

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

116

ESTUDIO SOBRE EL CONTENIDO DE GLUCOSIDOS
CIANOGENICOS EN ALGUNAS VARIETADES DE --
FRIJOL (Ph. vulgaris) CULTIVADOS EN MEXICO.

MA. DEL CARMEN LOPEZ REYES

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AS TESIS 1979
ADE M.C.
FECHA 203
PROC _____
S _____



PRESIDENTE: Prof. Ignacio Díez de Urdanivia.
VOCAL: Prof. Ninfa Guerrero de Callejas.
SECRETARIO: Prof. Rubén Berra García-Coss.
1er. SUPLENTE: Prof. Andrea Gabayet Martín.
2o. SUPLENTE: Prof. Arturo Pérez Alonso.

Jurado asignado originalmente según el Tema.

Sitio donde se desarrolló el Tema:

Departamento de Alimentos
División de Estudios Superiores
Facultad de Química
U.N.A.M.

Sustentante: Ma. del Carmen López Reyes.

Asesor del Tema: M. en C. Rubén Berra García-Coss.

Todos navegamos
en el mismo barco,
en un mar tormento
so, y nos debemos-
una terrible leal-
tad mutua.

- G.K. Chesterton.

A tí

I N D I C E

	Página.
I. OBJETIVO	I
II. INTRODUCCION	2
A. Importancia del frijol en México	3
B. Glucósidos cianogénicos.	
1. Antecedentes	5
2. Toxicidad	10
3. Toxicidad crónica	12
4. Mecanismos de desintoxicación	17
III. MATERIALES Y METODOS.	
A. Método de extracción	20
B. Método de cuantificación	21
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSION	27
VI. CONCLUSIONES	32
VII. BIBLIOGRAFIA	35

I. OBJETIVOS.

El frijol (Phaseolus vulgaris), es la leguminosa más cultivada en México, dándose diversas variedades, de las que el frijol negro constituye la más ampliamente cultivada.

Las leguminosas en estado crudo contienen varias sustancias tóxicas, entre ellas los glucósidos cianogénicos.

Dada la importancia del frijol y debido a que el núcleo principal de consumidores presentan diferentes grados de desnutrición, surgió como uno de los objetivos de éste trabajo el poder conocer el contenido de glucósidos cianogénicos presentes en las variedades de frijol más consumidas en el País.

El segundo objetivo fué el de encontrar un método de análisis fácil de reproducir en un laboratorio, usando un equipo común en ellos y además que la técnica empleada fuera más sensitiva que la reportada en la literatura tradicional.

II. INTRODUCCION.

Las leguminosas fueron uno de los primeros cultivos -- comestibles practicados por el hombre.

En México se han encontrado restos de melones, calabazas, pimienta y frijoles (Ph. vulgaris) a los que mediante el carbono radiactivo se les ha atribuído una antigüedad de 4 000 años A.de J. (Aykroyd, 1964)

Los antiguos americanos cultivaron el frijol entre las plantas de maíz desde las épocas más remotas y desde entonces los frijoles forman parte del régimen alimenticio de -- los habitantes de América Latina.

El frijol común (Ph. vulgaris) es un miembro de la familia leguminosae; ésta familia comprende unos 600 géneros y 13 000 especies.

Se ha demostrado de manera concluyente que las leguminosas difieren de otros vegetales, merced a las bacterias simbióticas de los nódulos radicales, ya que tienen la propiedad de obtener el nitrógeno combinado e incorporarlo a los demás elementos nutricios, tomándolo de la inagotable provisión de nitrógeno libre de la atmósfera.

Una parte del nitrógeno asimilado sirve para formar -- proteínas propias, mientras el resto se incorpora al suelo enriqueciéndolo.

Las bacterias del género Rhizobium derivan su energía-

de la planta hospedante, la cual a su vez recibe el nitrógeno que las bacterias han fijado y puesto a disposición -- del vegetal. El elevado contenido proteico y la independencia respecto al nitrógeno del suelo explican en gran parte la importancia que para la agricultura tienen las leguminosas.

A. Importancia del frijol en México.

Hoy en día el frijol constituye la leguminosa principal cultivada en México, como se muestra en el cuadro I.

En estudios realizados por medio de encuestas se ha observado que la región y la zona que se habita influye demasiado en el consumo per-capita de frijol. (cuadro II)

Los datos son muy semejantes a los reportados en el período de 1959-1962 lo que indica que la dieta del mexicano no ha variado considerablemente.

En los países subdesarrollados son escasos los suministros de alimentos de origen animal, por lo que las leguminosas tienen gran importancia en su alimentación.

Con el cuadro III se puede establecer una comparación entre el consumo nacional y el mundial de leguminosas.

En los 19 países que presentan un suministro de leguminosas de 13 g o menos por persona por día, existe un promedio de 53 g diarios de proteína de origen animal por persona. A comparación de los 11 países cuya disponibilidad de leguminosas oscilan entre 29 y 71 g , las cifras indican

Cuadro I. Relación entre la superficie cosechada, rendimiento por Ha., y producción anual de frijol en 1970-1977.

Año	Superficie cosechada	Rendimiento por Ha.	Producción anual
	miles Ha.	Kg	miles Ton
1970	1 747	16 121	925
1971	1 932	14 985	921
1972	1 687	15 342	869
1973	1 870	15 722	1 009
1974	1 552	17 987	971
1975	1 753	12 764	1 027
1976	1 316	16 602	740
1977	1 506	17 214	745 P/
P/ cifra preliminar.			

Cuadro II. Regiones de la República donde el consumo de frijol es alto.

<u>ZONAS</u>	g peso bruto por per sona por día.
<u>Zona Norte</u>	
Agua Prieta, Son.	73.6
Concordia, Sin.	60
Finisterre, Coah.	84
Sn José de Raíces, N.L.	73
<u>Zona Centro Occidente</u>	
Almoloya, Hgo.	57.3
Acuexcomac, Pue.	82
Tlaxcala, Tlax.	90
Juchitlán, Jal.	60
<u>Zona Sur</u>	
Sn Jorge Nuchita, Oax.	42
Zinacantan, Chis.	72
<u>Periferia Cd., de México</u>	
Tlalpan	62-71

Fuente: Encuestas Nutricionales en México, (1963-1974)

Cuadro III. Suministro de leguminosas en 30 países.

