

EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE SAPONINAS EN *Agaricus bisporus*

Enzio Foy Valencia¹,
Débora Mac Donald,
Margot Cuyos,
Ruth Dueñas,

RESUMEN

Agaricus bisporus es un hongo, el cual es un organismo eucariótico, sin clorofila, con un micelio conformado por hifas, que aunque no es un vegetal, se ha determinado que presenta saponinas, las cuales son glucósidos existentes casi de forma exclusiva en las plantas. Se ha comprobado el contenido de saponinas por medio de tres reacciones de coloración. Así mismo se ha cuantificado un Índice Afrosimétrico de 200. Las valoraciones biológicas han determinado que no tienen acción hemolítica *in vitro* ni *in vivo*.

Palabras claves: *Agaricus*, *saponinas*, *hemólisis*.

SUMMARY

Agaricus bisporus is a mushroom, which is an organism eucariotic, without chlorophyll, with a micelio conformed by hifas that although it is not a vegetable, it has been determined that it presents saponins, which are existent glycosides almost in an exclusive way in the plants. It has been proven the saponins content by means of three reactions of coloration. Likewise an Index Afrosimetric 200 has been quantified. The biological evaluations have determined that they don't have action hemolitic *in vitro* neither *in vivo*.

Key words: *Agaricus*, *saponins*, *hemolysis*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucarióticos, sin clorofila, heterotróficos, acumulan glicógeno como material de reserva, con un micelio conformado por hifas y se nutren por absorción. Por ser heterótrofos requieren de materia orgánica preformada como la utilización de fuente

de carbono y energía para la síntesis de estructuras celulares. Forman esporas como producto de su reproducción.

El champiñón es un hongo cuyos beneficios para la salud son prácticamente desconocidos, sin embargo, muy conocidos en el área culinaria como una exquisitez. En la actualidad, se están realizando diversos estudios en China, Alemania,

¹ Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma; e-mail:efoy@mail.urp.edu.pe

Estados Unidos, Holanda, España y otros países sobre sus propiedades profilácticas.

Agaricus bisporus es la especie más cultivada en nuestro país (Fig.1). Las dos esporas (no 4) de sus basidios contienen núcleos entre sí, (+ y -); a diferencia de la mayoría de las demás agaricales, en esta especie no son necesarios los procesos sexuales para el comienzo de un ciclo vital. El cultivador puede propagar el hongo exclusivamente con micelio dicariótico. Un cultivo que tiene que producirse a una temperatura de 18 grados, una humedad relativa de aire del 70 al 90 %, con un contenido de dióxido de carbono que no supere el 0,1 %.

Los Hongos son organismos que carecen de plastidios y de clorofila, y si por tradición son considerados como plantas, ocupan en realidad una posición aislada. Las setas silvestres han sido clasificadas por los micólogos como la clase de los **basidiomicetes**, por sus estructuras especiales donde se forman las esporas llamadas **basidios**.

Muchas setas son comestibles y sabrosas, pero otras son peligrosas y hasta mortales. Del género de los *Agaricus* también tenemos setas peligrosas ligeramente venenosas como el *Agaricus xanthodermus*, que podría ser confundido con el champiñón comestible, sin embargo éste al ser trozado se torna de un brillante color amarillo en cambio el *Agaricus bisporus* se negrea.

Sin embargo, *Agaricus bisporus* a pesar de estar en un reino aparte, el reino Fungi, parece presentar algunas propiedades propias de los vegetales como es el caso de la presencia de saponinas, las cuales se reportan presentes de forma casi exclusivas en las plantas, y que es motivo de la presente investigación.

En relación a las saponinas estas son metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en las plantas superiores, en las que se presentan en forma de glucósidos. Sus soluciones acuosas al ser agitadas forman una espuma estable y abundante, hecho este que dio origen etimológicamente, al nombre genérico de estas sustancias provenientes del latín *sapon* (jabón).

Desde el punto de vista químico, las saponinas al ser hidrolizadas rinden de 2 a 6 residuos de monosacáridos y una porción carbonada policíclica que es la aglicona del glicósido, a la cual se le denomina genéricamente sapogenina. Pueden tener un esqueleto tipo esteroideal (de base gonano) o de tipo triterpenoide (derivados del escualeno), las cuales dan lugar a las 2 grandes familias de estos metabolitos: las saponinas esteroidales y las saponinas triterpénicas.

La solubilidad en agua de estos compuestos está facilitada por su alto peso molecular y la presencia de los residuos de monosacáridos y de otros grupos polares en la aglicona.

