

A OCORRÊNCIA DE ESPUMÍFEROS TÓXICOS (SAPONINAS) EM BEBIDAS¹

AMARO HENRIQUE DE SOUZA¹

Sinopse

O autor confirmou a existência de forte concentração de saponinas hemolíticas no produto inglês denominado "Foamine", destinado às cervejas e refrigerantes como espumífero e vendido no mercado brasileiro durante 30 anos, rotulado com o nome "Extrato de Alcaçuz", cujas primeiras pesquisas foram conduzidas no Laboratório Nacional de Análises do Rio de Janeiro pelos químicos Raquel Nifhler e Dinah Viana Feijó. Nos ensaios comparativos do índice hemolítico, o autor notou que os extratos genuínos de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*, L.) e da erva-macacá (*Leonurus sibiricus*, L.), plantas tradicionalmente medicinais e atóxicas, embora espumíferas, não determinaram hemólise do sangue vermelho de carneiro ou humano. Todavia, a "Foamine" se comportou, no peder hemolítico, semelhantemente aos extratos de panamá (*Quillaia saponaria*, Molina), juazeiro (*Ziziphus joazeiro*, M.) e da salsaparrilha (*Smilax officinalis*, Kunth), estando na razão de dez por milhão. O autor passa em revista os ensaios físicos para determinar as saponinas, enfatizando e ressaltando, porém, o método fisiológico ou seja pelo índice hemolítico.

INTRODUÇÃO

Anos depois do nosso ingresso no Instituto de Fermentação (IF), tivemos oportunidade de analisar e condenar duas espumatinas² (Souza 1955), por encerrarem saponina, de natureza tóxica e condenada pela Saúde Pública (Decreto n.º 16.300 - 1923; Decreto n.º 9.688 - 1949).

Um dos espumíferos se intitulava "Espumantina Vegetal" e em sua fórmula constava "fruto de sabonete de macaco" (*Sapindus saponaris*, L.), sabidamente rico em saponina hemolítica.

O outro produto trazia o nome de "Espumantina Salsaparrilha" (*Smilax officinalis*, Kunth), droga vegetal também portadora de larga percentagem daquele glicosídeo.

Recentemente, fomos solicitados a analisar e emitir parecer sobre uma espumantina de origem inglesa, cujo bonito e vistoso rótulo trazia o nome de "Extrato de Alcaçuz", marca "Foamine".

Este produto, conforme certificados apresentados por um dos representantes da firma importadora, fô-

ra, inicialmente, registrado em 1929 pelo Serviço do Policiamento da Alimentação Pública (SPAP), do Estado de São Paulo. Baseando-se nesse registro, o IF, em 1948, concedeu também licença para consumo no Brasil. O Laboratório Bromatológico, por sua vez, segundo ainda informação do representante da firma importadora, concedeu também registro ao mencionado "Extrato de Alcaçuz".

Entretanto, análises feitas, recentemente, no Laboratório Nacional de Análises (LNA) pelas colegas Raquel Nifhler e Dinah V. Feijó, revelaram a presença de saponina nesse produto. Isto foi confirmado pelo Prof. Oswaldo de Almeida Costa, que já havia elaborado longo trabalho sobre esse glicosídeo (Costa 1931).

O presente trabalho visa confirmar a presença de saponina na amostra da "Foamine" ensaiada pelas colegas do LNA e determinar o seu índice hemolítico, comparando-o com as drogas hemolíticas e não hemolíticas.

EXPERIMENTAÇÃO

Características da "Foamine" e dos extratos genuínos de alcaçuz

Para maior segurança dos nossos estudos, tomamos dois extrato fluídos de raiz de alcaçuz e os ensaiamos comparativamente com a "Foamine", que trazia também o nome de "Extrato de Alcaçuz", cujos resultados passamos a reproduzir:

¹ Recebido em 23 de julho de 1968 e aceito para publicação em 21 de março de 1969.

Boletim Técnico n.º 1 do Instituto de Fermentação.