(g por persona diarios)

Alemania Fed		Dinamarca	8-13
Suecia		Francia	8-13
Nva. Zelanda		Reino Unido ..	8-13
Uruguay		Sudáfrica	8-13
Bélgica		Italia	16
Luxemburgo		Israel	16
Finlandia		Ceilan	16
Suiza	3-7	Grecia	29
Irlanda		Ecuador	36
Países Bajos		Honduras	36
Noruega		Paraguay	44
Argentina		Japón	50
Austria		MEXICO	51
Australia		Brasil	68
Canadá		India	71

(Fuente: Aykroyd, 1964)

la existencia de una relación inversa entre los suministros de leguminosas y los de alimentos de origen animal.

El valor de una proteína depende de su contenido en aminoácidos esenciales, si una proteína carece por completo de un aminoácido esencial su valor biológico es nulo. Las proteínas de la leguminosa son una fuente pobre de aminoácidos sulfurados como la metionina y cisteína, pero en general tienen un elevado contenido de lisina. Este último aminoácido se encuentra deficiente en los cereales por lo que existe una relación complementaria entre las proteínas de los cereales y las de leguminosas.

Dada la importancia de las leguminosas en la nutrición humana nos lleva a considerar un aspecto muy importante y es el relacionado con la toxicidad debida a la presencia de hemaglutininas, factores antitripsicos, saponinas tóxicas y los glucósidos cianogénicos.

Los factores antitripsicos y las hemaglutininas son destruidos por calentamiento a 121°C durante 5 min., pero los glucósidos cianogénicos, objetivo de éste trabajo, son estables al calor. (Conn, 1975)

B. Glucósidos Cianogénicos.

1. Antecedentes.

El cianuro se encuentra en cantidades trazas en casi todo el reino vegetal y está mayormente en forma de glucósidos cianogénicos. El fenómeno de la cianogénesis ocurre ampliamente en plantas superiores, aunque también se presenta en bacterias y hongos. Se conocen algo menos de 800 especies de plantas representantes de 70 u 80 familias como hongos, gimnospermas, monocotiledóneas, dicotiledóneas, angiospermas y algunos insectos. (Seigler, 1975)

Los glucósidos cianogénicos se localizan en todas las partes de la planta, en una mayor cantidad en las hojas y en la corteza de la raíz y en menor cantidad en las semillas y en el resto de la planta. (Montgomery, 1969)

Al continuar con los estudios sobre la distribución de los glucósidos cianogénicos se llegó a sugerir un posible transporte dentro de la planta. Con el fin de aclarar éste punto se realizaron una serie de experimentos consistentes en cortar un trozo de tallo de la planta, observándose en los primeros días después del corte un incremento en la concentración de los glucósidos en más del 100% en las zonas cercanas a la incisión. Esta acumulación se mantiene aproximadamente por dos meses, pero éste incremento no se observa cuando las hojas son eliminadas, al mismo ---

tiempo se observó una disminución en el contenido de glucósidos cianogénicos presentes en la raíz. (De Bruijn, 1973)

De los experimentos anteriores se concluyó que existe efectivamente un transporte y acumulación de los glucósidos dentro de la planta. Esto es importante, ya que se puede establecer una relación entre el porcentaje de daño que sufre la planta y el aumento en la cantidad de glucósidos cianogénicos en las partes aéreas de la planta.

Otros factores que influyen en la cantidad de glucósidos cianogénicos son los del medio ambiente tales como la cantidad de sol, la situación geográfica, el clima, el método de cultivo, la edad de la planta, también se observa un aumento con la adición de fertilizantes, el uso de diferentes sistemas de irrigación y el uso de pesticidas, no obstante lo anterior el factor más importante es la constitución genética, ya que las diversas variedades reaccionan en distinta forma a condiciones ecológicas diferentes.

La cianogénesis también está relacionada con el metabolismo de proteínas (cuadro IV) debido a que algunos aminoácidos sirven como precursores de los aglicomas como son la valina, isoleucina, fenilalanina y la tirosina. (Seigler, 1974)

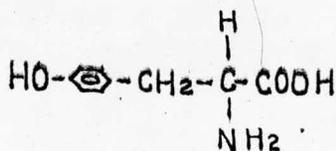
Los glucósidos cianogénicos se encuentran en alimentos que son consumidos habitualmente por el hombre como son: la casava, la yuca, la papa dulce, el yam, maíz, sorgo, bambú-

Cuadro IV. Aminoácidos precursores de
Glucósidos Cianogénicos.

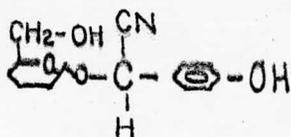
AMINOACIDOS

GLUCOSIDOS CIANOGENICOS

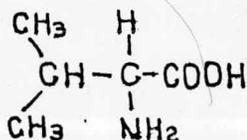
Tirosina



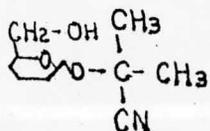
Dhurrin



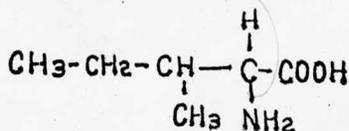
L-valina



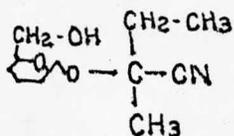
Linamarin



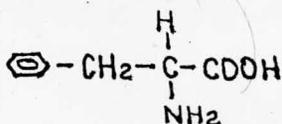
L-isoleucina



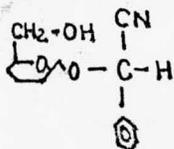
Lotaustralin



L-fenilalanina



Prunasin



Fuente: Seigler, 1974.