En ambas familias de saponinas el enlace glucosídico se establece a través del hidroxilo en posición 3 del anillo A de la aglicona. Las esteroidales, se localizan en monocotiledóneas principalmente de las familias de las liliáceas, amarilidáceas y dioscoreáceas y las triterpénicas en éstas y en algunas dicotiledóneas. Las sapogeninas esteroidales siempre se encuentran en la naturaleza formando parte de una saponina, a pesar de la presencia de saponinas, en muchas de las plantas que sintetizan estos compuestos. Entre las saponinas esteroidales, cabe destacar aquéllas que tienen como aglicona a la hecogenina y la diosgenina, compuestos vegetales que sirven de base para la industria de hormonas esteroidales.

Las sapogeninas triterpénicas están ampliamente distribuidas en los reinos vegetal y animal y se presentan en 3 estructuras químicas diferentes (30-45 carbonos): aciclícas como el escualeno, considerado como el precursor natural de esta familia: tetracíclicas como el panaxadiol y pentacíclicas como la estallogenina. Estas sustancias pueden presentarse en sus fuentes naturales: en forma libre: formando ésteres, o como parte de un glicósido (saponina). Las sapogeninas pentacíclicas se subdividen a su vez en 3 grupos: tipo lupane: tipo ursane (derivado de la a amirina), ambos no están presentes en los forrajes y los de tipo oleanane (derivados de la β amirina) presentes en estos últimos.

Las 2 familias de saponinas referidas presentan un grupo de características generales que sirven de base para su identificación rápida: a) producción de espuma al ser agitadas sus soluciones acuosas, lo cual es la base de la reacción de selivoflo empleada en el tamizaje fitoquímico; b) producción de hemólisis de los glóbulos rojos por la mayoría de ellas, propiedad que se aprovecha en las técnicas en que se cuantifica la potencia de estas substancias; c) toxicidad en animales poiquilotérmicos, en especial los peces (sapotoxinas), a los cuales provocan parálisis de las agallas (se emplean en formas destructivas de pesca), «pescar embarbascado»; d) producción de una reacción positiva en la prueba de Liebermann-Burchard. Por lo general, las esteroidales en esta prueba manifiestan colores que van desde el azul hasta el verde y las triterpénicas, rosado, rojo o violeta. Además, la mayoría de las saponinas son solubles en diferente grado en soluciones de etanol al 80 %, propiedad que se emplea en diversas técnicas para su extracción y purificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción de saponinas

La muestra de *Agaricus bisporus* fue adquirida comercialmente y secada en estufa a 60 °C, hasta la obtención de un peso constante. Luego se procedió a moler la muestra.

Se pesó 5 gr. de la muestra seca y molida y se colocó en un tubo de ensayo, añadiéndole 6 ml de etanol al 75%; y puesto a hervir en BM por 15 minutos. Se filtró y el extracto etanólico se evaporó a sequedad, con la finalidad de realizar el test afrosimétrico y las pruebas de identificación.

Identificación de saponinas Reacciones de Coloración.

A partir del extracto alcohólico seco se procedió a realizar los siguientes ensayos:

i) Prueba de Liebermann-Burchard.- Se tomó una pequeña cantidad

de extracto y se añadió 2 ml de anhídrido acético, 2 ml de cloroformo y se enfrió a 0°C. Se añadió 2 gotas de ácido sulfúrico (c). La aparición de una coloración azulada que pasa a anaranjado para luego volverse verde, indica que la reacción es positiva.

ii) Prueba de Salkowski.- Se tomó una pequeña cantidad del extracto y se le añadió 2 ml de cloroformo y 2 ml de ácido sulfúrico. Una coloración anaranjada indica reacción positiva.

iii) Prueba del α naftol.- En un tubo de ensayo se colocó una pequeña cantidad de extracto alcohólico seco y se añadió 2 ml de etanol y 2 gotas de solución 0.1% de α - naftol adicionándose por la pared del tubo de ensayo 2 ml de ácido sulfúrico (c). La reacción es positiva cuando en la interfase se forme un anillo de color violeta.

Evaluación de saponinas Valoración de las saponinas

Las saponinas se pueden valorar por métodos físicos como el llamado Test Afrosimétrico y el Índice de Espuma o Índice Afrosimétrico; o por métodos biológicos como el Índice Hemolítico o el Índice del Pez.

a. Test Afrosimétrico.

Se tomó la cuarta parte del extracto etanólico seco en un tubo de ensayo y se añadió 5 ml de agua destilada, se calentó al BM hirviendo por 2 minutos, se agitó vigorosamente, observándose la aparición de espuma muy persistente; la persistencia en minutos de la espuma se califica con cruces:

5 - 20 min. (+); 20 - 25 min. (++);
30 - Más (+++).

b. Índice afrosimétrico. (I . A.)