² Chefe da Seção de Química, Instituto de Fermentação, Ministério da Agricultura, Largo Misericórdia s/n.º, Rio de Janeiro, CB, membro titular da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (Código Brasileiro de Alimentos) e da Academia Nacional de Farmácia.

³ O vocábulo espumantina é um neologismo criado por certos industriais e ainda não consignado nos dicionários; significa "produto que produz espuma".

Extrato fluido de raiz de alcaçuz. Líquido castanho avermelhado, límpido, de sabor fortemente adocicado devido à glicirrizina, um dos constituintes do alcaçuz, que, segundo Osol e Farrar (1955) é 50 vezes mais doce que a sacarose.

Diluído nágua, produz abundante espuma, pela agitação.

Cheiro "sui generis" do alcaçuz.

"Foamine" (pseudo Extrato de Alcaçuz). Líquido castanho avermelhado, límpido, de sabor acre, com cheiro de caramelo.

Diluído nágua e pela agitação, determinou formação abundante de espuma.

Pesquisa de saponina pelo Método de Rosenthaler e Schellas

Para a pesquisa de saponina no "Extrato fluido genuíno de alcaçuz" e na "Foamine", seguimos o método preconizado por Costa (1931), que é de autoria de Rosenthaler e Schellas.

Consiste o mesmo em tratar 50 a 100 ml do soluto em análise com cerca de 2 ml de ácido clorídrico concentrado e levar ao banho-maria (cerca de 90°C) até que não mais se forme espuma, pela agitação. Sem filtrar, esgotar o líquido ainda morno com metade de seu volume de éter acético. Decantar este e lavar com pequenas quantidades de água (5 a 10 ml) até que as águas de lavagem não precipitem mais com soluto de nitrato de prata. Evaporar, então, o éter acético. Se o resíduo fôr muito escuro, dissolver novamente e decorar pelo carvão animal.

No resíduo da evaporação purificado, proceder às reações comuns às saponinas.

O presente processo se baseia na hidrólise parcial das saponinas, nas condições acima descritas.

Tratando-se o resíduo acima descrito pelo H_2SO_4 , observa-se o seguinte:

A pro-sapogenina se dissolve no ácido sulfúrico concentrado, produzindo coloração vermelho-alaranjada, que passa, pouco a pouco, ao vermelho-cereja depois ao violeta.

Os resultados dos ensaios mostraram:

- a) Extrato fluido de Alcaçuz .. Reação negativa
b) "Foamine" Reação positiva

Índice hemolítico (prova fisiológica)

Apresentamos a técnica que estabelecemos para a determinação do índice hemolítico das saponinas, que se segue:

a) tomar sangue de carneiro ou de homem, desfi-brinado com o auxílio do citrato de sódio ou fluoreto de sódio;

b) passar uma parte do sangue para os tubos do centrífugador previamente esterilizados, e vaziar soro fisiológico (NaCl 9%); agitar e depois centrifugar;

c) eliminar o líquido sobrenadante e repetir a operação até que este se apresente incolor;

d) diluir as hemátias lavadas com soro fisiológico, de modo a formar um soluto a 20%;

e) tomar uma estante com 6 tubos de hemólise (microtubos), bem lavados e previamente esterilizados; vaziar, inicialmente, 4,5 ml de soro fisiológico em cada tubo e, em seguida, 0,5 ml do soluto suspeito da existência de saponina no 1.º tubo da escala; agitá-lo, lavar a pipeta com o mesmo soro fisiológico (contido no 1.º tubo), pipetando depois 0,5 ml deste soluto (dil. 1:10), para o 2.º tubo (dil. 1:100); executando a mesma operação antecedente; passar depois 0,5 ml para o 3.º tubo (dil. 1:1.000) e assim sucessivamente até o 6.º tubo (dil. 1:1 milhão), como mostra o Quadro 1;

f) em seguida, vaziar em cada tubo 0,2 ml do soluto de hemátias de carneiro ou de homem (20%);

g) deixar em temperatura ambiente, agitando de quando em quando; fazer a leitura no dia seguinte;

h) na leitura registrar até onde se processou a hemólise e o grau dessa hemólise: total, parcial ou vestígios.