caña de azúcar, chícharos, frijol, almendras, también se --
encuentra en huesos de durazno, limón, lima, manzana, pera,
albaricoque, ciruela y mamey. (Montgomery, 1969)

Hay dos tipos de compuestos cianogénicos, los glucósi--
 dos cianogénicos y los cianolípidos, ambos son derivados --
 del hidroxinitrilo, pero los cianolípidos sólo se encuen---
 tran en las semillas oleaginosas. (Seigler, 1970,1975)

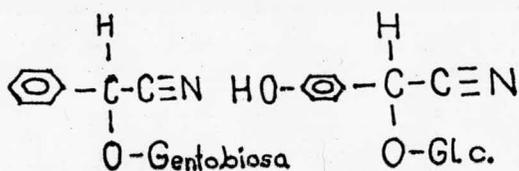
Los glucósidos cianogénicos pueden ser definidos como--
derivados glucosídicos del hidroxinitrilo (C_6H_5OHCN) contie
nen como azúcar un monosacárido (generalmente glucosa) o di
sacárido como la vicianosa y gentobiosa. (Conn, 1973)

En las plantas comestibles han sido identificados tres--
glucósidos cianogénicos, el amigdalín, dhurrín y linamarín.

(cuadro V), el amigdalín fué el primero identificado en --
las almendras amargas y también está presente en el hueso --
de algunas frutas. El dhurrín está presente en el sorgo y --
otros granos y el linamarín conocido como phaseolunatin es --
el glucósido de las legumbres, semillas de lino y casava.

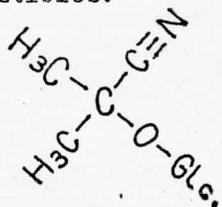
La importancia de los glucósidos cianogénicos radica en
que al hidrolizarse liberan ácido cianhídrico, la reacción-
inicial es la hidrólisis del enlace glucosídico por una --
(β -glucósidasa para formar el azúcar libre y el aglicoma, =
un -hidroxinitrilo (cianhidrin). La segunda reacción es--
la hidrólisis del -hidroxinitrilo a HCN y un aldehído o ce
tona. (Conn, 1973)

Cuadro V. Glucósidos Cianogénicos identificados en plantas comestibles.



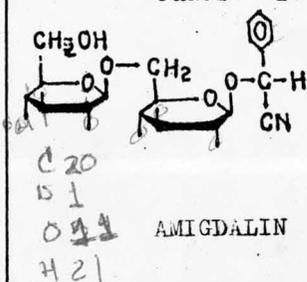
AMIGDALIN

DHURRIN

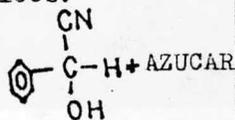


LINAMARIN

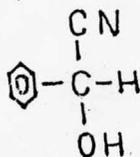
Cuadro VI. Hidrólisis enzimática de los Glucósidos Cianogénicos.



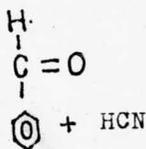
β -glucosidasa



oxinitrilasa



MANDELONITRILLO



BENZALDEHIDO

La estructura del amígdalín sirve para ilustrar la formación química general de éste grupo de sustancias y la naturaleza de sus productos de hidrólisis. (cuadro VI)

En la planta el cianuro puede tener varias funciones importantes como la de realizar un control enzimático, por ejemplo inhibiendo la oxidación del ácido ascórbico y de éste modo estabilizar la vitamina C, o puede intervenir en la fotosíntesis de compuestos nitrogenados, también puede ser que el HCN liberado represente un mecanismo de defensa contra insectos y organismos parásitos, sin embargo algunos animales son capaces de comer y parasitar plantas cianogénicas. (Butler et al., 1973 y Wokes, 1951)

Actualmente es posible realizar algunas modificaciones de los glucósidos cianogénicos a nivel genético, es un trabajo importante debido a que en algunas variedades se presentan cientos glucósidos cianogénicos y otros contienen las enzimas específicas para degradarlos. (Cock, 1973)

Los glucósidos están acompañados en el tejido de la planta por una enzima endógena llamada linamarasa, en una mezcla de β -glucosidasa y oxinitrilasa y es responsable de la hidrólisis completa de los glucósidos.

La enzima y el sustrato no están en contacto en el interior de la planta, la hidrólisis es iniciada cuando el tejido es mallugado o dañado mecánicamente provocando la liberación de HCN. La linamarasa es inactivada por el calen-

tamiento, pero la glucosidasa es más sensible, ya que es --
inactivada por el pH de la saliva humana, del jugo gástrico
y por la presencia de celulosa o glucosa. En las poblacio-
nes pobremente nutridas donde el consumo es alto en vegeta-
les y se registra una baja acidez gástrica y al consumir le
guminosas en estado crudo es factible que la hidrólisis de-
los glucósidos continúe en el estomago.

2. Toxicidad

Los efectos tóxicos de los glucósidos cianogénicos en el hombre, se deben a la absorción del ácido cianhídrico liberado por la acción de las enzimas de la microflora en el tracto intestinal. (Liener, 1966)

El cianuro ingerido es rápidamente absorbido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pasando a la sangre, donde reacciona solamente con el fierro en estado trivalente (férico), como el de la oxidasa del citocromo para formar la cianometahemoglobina, cesando la respiración y produciendo la hipoxia citotóxica. (Montgomery, 1969)

La dosis mínima letal de ácido cianhídrico en ratones es estimada en 0.5 mg a 3.5 mg por Kg de peso corporal. Dosis mayores pueden causar la muerte en pocos minutos, los sobrevivientes describen los síntomas iniciales de entumecimiento y sensaciones de lumbre, seguidos de confusión mental y estupor, produciendo cianosis y convulsiones, terminando en coma. Dosis no fatales producen dolor de cabeza, sensación de opresión en el pecho y garganta, palpitaciones y dolor muscular.

