pero parece que en el hombre esta acción no es tan manifiesta. A lo menos, las dosis terapéuticas no producen ese efecto. La secreción gástrica se intensifica (Waecker) y no hay duda, también, que lo mismo sucede con la secreción pancreática aunque no de una manera tan manifiesta como la anterior.

Según Kofler, las diferentes saponinas administradas por vía oral dan todas el mismo síndrome. La diferencia es solo cuantitativa ~~xx~~ y depende de la dosis administrada, por un lado, y de la especie animal en la que se ensaya, por otro lado. Las ovejas, las cabras y los roedores parecen ser prácticamente inmunes a la saponina introducida por os; ~~ida~~ los vacunos adultos.

Los animales más sensibles son los perros, los caballos, los cerdos y las gallinas, y sobre todo los peces. Los animales jóvenes son, en general, más sensibles que los viejos, pero parece que por suministro de dosis adecuadas y sucesivas se logra una cierta inmunidad. Según Brandl, esta inmunidad vale solo hasta un límite determinado, por encima del que se produce un envenenamiento agudo.

Resumiendo los síntomas que ofrece el cuadro de la intoxicación por

saponinas (Kofler), se tiene; secreción de saliva, vómitos, mareos, diarreas, anorexia, decaimiento, parálisis y finalmente la muerte, la que puede ocurrir después de unos días, si la dosis no ha sido muy grande. Los síntomas de la intoxicación por vía oral son iguales a los de la intoxicación por vía intravenosa, solo que, como ya queda dicho, la vía parenteral es de acción más rápida.

Existe en la literatura un caso sumamente interesante citado por Kofler, (pag. 210), Lessellier (Bullet. gén. de thérap. 1888. S. 330 Zit. nach Kobert, Arch. f. exper. Pathol. u. pharmakol. 23, 233 (1887

Se trata de un sujeto que tomó una infusión de corteza de quillay y que murió a consecuencia de ello. Los síntomas fueron los siguientes: escalofríos, opresión en el epigástrico, sudores fríos, temblores, bradicardia, vómitos continuados, fuertes retorcionones en la vena, y aumento de la secreción urinaria; luego, la muerte.

Es un hecho comprobado el pasaje de las saponinas a la orina aunque aun no ha sido explicado el mecanismo de este fenómeno. Más aún si se tiene en cuenta que en el intestino sufren una fermentación degradativa (Kobert, Brandl). Las saponinas hay que admitir que no pasan a la sangre puesto que no se han podido hallar directamente en ella, salvo en aquellos casos en los que dando dosis brutales de saponina se ha destruido, por así decir, el límite natural que ofrece la barrera intestinal; pero, esto ya no es el caso corriente de la ingestión de saponinas con los alimentos.

Dosis tóxica no conviene dar, por cuanto, no solo depende del animal sino también de la saponina, y de la vía por la que ésta se suministra.

En general, el hombre soporta dosis elevadas.

Mizoguchi y Naito, (1) sostienen que cuando varias sustancias químicas se mezclan con saponinas, si luego esa mezcla se suministra por vía oral, la sustancia química resulta más fácilmente absorbible en el intestino que cuando se suministra sola. De modo, que las saponinas favorecerían la absorción de ciertas sustancias. Hicieron experiencias con Yoduro de potasio, bacilos del cólera, del tifus, sulfato de magnesio, etc.

ALGUNAS LEGISLACIONES BRONQUITOLÓGICAS EXTRANJERAS:

Haré un resumen de las diferentes legislaciones bronmatológicas de algunos países con respecto a la permisón o prohibición de la adición de saponinas en los alimentos y bebidas.

En Francia, según una resolución del Consejo Superior Francés de la Salud Pública, debe evitarse el empleo de saponinas en los alimentos sea cual fuere su procedencia (2). La prohibición es absoluta.

El Decreto Francés del 19 de Diciembre de 1910, modificado por otro del 16 de Septiembre de 1925, estableció en su artículo 24, las proporciones de algunos componentes del jugo de regaliz; dice así, que dicho jugo debe llevar más del 15% de agua y que debe ser extraído a partir de la raíz de regaliz. El artículo 25 permite la adición de jugo de regaliz a los productos azucarados y establece que pueden denominarse puros siempre que contengan un mínimo de 6% de glicirricina permite, además a dichos productos el agregado de otros cuerpos como gomas, dextrinas, etc. pero en este caso el contenido en glicirricina no debe ser menor del 1%. Luego, en Francia, se prohíben las sapo-

(1) Chemical Abstracts 3976 (9), año 1929.