Querendo-se maior precisão, podem-se fazer novas diluições, partindo-se do último tubo onde houve hemólise total.

O Quadro 1 sintetiza a técnica que estabelecemos para determinar o índice hemolítico das drogas sa-

QUADRO 1. Técnica para determinar o índice hemolítico das drogas saponínicas

Etapas	Microtubos					
	1	2	3	4	5	6
Soro fisiológico	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Produto (soluto)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluição	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Hemátias (soluto)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

ponínicas ou seus solutos, oriundos de infusões e de decoções das mesmas.

Para melhor elucidar a questão da saponina, contida em alta concentração no produto importado ("Foamine"), fizemos um estudo comparativo, pesquisando e determinando o índice hemolítico de extratos de plantas saponíferas já estudadas e de plantas não estudadas sob esse aspecto, cujos resultados estão apresentados no Quadro 2. E uma vez que a "Foamine" importada era usada como espumífero em certos refrigerantes e cervejas, verificamos se havia ação hemolítica dessas bebidas.

Nesta parte, felizmente, os resultados foram negativos.

Devemos, ainda, mencionar que as cascas e caules das plantas usadas em nossas experimentações foram adquiridos em dois ervanários desta cidade (Rio de Janeiro).

Na preparação dos extratos aquosos, empregamos a seguinte técnica: tomamos 1 g de casca ou caule, já seco ao ar, passamos para um gral e vazamos um pouco de areia de quartzo; fizemos uma trituração até reduzir o vegetal a pó fino; vazamos depois, no mesmo, água aquecida (com cerca de 80°C) e com-

pletamos para 100 ml (líquido resfriado), formando, então, um soluto a 1%.

Mormente com a "Foamine", fizemos quatro ou mais determinações do índice hemolítico, havendo sempre concordância de resultado, com exceção apenas de um, a "Foamine" hemolisou acima de 10⁻⁶.

Mameli (1927) afirmou que o reconhecimento químico da saponina deve ser sempre seguido da prova fisiológica direta, de modo a estabelecer seu poder hemolítico. Também achamos que não podemos condenar um determinado produto da natureza dêsse em tela somente pela prova química, sujeita a interpretações duvidosas.

Por outro lado, Thomé e Prediger (1950) verificaram que a velocidade da hemólise varia assinaladamente com diferentes saponinas. Com uma dada saponina, a velocidade varia com a espécie de glóbulo vermelho do sangue, sendo o mínimo para o homem e o máximo para o carneiro. Depois concluíram que o índice hemolítico das saponinas não é uma medida exata de sua atividade, exceto sob condições controladas e o uso de padrões.

Fuchs e Koch (1950) aconselham, na determinação do índice hemolítico, que os tubos de hemólise

QUADRO 2. Comparação do índice hemolítico da "Foamine" e, de extratos de plantas saponíferas, refrigerantes, cervejas e um detergente

Produtos ^a	Hemátias ^b	Diluição					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Foamine "A"	(1)	+++ ^c	+++	+++	+++	++	0
Foamine "B"	(2)	+++	+++	+++	+++	++	0
Foamine "A"	(2)	+++	+++	+++	+++	++	0
Foamine "B"	(1)	+++	+++	+++	+++	+++	0
Alcaçuz I	(1)	0	0	0	0	0	0
Alcaçuz II	(1)	0	0	0	0	0	0
Alcaçuz I	(2)	0	0	0	0	0	0
Alcaçuz II	(2)	0	0	0	0	0	0
Panamá	(1)	+++	+++	+++	+++	++	0
Panamá	(2)	+++	+++	+++	+++	++	0
Juazeiro	(1)	+++	+++	+++	0	0	0
Juazeiro	(2)	+++	+++	+++	0	0	0
Salsaparrilha	(1)	+++	+++	+++	+	0	0
Saponária	(1)	+++	++	+	0	0	0
Erva-macacá	(1)	0	0	0	0	0	0
"Duponal"	(2)	+++	+++	+++	+++	++	0
Mate (refrig.)	(2)	0	0	0	0	0	0
Guaraná (refrig.)	(2)	0	0	0	0	0	0
Brahma Chopp	(2)	0	0	0	0	0	0
Coca-cola	(2)	0	0	0	0	0	0
Cerveja Caracu	(1)	0	0	0	0	0	0