Probablemente el primer caso de envenenamiento humano originado por el consumo de plantas cianogénicas es el reportado por Davidson y Stevenson (1884). Esto ocurrió en Mauritius debido a la ingestión de Ph. lunatus conocido lo-

calmente por "pois d'Achery". Los síntomas clínicos fueron confusión mental, parálisis general muscular y angustia respiratoria como en el envenenamiento agudo con cianuro inorgánico. Estos síntomas son seguidos por dolores severos abdominales y vómitos. Otros envenenamientos humanos por Ph. vulgaris, debido al consumo de variedades oscuras y negras de las especies conocidas como Achery, Java o frijol - Kratok han sido reportados por John Abrest en Puerto Rico - los años de 1917-1925 registrándose siete muertes.

Otro alimento muy consumido es la casava y sus propiedades tóxicas fueron señaladas por Clusius en 1605, pero - hay referencias más recientes de envenenamientos con plantas cianogénicas, como las reportadas por Baggchi y Ganguli (1943), de ganado envenenado con sorgo de la India. Los - mismos autores afirman que el ganado es frecuentemente envenenado por el consumo de bambú joven. Las plantas cianogénicas también han sido usadas como un medio de suicidios y homicidios como es el caso de las almendras amargas y su aceite. También han sido reportados envenenamientos accidentales debido a la ingestión de huesos de durazno, albaricocque y cerezas.

3. Toxicidad crónica.

La exposición constante al cianuro puede afectar la --
contextura nutricional provocando una deficiencia en proteí-
nas y rivo flavina, lesiones dermatológicas, anemia crónica-
y cambios neuropatológicos. (Wilson, 1973 y Calabrese, --
1972)

Algunos autores han centrado su atención en las alte--
raciones producidas en el sistema nervioso. Como Collins y
Martland (1908) que describieron un caso parecido a la po -
liomielitis en un paciente expuesto al KCN. Wike, reportó-
una desmielinización en la sustancia blanca del cerebro en-
perros y hombres como resultado de un envenenamiento con -
cianuro. Una amplia investigación se ha llevado a cabo a -
cerca de la ceguera en fumadores (ambliopía del tabaco) y -
la posible relación de ésta lesión con el disturbio metabó-
lico de la vitamina B₁₂. Se estableció primero que la for-
mación de la ambliopía es debida a la intoxicación con cia-
nuro y segundo la conversión de la hidroxicobalamina, impor-
tante en la desintoxicación.

Una ambliopía similar es común en todo el trópico, en-
tre la gente sub-alimentada. Esta forma de ambliopía es --
una lesión aislada generalmente grave y puede ser la conse-
cuencia de un síndrome neurológico generalizado que incluye
la anoxia sensorial y sordera. En todas las comunidades --

que están afectadas con éste síndrome, ocurre que la dieta es baja en proteínas de origen animal (consecuentemente en vitamina B₁₂) y relativamente ricas en vegetales incluyendo casava y leguminosas.

Wilson realizó estudios acerca del daño óptico hereditario de Leber, una forma rara de atrofia óptica que consiste en el daño de las fibras centrales del nervio óptico, la lesión es generalmente severa y la ceguera es permanente.

Aparte de los daños neurológicos, algunos pacientes mostraron lesiones en el esqueleto similares a las producidas en el osteolatrismo.

No solamente el hombre está expuesto al cianuro que - pulula en el aire sino también al del humo de los cigarri- llos y en algunos casos al cianuro producido en infecciones por ciertas bacterias. En condiciones normales el contacto frecuente con cianuro provoca pérdida de peso con curiosa - persistencia del apetito, dolores de cabeza y lasitud. Un- consumo por largo tiempo de casava conteniendo bajos nive- les de HCN, asociado a mecanismos de desintoxicación anorma- les produce predisposición a las enfermedades anteriormente mencionadas. Además se reduce el yodo tiroideo y aumenta - la excreción renal de yodo, provocando el bocio endémico. - (Maner, 1973)

Se da el nombre de bocio endémico al aumento difuso e- irregular del volumen de la glándula tiroides. La etiolo -

gía de los bocios queda resumida en los siguientes factores: la falta de yodo, los malos hábitos alimenticios, algunos de tipo familiar como son los trastornos de la hormogénesis o esporádicos como los debidos a desequilibrios endócrinos.

En un estudio clínico realizado sobre bocio endémico en la clínica T 3 # 8 del IMSS, situado en el Cercado perteneciente al estado de Nuevo León. Se estudiaron 446 casos de personas adultas y por medio de exploración isotópica se encontró incidencia de bocio en 300 casos y solamente 146 fueron encontrados normales. Los enfermos fueron distribuidos en base a la siguiente clasificación.

- GRADO I Normales.- Glándula no visible y en ocasiones ligeramente palpable.
- GRADO II .- Discretamente crecida, generalmente visible y de consistencia blanda.
- GRADO III .- Moderadamente crecida (más del triple del tamaño normal) observable a ambos lados de la tráquea y de consistencia más firme.
- GRADO IV .- Marcadamente crecida con gran deformación del cuello, en ocasiones nodular, habitualmente de consistencia firme.

Obteniéndose los siguientes resultados:

	No. de pacientes	%
GRADO I	146	32.73
GRADO II	253	56.73
GRADO III	32	7.18
GRADO IV	<u>15</u>	<u>3.36</u>
	446	100.00

De éste estudio se concluye que la incidencia de bocio se presenta en un porcentaje elevado, desconociéndose, además el verdadero origen, no obstante y curiosamente el estado de Nuevo León es uno de los principales consumidores de frijol. (Velarde, 1972)

Otro estudio similar se realizó en la República de Zaire en donde la población de la parte norte está afectada de bocio endémico, no encontrándose en la parte sur, siendo la única diferencia entre ambas regiones la alimentación con casava. Se hicieron una serie de experimentos con habitantes de ambas regiones se les dieron dietas de platano, cacahuate, calaza y casava mezclados con yodo marcado, usando como referencia el arroz. Después de la ingestión se determinó el yodo radiactivo fijado en la tiroides. Hallando que la casava fué la dieta en la que se encontró una menor fijación en la tiroides del yodo radiactivo.