(2) L. Kofler, obr. cit. pág. 246.

ninas pero se permite la glicirricina.

En Rumania, se prohíbe la adición de saponinas a las bebidas espumosas, en virtud de lo que dispone el art. 141 del "Regulamento pentru Controlul alimentelor si Bauturilor si Represiunea Fraudelor" (Aplicarea cap. XIX, al legii sanitare), publicado en el: "Maunitor Oficial" Nº 204, del 9 de Diciembre de 1921. Dicho art. 141 dice que está prohibida la introducción de sacarina y otras sustancias edulcorantes artificiales en la preparación de limonadas gaseosas. Así mismo, más adelante establece "la prohibición de la introducción de saponinas y de otras sustancias destinadas a producir espuma". Luego, en Rumania, la prohibición es total.

En Suiza, la prohibición es completa, y en el "Lebensmittelbuches" se establece: "Las limonadas no deben contener éteres de frutas artificiales, sustancias conservadores ni medios espumantes". Tal lo establece la ordenanza del 8 de Mayo de 1914, modificada por otra del 8 de Abril de 1921, en la que se habla de la prohibición de la adición de medios espumantes, sustancias conservadoras, colorantes, edulcorantes etc. Pero no se dice nada, en especial, de las saponinas. La prohibición de los medios espumantes debe interpretarse haciendola extensiva tanto a las saponinas como a la glicirricina.

El 30 de Junio de 1917 se dictó un decreto en Suiza en el que se prohibía, hasta nueva orden, entre otros, la exportación de los siguientes productos : jugo de regaliz, alcaloides vegetales y glucósidos y sus combinaciones.

En España, revisando, a lo menos, el Real Decreto del 22 de Diciembre de 1908 sobre las Falsificaciones de los Alimentos, no se halla nada, en es-

pecial, referente a las saponinas. En realidad, la prohibición existe implícitamente expresada, por cuanto, se prohíbe en los alimentos y bebidas " La adición de sustancias nocivas". Es, pues, cuestión de establecer cuales son las saponinas tóxicas y cuales no.

El citado decreto fué publicado en Madrid en el año 1909.

En Austria, (L. Kofler, pág. 246) la prohibición del agregado de saponinas es total, de acuerdo con la presente cita del Codex Alimentarius de ese país : "..... están prohibidas, en general, la aplicación o el uso de edulcorantes artificiales, medios espumantes dañinos, por ejemplo, de saponinas y de sustancias que contienen saponinas". Dice, más adelante : "..... perjudiciales a la salud son los jugos de fruta de toda clase, inclusive jugos de frutas artificiales y las limonadas, cuando contienen sustancias conservadoras no admitidas, saponinas o sustancias que contienen saponinas." La prohibición, es pues total.

En Alemania, (1) la prohibición existe pero no está expresada claramente. El 24 de Mayo de 1908 se dictó una resolución contra los fabricantes de limonadas que añadían saponinas. Dicha resolución fué dictada por la Justicia de la Colonia. Disponíase la aplicación del párrafo X del "Nahrungsmittelgesetzes", o sea, de la ley de Alimentos. Dicha ley, según aclaración posterior ~~del~~ Consejo de la ciudad de Leipzig, en 1908, considera la adición de medios espumantes a las bebidas refrescantes, limonadas y bebidas sin alcohol, como una falsificación y hace especial mención de las saponinas.

Los fabricantes de limonadas se dirigieron al respectivo ministerio

(1) Moeller y Thoms, 2da edición, tomo 7º, pág. 74-75
L. Kofler, obr. cit. pág. 246-247

solicitando la derogación de la disposición del Consejo de la ciudad de Leipzig, pero, el ministro no accedió y agregó que los industriales debían renunciar al uso de las saponinas, por cuanto, son substancias no indispensables y consideradas por los peritos como rechazables, según quedaba probado de las experiencias hechas en el Control Alimentario Oficial.

En 1907, la Policía Sanitaria de Berlín creyó prudente la prohibición de la adición de espumantes a las bebidas, pero no se atrevió a regular el asunto mediante un decreto imperial. Luego, en Alemania, la prohibición existe pero no es tan clara como en otros países.