^a Foamine "A": *in natura*, com pH=5,0; Foamine "B": neutralizada com NaHCO₃; Alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) I (extrato aquoso); Alcaçuz II (extrato hidro-alc.); Panamá (*Quillaja saponaria* Molina); Juazeiro (*Ziziphus joazeiro* M.); Salsaparrilha (*Smilax officinalis* Kunth); Saponária (*Saponaria* sp.); Erva-macacá (*Lenurus sibiricus* L.); "Duponal" — Detergente sintético.

^b (1) Hemátias de carneiro; (2) Hemátias de homem.

^c +++ Hemólise total; ++ Hemólise parcial; + Vestígios hemólise.

(microtubos) devem ser cuidadosamente agitados 12, 16 e 20 horas após a mistura, fazendo a leitura após 24 horas e novamente 12 horas mais tarde. A temperatura deve estar compreendida, preferentemente entre 15 e 20°C. A explicação para esse prolongado tempo de contato é dada pela variação de velocidade de hemólise das saponinas, conforme assinalaram Thomé e Prediger (1950).

Jung e With (1950), estudando a digitonina, determinaram o índice hemolítico usando eritrócitos de carneiro, boi, homem, coelho, cão, pombo, cobaia e cabra em várias concentrações; concluíram que, quando as hemátias de diferentes animais têm a mesma concentração, sua resistência à digitonina é praticamente a mesma.

Alguns autores preconizam os métodos físicos, baseados na medida da tensão superficial, para a determinação das saponinas, usando-se o estalagnômetro e a ampola de pressão. Entre nós, Wasicky (1942), não achando significativos os resultados pelo método da formação de espuma, estudou um outro método físico, cujo princípio, assaz específico, consiste no Sudan III em álcool benzílico juntado às soluções de saponina e mantido em solução coloidal.

Como iremos frisar posteriormente, parece que os métodos físicos não indicam resultados concordantes na determinação das saponinas, o que é suportado pelas observações de Wasicky e Hoehne (1951).

Reitstötter e Schipke (1951), determinando saponinas pelos métodos físicos, chegaram à seguinte conclusão: "Valores obtidos com o estalagnômetro não concordam com os adquiridos pelo método da ampola de pressão. Tensões superficiais de solução de saponina não acompanham a equação de Gibbs e Vollmer. O método pode ser usado, entretanto, se se fizer uma curva com uma dada concentração de um determinado tipo de saponina".

Por outro lado, Awe e Hänslerman (1951) combinaram o método pela tensão superficial com ou pelo índice hemolítico para avaliar o conteúdo de saponina em extratos vegetais.

Okano (1948) constatou que o extrato aquoso da soja crua foi tóxico para ratos e que a extração do óleo da soja com éter sulfúrico ou benzeno não modificou a toxicidade dessa leguminosa, porém, o tratamento da soja crua com etanol eliminou a toxicidade, devido à desnaturação da proteína. Também a extração aquosa da proteína, com aquecimento ou acidificação, a tornou atóxica. Ainda, a toxicidade foi muito instável, porém, a solução de albumina purificada tem uma toxicidade relativamente durável. A saponina separada da soja crua tem poder hemolítico, enquanto que a precipitada da soja aquecida tem pequeno ou nenhum poder hemolítico. A saponina purificada com poder hemolítico não o perdeu, mesmo após o aquecimento da solução do seu sal sódico; porém, esta toxicidade da saponina foi fraca para ratos.