Concluyendo que el tiocianato formado en el proceso de

desintoxicación del cianuro inhibe selectivamente el funcio
namiento de la bomba de yodo en la tiroides, como lo indica
una disminución considerable de la captación de yodo radia
tivo, en la tiroides y un aumento del yodo estable y marca-
do en la orina. (Delange, 1973 y Topperman)

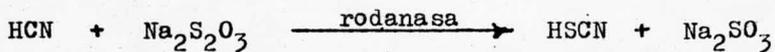
4. Mecanismo de desintoxicación.

Existen diversas técnicas caseras para reducir el contenido de glucósidos cianogénicos presentes en los alimentos como son el raspado, rallado, remojo en agua, fermentación, y la elaboración de harina como en el caso de la casava con la cual se elabora un pan conocido como casave. Otra de las técnicas consiste en favorecer la autólisis dejando a la planta macerar en agua, procediendo después al cocimiento en donde el HCN liberado es fácilmente volatilizado por la ebullición. Cuando el cocimiento se lleva a cabo tapado, ocurre una condensación de los vapores y el agua de cocimiento es lentamente contaminada.

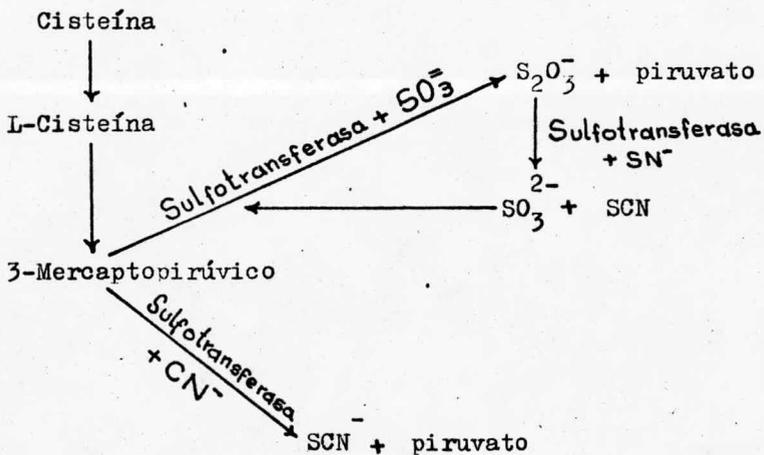
Después de ingerir el alimento contaminado, el cianuro es absorbido en el tracto gastrointestinal pasando después a la sangre donde se forma el complejo oxidasa-cianuro. Este complejo es disociado por la enzima rodanasa, enzima ampliamente distribuida en el tejido vivo, alcanzando altas concentraciones en el hígado, riñón, tiroides, glándulas suprarrenales y páncreas.

La rodanasa se combina con el tiosulfato o con el azúfre coloidal, formando una cadena polisulfurada que reacciona con el cianuro, liberando la enzima respiratoria y formando tiocianato, y así continúa la respiración. (cuadro VII). La rodanasa es el sitio principal de la desintoxica-

Cuadro VII. Mecanismo de desintoxicación del cianuro.



Cuadro VIII. Vía del 3-mercaptopirúvico.



ción y se encuentra en cantidades suficientes para transformar gran cantidad de cianuro, pero la reacción es limitada por la provisión endógena de tiosulfato. (Oke, 1973)

Las altas cantidades de tiocianato encontradas en la orina, la saliva y la sangre de personas que comen mucha -- mandioca proviene de la desintoxicación del cianuro por la enzima rodanasa.

La estimación de tiocianato en la sangre o en la orina no son un índice confiable de la cantidad de cianuro ingerido por varias razones:

1. Hay otras vías metabólicas que puede seguir el tiocianato. Como lo demostraron Goldstein y Rieders que encontraron una oxidasa endógena en los globulos rojos que convierte el tiocianato en cianuro libre. (Montgomery, 1960)
2. Hay una gran bomba metabólica de tiocianato en el cuerpo, con fluctuaciones debidas a la inclusión en la dieta de alimentos con tiocianato preformado, como en los vegetales verdes y la leche.
3. El incremento en la excreción urinaria de tiocianatos no es debida solamente a la ingestión de cianuros sino también por una deficiencia de vitamina B_{12} .

La hidroxicobalamina (vit. B_{12a}) también interviene en la desintoxicación del cianuro formando la cianocobalamina.

Al administrar hidroxicobalamina en ratones durante el envenenamiento se obtiene una acción protectora.

Otra vía importante de desintoxicación es la reacción del cianógeno con el 3-mercaptopirúvico, ayudado por una -sulfotransferasa. Esta reacción se muestra en el cuadro -VIII y requiere la presencia de cantidades adecuadas de cisteína como donador de azúfre.

III. MATERIALES Y METODOS.

La determinación de glucósidos cianogénicos se realizó en ocho variedades de frijol ampliamente consumidas en el País. Las muestras fueron adquiridas en el mercado, exceptuando la muestra de frijol soya que fué tomada de una carga nueva llevada al laboratorio y desconociéndose el origen.

Cada variedad se mezcló bien para obtener una muestra homogénea y representativa. Las muestras se almacenaron en el laboratorio.

La determinación constó de dos pasos principales:

- A. Método de extracción.
- B. Método de cuantificación.

A. Método de extracción.

Entre los métodos de liberación del ácido cianhídrico se encuentran la autólisis, la adición de enzimas, hidrólisis ácida y combinación de éstas técnicas. (Winkler, 1958)

- Como método de extracción se eligió la autólisis.

Técnica. Se uso una modificación de la técnica reportada en el AOAC del método alcalino. (A.O.A.C., 1965)

Se pesaron de 10 a 20 g de muestra finamente molida y sin tamizar, se colocaron en un matraz erlenmeyer de 500 ml, se adicionaron 200 ml de agua destilada y se dejaron -

macerar a temperatura ambiente por 48 h. (Wokes, 1951)

Transcurrido ese período se adicionaron ácido tartárico y nitrato de plomo, de 6-8 ml de una solución al 10% de cada uno, se añadió antiespumante y se hizo una destilación por arrastre de vapor, recibiendo el destilado en 20 ml de una solución de NaOH al 2.5% y se destiló hasta obtener un destilado de 150 ml, y finalmente se ajusta el pH entre 3 y 9.