En Italia, "el uso de las saponinas está prohibido por las leyes, porque tienen acción hemolítica y es perjudicial para el organismo".

Transcribo el párrafo anterior del libro "La Chimica degli alimenti Tomo 2, Isseoglio, 1927, pag. 556. En el decreto-ley del 15 de Octubre de 1925, Nº 2033, Sobre la "Represión de fraudes en las preparaciones y en el comercio", no se halla nada en especial.

La legislación Brasileña sobre este asunto, es muy pobre. El Código de las Disposiciones Municipales sobre Higiene, acta Nº 68, del 21 de Octubre de 1909, Porto Alegre, no dice nada en especial, solo que implícitamente las prohíbe al decir en el Capítulo 3º, de las disposiciones comunes, art. 49, que queda prohibida la fabricación de licores, aguas minerales, etc. con substancias de mala calidad o nocivas a la salud pública. Lo mismo sucede con la prohibición que implícitamente está establecida en la legislación de otros países.

En 1922, se presentó a los químicos brasileros el problema de establecer si existían o no saponinas en unas cervezas. Ellos las halla

ron y plantean el problema de si las saponinas figuran o no entre los componentes normales del lúpulo, problema que no dan por resuelto.

En dicho país se condena a las saponinas en los productos alimenticios por considerarse nocivas para la salud pública y la Aduana las destina para fines industriales. Esta medida aduanera fué tomada a raíz de la opinión dada por el Dr. Francisco de Albuquerque, director del laboratorio bromatológico del Dep. Nac. de la Salud Pública.

En el Bureau of Chemistry, del 12 de Mayo de 1916, pág. 39, Nº 137, del U. S. Department of Agriculture, existe una publicación referente a la adición de saponinas en los alimentos y álega a la conclusión que los productos adicionados de saponinas pierden calidad y que se deben considerar adulterados. Además, hay un decreto en los E.E. U.U. dictado en Washington, con fecha 10 de Junio de 1922, en el que se prohíbe la adición de venenos o sustancias nocivas a los alimentos (Regulation 11, section 7, paragraphe 5) pero más adelante, dice así: "no deben ser añadidas en cantidad tal que puedan llegar a ser perjudiciales para la salud."

En el: Regulation 23, se prohíbe la corrección de esos productos alimenticios que sean perjudiciales para la salud.

(Del: "United States Department of Agriculture," sobre: "Rule and Regulation for the Enforcement of the Food and Drugs.")

LEGISLACION ARGENTINA

Se prohíbe la adición de saponinas pero en cambio se toleran las preparaciones a base de regaliz y de glicirrióna.

En el Codex Alimentarius Sudamericano, II Congreso de Química, reunido en Montevideo en el año 1930, se establece en el art. 153: "La denominación de sustancias espumíferas se aplica a materias vegetales

inocuas, dotadas de la propiedad de formar espuma persistente, y apropiadas para la preparación de bebidas gaseosas y bebidas sin alcohol exclusivamente."

Art. 154: "Se clasifican como sustancias espumígenas nocivas las que contienen saponinas en general, sean o no hemolíticas.

Las preparaciones de regaliz y glicirricina se consideran como materias espumígenas admisibles en la fabricación de bebidas hídricas, naturales y artificiales."

En el Art. 55 se establece, entre otras cosas la prohibición expresa del empleo en la fabricación de productos de cervcería de "saponinas o de sustancias agregadas como espumantes."

En el Art. 29 establece que se considerarán como adulterados los productos mencionados en los artículos que van del 26 al 28 inclusive (bebidas hídricas, analcohólicas y refrescantes, helados y cremas frías) cuando contengan espumígenos prohibidos. En el mismo artículo se establece, más adelante, que las bebidas y preparaciones similares fabricadas con drogas de uso medicinal (coca, saponaria, etc.) se clasificaran como inaptas para la alimentación.

En el Reglamento Bromatológico de la Peia. de Buenos Aires, 1928, redactado por el Dr. Carlos A. Grau, se establece:

En el Art. 28, que los jarabes a emplearse en la fabricación de limonadas, bebidas sin alcohol y productos análogos deberán satisfacer las condiciones que indica en los tres incisos de ese artículo. En el Inciso b) se dice textualmente: "No|ontener sustancias nocivas, alcohol amílico, ácidos minerales libres, saponinas, colorantes prohibidos ni edulcorantes artificiales."