Lininer (1946) também abordou a ocorrência de saponinas em leguminosas.

Como já tivemos ensejo de falar, a literatura científica está cheia de trabalhos em torno das saponinas.

As referências feitas foram extremamente pequenas, porém, deram uma pálida amostra da importância do assunto, mormente na Bromatologia.

CONCLUSÕES

O produto inglês, rotulado "Extrato de Alcaçuz — Foamine", encerra elevada concentração de saponina, caracterizada pela reação de Rosenthaler e Schellas e confirmada pelo índice hemolítico.

O alcaçuz (raiz), apesar de os seus extratos, quando diluídos, determinarem, pela agitação, abundante formação de espuma, devido a um dos seus principais constituintes — a glicirrizina — não provocou hemólise nos glóbulos vermelhos do sangue de carneiro e de homem.

A erva-macacá (*Leonurus sibiricus* L.), outra planta espumífera, através de seus extratos, também não hemolisou os eritrócitos.

O pH ácido, nas baixas diluições, motiva, inicialmente, aglutinação, escurecimento e depois hemólise dos glóbulos vermelhos do sangue, podendo influir no índice hemolítico de extratos com baixa concentração de saponina. Porém, na "Foamine", panamá, juazeiro, salsaparrilha, saponária e outros, extratos ácidos neutralizados com NaHCO₃, não se assinalaram variações no índice, dada a alta concentração da saponina.

Os métodos físicos para a determinação das saponinas, tais como o pelo estalagnômetro (espécie de conta-gôtas), o da ampola de pressão, o da formação de espuma e o pelo Sudan III (os dois últimos estudados por Wasicky 1942), quase todos baseados na função da tensão superficial dos solutos (concentração molecular na superfície tornando a solução mais viscosa, característica necessária para um espumífero), não apresentam resultados concordantes e estão sujeitos a causas de erro. Uma dessas causas de erro seria a determinação duma saponina em mistura com espumíferos atóxicos e não hemolíticos, como a *Glycyrrhiza glabra* L., *Leonurus sibiricus* L. e outros.

⁴ Dentre eles, merece especial referência o magnífico trabalho de George (1965), que abordou as saponinas sobre variados aspectos: composição, ocorrência, usos, toxicidade, etc. Nesse trabalho, o Autor relacionou, também, vários Países da América do Sul e Central, Europa, África e Estados Norte-Americanos que condenam seu uso na Bromatologia.

O próprio Wasicky (1942), que havia estudado dois métodos físicos, assevera que o "método de dosagem mais empregado atualmente para as saponinas e drogas que encerra saponina é o hemolítico, que consiste em procurar a menor concentração das soluções de saponinas ou de extratos de saponinas, capaz de provocar a hemólise total em certo volume de sangue diluído".

A "Foamine" (extrato concentrado de saponina), por ter sido registrada no SPAP de São Paulo, no Laboratório Bromatológico e no IF como "Extrato de Alcaçuz", era consumida entre nós durante 30 anos em certos refrigerantes e cervejas, conforme informação do seu importador exclusivo, Sr. Eduardo Pinto da Fonseca.

Os Regulamentos Bromatológicos proíbem o emprego de saponina em alimentos e bebidas.

A fraude pela junção das saponinas em alimentos e bebidas, bem assim o estudo de métodos para sua pesquisa e dosagem, já se verificavam nos primórdios do século XX, conforme nos revelam Loucheux (1912), Campos (1915) e Mameli (1927).

O "Duponal", detergente sintético, tem forte poder hemolítico (hemólise total até 10⁻⁴).