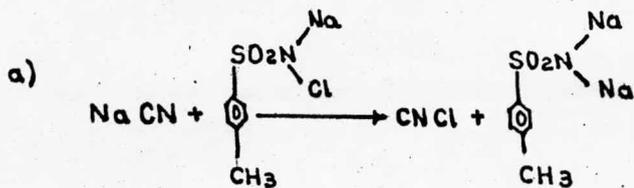
B. Método de cuantificación.

El método usado es una modificación del método piridina-pirazolona introducido por Gehauf y modificado por Epstein. (Epstein, 1947)

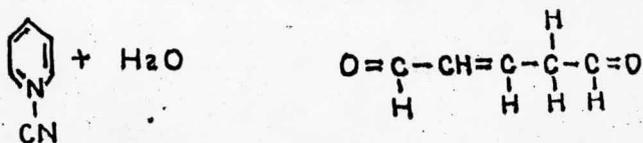
Consiste en tres pasos: (cuadro IX)

- a) Cloración del cianuro con cloramina T para producir el cloruro de cianógeno.
- b) Formación del aldehído glutacónico por tratamiento del cloruro de cianógeno con piridina para obtener el aldehído glutacónico.
- c) Desarrollo del color azul por tratamiento del aldehído glutacónico con 1-fenil,3-metil,5-pirazolona, obteniendo una coloración azul que es estabilizada por la presencia de trazas de bis-pirazolona en el reactivo.

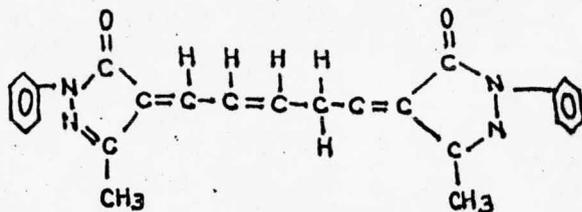
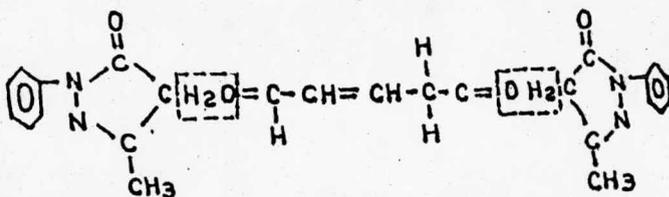
Cuadro IX. Método piridin-pirazolona.



b)



c)



Aparatos.

- Espectrofotómetro Perckin-Elmer, Coleman 50.
- Tubos de ensaye con tapón ajustable de caucho.

Reactivos.

- Solución de cloramina T acuosa al 1%.
- 1-fenil,3-metil,5-pirazolona recristalizada dos veces, - con punto de fusión de 127-128°C.
- Piridina grado Q.P.
- Preparación de la bis-pirazolona.

la bis-(1-fenil, 3-metil, 5-pirazolona) se preparó de acuerdo al método mencionado por Knorr:

Una décima mol (17.4g) de 1-fenil,3-metil,5-pirazolona se disuelven en 100 ml de alcohol etílico al 95% y se le añaden 0.25 moles (22.77 ml) de un destilado fresco de fenil hidrazina. La mezcla se pone a reflujo por 4 h, la porción insoluble es la bis-pirazolona. La mezcla se filtra en caliente y el precipitado se lava repetidas veces con alcohol etílico caliente al 95% y posteriormente se seca al vacío.

El p.f. de los cristales constituidos por prismas conforma de diamante será arriba de 320°C.

- Mezcla piridin-pirazolona.

A 500 ml de una solución al 0.5% de fenil,metil,pirazolona se le adicionaron 100 ml de piridina en la que anteriormente se disolvieron 0.02 g de bis-pirazolona.

Ya preparada se almacenó en botellas ambar, bajo refrigeración y se descartó cuando mostró un color rosa.

- Preparación de la curva estandar.

Se pesaron 0.0015 g de NaCN y rápidamente se depositaron en un matraz aforado de 100 ml y se aforaron con agua destilada, obteniendo una concentración de 15 microgramos por mililitro.

Se tomaron 1,2,3,4,5, y 6 ml de la solución anterior y se siguió la técnica de extracción.

- Calibración.

Se tomó 1 ml de la solución estandar ya destilada, se puso en un tubo de ensaye y se le adicionó 0.2 ml de la solución acuosa de cloramina T al 1%, se tapó inmediatamente y se agitó. Después de 1 min, se le adicionó 6 ml de la mezcla piridin-pirazolona, se tapó el tubo y se agitó, se desarrolló una coloración rosa que va cambiando rápidamente a un color azul. Transcurridos 20 min se leyó la densidad óptica a 630 nm. Las densidades ópticas obtenidas son graficadas contra la concentración teniendo la curva estandar.

- Problema.

La cantidad de cianuro presente en una solución desco-

nocida se determinó de la forma antes mencionada y las densidades ópticas obtenidas son extrapoladas en la curva estandar.

La solución de cianuros puede ser analizada por éste método entre un pH de 2.8 - 9.

IV. RESULTADOS.

Las variedades de frijol analizadas fueron las siguientes:

1. Frijol negro tipo Veracruz.
2. Frijol canario.
3. Frijol soya.
4. Frijol ojo de cabra.
5. Frijol flor de mayo.
6. Frijol bayo.
7. Frijol garbancillo.
8. Frijol rosita.

Los resultados se presentan en los cuadros X y XI. El cuadro X muestra las densidades ópticas obtenidas de las diferentes variedades de frijol, y en el cuadro XI se presentan las cantidades de cianuro reportadas en ppm.

En los cuadros puede verse que las variedades con mayor cantidad de cianuro liberado corresponden al frijol negro Veracruz y al frijol soya, mientras que las variedades con menor cantidad fueron el frijol rosita y el frijol ojo de cabra.