Es el número que expresa el volumen en centímetros cúbicos en que está disuelto un gramo de material saponínico para producir espuma de un centímetro de altura en un tubo de 16 mm., de diámetro que contiene 10 ml., de solución.

Este método de evaluación de saponinas está basado en la propiedad físico-química que presentan las soluciones acuosas de saponinas, de disminuir la tensión superficial de los líquidos acuosos, provocando abundante espuma por agitación.

En esta medida es preciso efectuarla en determinadas condiciones para que pueda tomarse como base analítica. Para determinarlo se procedió primero a preparar un lixiviado de la muestra al 0.5%.

Se tomaron 10 tubos del mismo diámetro (16 mm) y se colocó 1 ml. de la solución de la muestra en el primer tubo, 2 ml., en el segundo tubo, 3 ml., en el tercer tubo y así sucesivamente hasta llegar a 10 ml., en el décimo tubo.

Se completó a 10 ml., con agua destilada en todos los tubos, se agitó medio minuto y se dejó en reposo a los tubos por 15 minutos al cabo de los cuales se vio en qué tubo la espuma alcanza 1 cm., de altura (medida convencional).

Si este índice es inferior a 20 puede decirse que la muestra prácticamente no contiene saponinas.

c. Índice hemolítico

Es el número que expresa en ml el volumen en que está disuelto un gramo de droga para producir hemólisis a su máxima dilución.

Para esta determinación se preparó una suspensión de glóbulos rojos, lavados varias veces en centrífuga, con solución de cloruro de sodio al 0,9% de manera que contenía 2 ml de sangre en 100 ml de solución salina.

Por otra parte se hace una lixiviación de la muestra con solución salina al 0,9% para obtener un soluto al 1 x 100.

Se tomaron 11 tubos en una gradilla y se colocó en el primer tubo 0,1 ml de la solución de saponina, en el segundo 0,2 ml, en el tercero 0,3 ml y así sucesivamente hasta llegar a 1 ml; en el tubo N° 10; en el tubo N° 11 no se colocó solución de saponina para que sirva de testigo.

Se agregó a todos los tubos solución salina para completar 5 ml y 5 ml de suspensión de glóbulos rojos, se mezcló por inversión unas cinco veces cada tubo.

A las 15 horas se observa a partir de qué tubo comienza a producirse hemólisis (color rojo transparente). En los tubos en que no se han efectuado hemólisis los glóbulos rojos se habrán sedimentado, quedando el líquido incoloro o ligeramente coloreado.

d. Índice de pez

Es una constante propuesta por Kobert y se define como la concentración de saponina que en 100 ml de solución determina la muerte de un pez de una especie determinada y un peso dado después de una hora de inmersión en la solución.

Los peces que se emplean para este índice son generalmente *Leuciscus rutilus* o *Carassius vulgaris*, de dos a cuatro cm de longitud aproximadamente.

Se operó con lotes de cinco peces *Poecilia reticulata* «gupis» colocados en dosis distintas del extracto acuoso: 0.5%; 1%, 3%, 4% y 5%.

Generalmente cuando se usa una infusión de la muestra al 1% deben morir en el tiempo señalado (1 hora) por lo menos 3 de los 5 peces. Los peces mueren por la acción hemolítica que producen las saponinas en las cavidades braquiales de estos animales.

RESULTADOS

Identificación de saponinas Reacciones de Coloración.

i. Prueba de Liebermann-Burchard.

Se verificó la aparición de una coloración azulada que pasa a anaranjado para luego volverse verde, lo cual nos indicó que la reacción es positiva.

ii. Prueba de Salkowski

Se comprobó la aparición de una coloración anaranjada que nos indicó reacción positiva.

iii. Prueba del α naftol

Se apreció que la reacción fue positiva porque en la interfase se formó un anillo de color violeta.

Valoración de las saponinas

a. Test Afrosimétrico

Se calificó con (+++) por haberse mantenido la espuma por más de 30 minutos.

b. Índice afrosimétrico. (I . A.)