En el art. 119 se establece que las pastillas de ororus o de regaliz deben estar adicionadas, por lo menos, de un 4% de extracto o sumo de regaliz.

En el art. 159, se establecen los componentes normales de las cervezas, o mejor dicho, se define la cerveza como el producto de la fermentación alcohólica del mosto elaborado con cebada germinada, pura o mezclada con no más de un 30% de sémolas de otros cereales, lúpulo, levadura y agua potable, y en el art. 155 se establece la prohibición de añadir alcohol a las cervezas y "sustancias no mencionadas en la definición de art. 159." y en el art. 167 dice que "no debe contener materias tóxicas"

En el art. 322, se prohíbe en las sustancias alimenticias y bebidas una serie de cosas entre las que figuran los preparados a base de drogas o principios activos considerados como de empleo terapéutico, y de un modo general, los preparados con sustancias consideradas nocivas por la Oficina Química de la Provincia o inaptas por cualquier motivo para el uso a que se destina. Pero no dice nada en especial de las saponinas.

Los artículos 327, 328 y 329, se refieren al extracto de regaliz y a la pasta de ororus, los que son permitidos y se establece que los extractos no deben contener menos del 6% de glicirricina, calculada esta última sobre el producto seco.

En el art. 375 dice que se entenderá por jarabe de zarzaparrilla el producto que se obtiene al disolver no menos de 25 gra. de extracto alcohólico de zarzaparrilla en 975 gra. de jarabe de azúcar. Es decir, se permiten las bebidas a base de zarzaparrilla, la que, como queda dicho, contiene saponina.

Existe en nuestro país un proyecto sobre la permisión de las substan-

cias espumígenas presentado por el Dr. E. Herrero Ducloux y aceptado por la comisión encargada de la redacción del Código Bromatológico Municipal, constituida por los Drs. A. A. Bado (presidente), A. Sanchez Días, T. J. Rumi, E. Herrero Ducloux, F. A. Justo (h) y C. Quiroz. En dicho proyecto se clasifican como sustancias espumígenas nocivas a todas aquellas que contengan saponinas en general, posean o no poder hemolítico, y se consideran como espumígenos admisibles a las preparaciones de regaliz y glicirricina. Además, se reconocen algunos métodos para la investigación de saponinas (Brunner-Ruhle, Carlinfanti y Marzzocchi y ~~se~~ la reacción hemolítica)

El 3 de Agosto de 1932, la Administración Sanitaria y Asistencia Pública eleva al Consejo Deliberante de la Capital el proyecto de modificación de un artículo del Digesto Municipal; se propone la prohibición, entre otras cosas, en la elaboración y expendio de las sustancias alimenticias y bebidas, ^{de} las saponinas, cualquiera sea su origen o composición.

Es de notar que en el R. B. de la Pcia. de Bs. Aires no existe una reglamentación general sobre los espumígenos. En cambio, ya se halla en el Codex Sudamericano (Montevideo 1930).

C R I T E R I O A C O N S E J A D O:

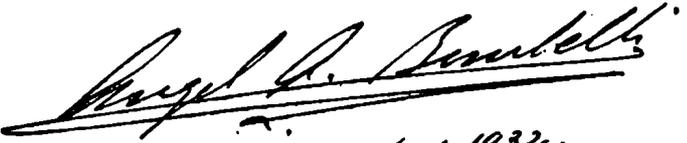
Dada la dificultad analítica existente para diferenciar una glicirricina de una saponina no hemolítica, dado el hecho de no existir ninguna relación entre la toxicidad de una saponina y su poder hemolítico, es decir, que hay saponinas no hemolíticas y tóxicas, que resultan por lo tanto imposible diferenciarlas de la glicirricina, y dados los antecedentes toxicológicos citados, creo que el criterio

a aconsejar, es el siguiente:

"La prohibición total de la adición de espumígenos a los alimentos y bebidas, sean saponicos de cualquier naturaleza o glicirrificicos."

Dentro de esta prohibición quedarían involucradas, también, las bebidas a base de zarzaparrilla.

..... F I N


30 de Agosto de 1932.