En el cuadro XII se muestran algunos valores reportados por varios autores. Como se observa nuestros resultados son mucho menores a los reportados por éstos autores, pero es necesario tomar en cuenta que no se señala la varie

Cuadro X. Densidades ópticas obtenidas de las muestras.

Variedades.	D.O.					
Negro (Veracruz)	0.017	0.015	0.016	0.01	0.015	0.014
Canario	0.008	0.009	0.01	0.008	0.009	0.01
Soya	0.008	0.008	0.01	0.011	0.011	0.008
Ojo de cabra	0.005	0.006	0.005	0.008		
Flor de mayo	0.004	0.005	0.006	0.004		
Bayo	0.01	0.012	0.01	0.008		
Garbancillo	0.005	0.009	0.006	0.005		
Rosita	0.002	0.001	-	-		

Cuadro XI. Cantidad de cianuro en ppm.

Variedades	Promedio						
Negro (Veracruz)	0.065	0.055	0.06	0.04	0.06	0.055	0.055
Canario	0.034	0.036	0.037	0.03	0.035	0.037	0.034
Soya	0.045	0.045	0.04	0.045	0.045	0.03	0.041
Ojo de cabra	0.02	0.025	0.02	0.035			0.025
Flor de mayo	0.018	0.02	0.025	0.018			0.020
Bayo	0.04	0.045	0.04	0.03			0.038
Garbancillo	0.02	0.035	0.025	0.02			0.025
Rosita	0.008	0.003	-	-			0.002

(Ver curvas estandar en apéndices I,II,III, IV,V,VI,VII y VIII)

Cuadro XII. Comparación de algunos valores de semillas de leguminosas
crudas.

(valores HCN mg/100g de muestra seca)

	Contreras	Montgomery	Jaffé	Wokes	Jacob	Peralta
Ph. vulgaris	1.52-1.83	2	1.2	0.8	4.7-8.6	0.9-4.2
soya	1.53	-	0	0	-	-

Fuente: Contreras, 1956

dad de frijol usada y la diferencia fundamental es que cada autor usó un método de análisis diferente, como en el caso de Contreras que usó el método reportado en el A.O.A.C., - Wokes usó un método de destilación combinado con uno de aeración en varias sustancias, en el caso de Montgomery el usó el método descrito en el A.O.A.C., para la liberación del cianuro y para la cuantificación usó una modificación del método de Liebig basada en la titulación con yodo, de Jaffé, Jacob y Palma se desconocen las técnicas seguidas para obtener sus resultados.

Por consiguiente no se puede establecer comparación entre ellas. El método reportado en el A.O.A.C., se indica un tiempo de autólisis de sólo cuatro horas y la cuantificación es por titulación con nitrato de plata; el método es -reportado como poco sensible para determinar concentraciones bajas de cianuro. (Wokes, 1951)

V. DISCUSION.

Se realizaron varias pruebas para elegir el método de extracción más conveniente para éstas determinaciones, debido a que en la literatura se reporta que experimentalmente ninguna de las enzimas probadas, excepto la extraída del frijol es efectiva en la hidrólisis completa de los glucósidos cianogénicos.

Una de las pruebas que se realizaron fué usando emulsin que es el principio activo de las almendras amargas, es una mezcla de β -glucosidasa y oxinitrilasa. (Liener, 1966)

Se usó en una proporción del 1% y del 5% en muestras de 20 g de frijol molido suspendido en agua, se dejaron macerar toda la noche, se siguieron las técnicas de extracción y cuantificación, obteniéndose resultados negativos.

Otras de las pruebas que se llevaron a cabo fueron autólisis por 4h, 24h, 48h y 72h, observándose que en las pruebas por 4h, y 24h los resultados fueron negativos debido a que no hubo liberación de cianuro, en la prueba de 72h el frijol comenzó a fermentar y presentaba una disminución del cianuro liberado, obteniéndose los mejores resultados con una autólisis por 48h a temperatura ambiente.

Por lo que se decidió usar en éste trabajo como método de extracción la autólisis por 48h.

También se realizaron las pruebas de añadir ácido ní -

trico y ácido sulfúrico. Con el ácido nítrico se presentó el problema de que al aplicar el método de cuantificación se desarrollaba un color rosa permanente que interfería con la lectura, por lo que se eliminó. El ácido sulfúrico no mejoró los resultados obtenidos con la autólisis por 48h.

La adición del ácido tartárico y el nitrato de plomo antes de la destilación obedece a dos razones importantes: la primera es la de llevar el pH por debajo de 3 y ayudar a que la hidrólisis sea más eficiente y prácticamente son eliminados durante la destilación. Y la segunda razón es que retienen diversas sustancias que son liberadas durante la autólisis e interfieren en la titulación con nitrato de plata. Estas sustancias contaminantes también pueden ser extraídas con una solución acuosa ácida con cloroformo o con otro solvente orgánico. (Winkler, 1958)

Ya obtenido el destilado, se ajusta el pH de 3-4 para prevenir la oxidación del tiocianato presente a cianuro. (Wokes, 1951)

Con respecto a los métodos de cuantificación en la literatura se reportan varias técnicas.

1. Cromatografía capa fina. (Seigler, 1970)
2. Cromatografía en papel.
3. Titulación con nitrato de plata.
4. Reacción con ácido pícrico.
5. Método espectrofotométrico.

Existen también técnicas para aislar y purificar los glucósidos cianogénicos.

1. Por medio de espectros del infrarrojo. (Seigler, 1975)
2. Por resonancia magnética nuclear. (Seigler, 1975)

Las pruebas de cuantificación se pueden dividir en presuntivas como la prueba del ácido pícrico y las pruebas de cuantificación como son: el método espectrofotométrico, la titulación con nitrato de plata y las dos técnicas de cromatografía.