El tubo N° 10 fue el que alcanzó el mayor volumen de espuma lo cual nos significó un I.A. = 200

c. Índice hemolítico

El resultado fue negativo

d. Índice de pez

También fue negativo en el sentido que ninguno de los peces se murió. Sin embargo se pudo apreciar que en las soluciones acuosas al 4% y 5% de nuestra muestra de *Agaricus*, los peces presentaban aspecto hemorrágico (aspecto enrojecido) en la zona branquial y en la zona bucal. (Fig.2)

DISCUSIÓN

Teniendo en consideración que *Agaricus bisporus* pertenece al reino Fungi, es decir es un hongo basidiomiceto, el cual es de uso frecuente en la alimentación humana; hemos logrado el hallazgo de saponinas en la especie referida; sin embargo por los reportes que se tienen en la literatura especializada, estos glucósidos, responsables de producir espuma por agitación en soluciones acuosas, se reportan presentes únicamente en los vegetales, es decir en el Reino Plantae; y excepcionalmente en el reino animal se reporta en los pepinos de mar; pero no en otros grupos taxonómicos o reinos diferentes a los indicados. Sobre la presencia de saponinas en hongos no se

tiene información alguna. Es así que para determinar la existencia de estos glucósidos en *Agaricus bisporus* hemos recurrido a diversos procedimientos que nos permitan aseverar que efectivamente la especie posee saponinas.

El primer procedimiento realizado consistió en extraer las saponinas de las muestras secas y molidas mediante una extracción alcohólica que nos sirvió para realizar las identificaciones por medio de reacciones de coloración. Utilizamos tres reacciones; en donde, la reacción de una sola de ellas nos indicaría la presencia de saponinas; en las tres pruebas realizadas para tal efecto (Liebermann-Burchard Salkowski y α naftol), la reacción fue positiva, lo cual nos permite afirmar que las saponinas están presentes en nuestro material de estudio. Así mismo, el test afrosimétrico nos hizo comprobar la persistencia de la espuma por más de 30 minutos (+++), que también nos indica la existencia de las saponinas. Por lo tanto, lo que nos correspondía realizar es la valoración de las saponinas. Se efectuó el Índice Afrosimétrico, que es la valoración físico-química de la capacidad de producir espuma que tienen las saponinas. Por lo general se efectúa con un lixiviado de la muestra al 1%, cuando hay moderadas concentraciones de saponinas; con *Agaricus* lo hicimos en una proporción de 0.5% lo cual nos hizo cuantificar un Índice Afrosimétrico de 200; considerando que valores por debajo de IA. = 20 se estima que prácticamente no presenta saponinas; nuestra muestra, por lo tanto, presenta abundante proporción de saponinas.

También realizamos pruebas de valoración biológica, como es el Índice Hemolítico y el Índice de Pez, con la finalidad de comprobar si presenta alguna acción tóxica o negativa con respecto a la capacidad hemolítica que se le atribuye a las saponinas. Dichas pruebas fueron negativas. La primera se efectuó con eritrocitos de carnero *in vitro* y la segunda con pececillos *in vivo*. Debemos indicar que en la evaluación con los peces se debe de verificar la muerte de tres de los cinco peces que se han sumergido en soluciones de diversa concentración de nuestra materia de estudio. A pesar que no murió

ninguno de los peces, en las soluciones acuosas al 4% y 5% de nuestra muestra de *Agaricus*, los peces presentaban aspecto hemorrágico (aspecto enrojecido) en la zona branquial y en la zona de la boca. Lo cual a su vez también nos sirve para verificar la presencia de saponinas, puesto que se presentó una cierta acción hemorrágica.

CONCLUSIONES

1. Se comprobó la presencia de saponinas en *Agaricus bisporus* por medio de tres reacciones de coloración.
2. Las saponinas presentes en *A. bisporus* tienen un Índice Afrosimétrico de 200.
3. Las saponinas presentes en *A. bisporus* no presentan una acción tóxica sobre los eritrocitos, es decir no tienen acción hemolítica tanto *in vitro* como *in vivo*.

LITERATURA CITADA

SALVAT. 1989. Gran enciclopedia de Plantas e Invertebrados. Ed. Salvat. Vol.6:36-37. México

SCHEIDER, WILLIAM. 1985. Nutrición, conceptos básicos y Aplicaciones. Ed. Mc Graw Hill. México

STRASBURGER, E. y COL. 1985. Tratado de Botánica. Ed. Marin. 7ª edición pp. 665 – 688.

TELIN L; GRAHAN HD; 1983 Cheeke PR. Biological properties and nutritional significance of legume saponins. Leaf Protein Concentrates. A.V.J. Connecticut:396-414.

RODRIGUEZ M. 1986. Detección de saponinas en *Randia quereensis*. Chilpancingo: Universidad Autónoma de Guerrero, México.

SEGAL R, MANSOUR N, SAITSCHKEK DV., 1966. Effect of ester groups on the effect haemolytic of some saponins and sapogenins. Biochem Pharmacol 15:1411-16.

HERNÁNDEZ ROYERO, R. 1997 Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa* Willd. Rev. Cubana Medicina Militar; 26(1):55-62.



Figura 1. Hongo *Agaricus bisporus*



Figura 2. Índice de pez