REFERÊNCIAS

Awe, W. & Hanserman, H. 1950. Evaluation of saponin containing plant extracts by measurement of surface tension and determination of hemolytic index. Arch. Pharm. u. Ber. deutsch. pharm. Ges. 283(55):7-25. (Biol. Abstr. 25, 9071)

- Campos, N. de 1915. Contribuição para a pesquisa da saponina nas bebidas espumantes. Revta Quim. Fis. puras e aplicadas, Rio de J., 3:30-39.
- Costa, O.A. 1931. Contribuição à pesquisa das saponinas. Revta Soc. bras. Quim. 10(2):476-484.
- Fuchs, L. & Koch, J. 1930. Hemólise pela saponina. III. Proporção da hemólise por várias saponinas. Scientia pharm. 18:85-92. (Chem. Abstr. 44, 10929a)
- George, A.J. 1965. Legal status and toxicity of saponins. F. Cosmet. Toxicol. 3:85-91.
- Jung, F. & Wirth, L. 1950. Arch. expil. Path. Pharmacol. 210:328-335. (Chem. Abstr. 43, 5811g; ibid. 45, 5284i)
- Limner, W. 1946. The occurrence of saponins in the leguminosae. Pharmazie 1(4):177-182. (Biol. Abstr. 25, 1105)
- Loucheux, M. 1912. Pesquisa das saponinas nos produtos vendidos para fazer espumar as bebidas. Rép. Pharmacie 9:399.
- Mameli, E. 1927. Chimica tossicologica. Unione Tipografico, Editrice Torinese, Torino, p. 509-510.
- Osol & Farrar 1955. Dispensatory. 25th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, p. 619.
- Okano, K. 1948. A proteína tóxica da soja crua. Reação hemolítica da saponina da soja. J. agr. chem. Soc. Japan 22:23-24. (Chem. Abstr. 46, 5197d)
- Regulamento do Departamento Nacional de Saúde Pública 1923. Dec. n.º 16.300 de 31 de dezembro, Imprensa Nacional, 1932, Rio de Janeiro.
- Regulamento do Policiamento da Alimentação Pública do D.F. e S. Paulo 1949. Dec. n.º 9.688 de 11 de abril. Diário Oficial n.º 86, Capital Federal, 4.ª feira, 13 abr. 1949.
- Reilstötter, J. & Schipke, F. 1951. Determinação de saponinas pela medida da tensão superficial. Arch. Pharm. 284:101-106. (Chem. Abstr. 44, 7026d; ibid. 45, 10496)
- Souza, A.H. de 1955. Sobre o registro de espumantinas vegetais. Revta Téc. Bebidas, Rio de J., 5:17.
- Thomé, J.S. & Prediger, F. 1950. Hemólise com saponina. Z. physiol. Chem. 286:127-138. (Chem. Abstr. 45, 3444h)
- Wasicky, R. 1942. Novo método para dosagem das saponinas. Revta Soc. bras. Quim. 11(2):71.
- Wasicky, R. & Hoehne, W. 1951. Conteúdo em saponinas brutas de algumas plantas brasileiras. Anais Fac. Farm. Odont. Univ. S. Paulo 9:17.

OCCURRENCE OF TOXIC SAPONIN IN DRINKS

Abstract

The author confirmed the existence of strong concentrations of saponin in the English product named "Foamine", that has been sold for the last 30 years in Brazilian markets as "Liquorice Extract". The first investigations were conducted in the National Analytical Laboratory of the Brazilian Government by chemists, Raquel Nifhler and Dinah Viana Feijó. In comparative essays of the hemolytic index the author found that although the genuine extracts of liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) are toxic foaming drugs, they do not cause sheep or human red blood hemolysis. Nevertheless, "Foamine" produced hemolytic activity similar to extracts of "panamá" (*Quillaja saponaria* Molina), "juazeiro" (*Ziziphus joazeiro* M.) and "salsaparrilha" (*Smilax officinalis* Kunth) with hemolysis occurring at ratios of ten parts per million. The author reviews the physical essays for determination of saponines, emphasizing however physiological methods such as the hemolytic index. Besides a general table showing the results of the experiments, the result of several other workers, in saponines, are tabulated. Thirty five bibliographic references are cited.