El método reportado en el A.O.A.C., consiste en la titulación con nitrato de plata, además de ser poco sensible no da importancia a los contaminantes como es la presencia de tiocianato que se encuentra en los vegetales verdes e interfiere aumentando los resultados. Con respecto a las técnicas cromatográficas es necesario contar con patrones de referencia para poder comparar los problemas, éstas técnicas se descartaron por no contar con las referencias.

Las técnicas de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear tienen la desventaja de que son técnicas más complejas y son usadas para determinar la presencia de algún glucósido cianogénico específico.

El método espectrofotométrico presenta las ventajas -- de que se emplea un equipo ampliamente usado en los labora-

torios y de que la técnica empleada es rápida y muy sensible.

Por todos los argumentos anteriores se eligió como técnica a seguir, la espectrofotométrica.

Cabe hacer notar que al mismo tiempo que se corrían -- las muestras de frijol se preparaba una curva estandar en la que se extrapolaban los resultados obtenidos. Esto se hizo en cada serie de pruebas debido a que el reactivo piridín-pirazolona es muy inestable y es necesario prepararlo periodicamente.

Antes de leer cada serie de pruebas el espectrofotómetro era ajustado con un blanco preparado al mismo tiempo -- que los problemas siguiendo las técnicas de extracción y -- cuantificación.

Los resultados obtenidos muestran cantidades muy pequeñas de cianuro, es necesario hacer hincapié en que las condiciones ecológicas son un factor muy importante, además de la edad de la planta y de la calidad genética.

No obstante los resultados obtenidos, en la variedad -- negra tipo Veracruz en cierta forma concuerda con la bibliografía en la que se indica que las variedades negras contienen mayor cantidad de glucósidos cianogénicos. Lo mismo sucedió con el frijol soya que fué la muestra más nueva que se pudo adquirir y mostró un valor alto en comparación con

las demás variedades que fueron adquiridas en el comercio - y que difícilmente son de cosechas recientes y que en algunos casos ya mostraban un color más oscuro que es un índice de envejecimiento.

VI. CONCLUSIONES.

Las leguminosas en estado crudo contienen varias sustancias tóxicas, entre ellas los glucósidos cianogénicos, - éste estudio se realizó en el frijol por ser la leguminosa más consumida en México.

La importancia de los glucósidos cianogénicos es que - liberan ácido cianhídrico al ser hidrolizados por una enzima endógena.

∨ La cantidad de glucósidos cianogénicos varía con las - condiciones ecológicas, edad de la planta, calidad genética y algunos factores externos. ∨

El cianuro liberado al ser absorbido en el organismo - reacciona con el fierro de la hemoglobina para formar el -- complejo oxidasa-cianuro, por lo que cesa la respiración. -

Este complejo es disociado por acción de la rodanasa, una enzima tisular que se combina con el tiosulfato presente en el organismo y liberar a la enzima respiratoria.

Las legislaciones norteamericanas y de algunos países- europeos fijan el límite de glucósidos cianogénicos de 10-- -20 mg de HCN/100g de muestra seca, nuestros resultados son mucho menores a éstos límites.

Se puede deducir que un consumo alto de frijol no pro- duce toxicidad grave ya que la dosis mínima letal de cianuro es de 0.5 a 3.5 mg por Kg de peso corporal. Pero no se-

puede saber si en los casos de desnutrición -muy abundantes en nuestro País- ésta exposición constante, pueda producir intoxicaciones crónicas, susceptibilidad a alteraciones neuropatológicas, bocio endémico y atrofia óptica debido a que en estos casos los sistemas inmunológicos están atenuados.

Es importante aclarar que los resultados obtenidos en éste estudio son poco representativos debido a que las condiciones durante el desarrollo de las pruebas fueron muy variables, así como las cualidades de las semillas, pero algo que si se puede recalcar es que las variedades negras y las semillas nuevas contienen una cantidad más alta de glucósidos cianogénicos.

Del mismo modo se puede afirmar que la técnica seguida para la cuantificación del cianuro es rápida y a la vez muy sensible, y útil para determinaciones pequeñas de cianuro.-

En lo referente al método de extracción del cianuro cabe señalar que probablemente no todos los glucósidos hayan sido hidrolizados, por lo que es necesario que en posteriores estudios se hagan más combinaciones de los métodos de hidrólisis, hasta obtener uno más satisfactorio.

En éste estudio se realizó solo una prueba con frijol-cocado, obteniendo un resultado negativo, éste resultado es razonable debido a que con el cocimiento se destruye la enzima que produce la hidrólisis, así que es necesario para -

muestras cocidas encontrar otro método de liberación del cianuro.

Por último en relación a las alteraciones fisiológicas producidas por el cianuro se observa la necesidad de ampliar éste estudio no sólo a las leguminosas sino a todos los vegetales, ya que actualmente la difícil disponibilidad y el alto precio de los alimentos de origen animal los ha hecho ser incluidos ampliamente en el régimen alimenticio de todos los mexicanos.

Como única solución contra éstas alteraciones está enseñar a la gente no sólo a alimentarse sino a nutrirse -- que es lo que no sabemos hacer.

VII. BIBLIOGRAFIA.

Aldridge W.N.: A new method for the estimation of microquantities of cyanide and thiocyanate. *Analyst.* 69: 262. 1944.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis. AOAC, Washington. - 10th edition, 1965.

Aykroyd and Joyce Doughty. Las leguminosas en la nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas, para la agricultura y la alimentación, FAO, 1964.

Boletín mensual de información económica. Secretaría de -- Programación y Presupuesto. Coordinación general del sistema Nacional de información. México, enero 1978, No 1, vol. II.

Butler G.W., P.F. Reay, y B.A. Tapper., Physiological and - genetic aspects of cyanogenesis in cassava and other plants. Chronic cassava toxicity proceedings of an interdisciplinary workshop. London, England. 20-30 January, 1973.

Calabrese Alberto, Astolfi Emilio. Toxicología. Ed. Kape - lusz, 1972.

Cock H. James: Cyanide toxicity in relation to the cassava-research program of CIAT in Colombia. Chronic cassava toxicity. Proceeding of an interdisciplinary workshop. London England. 20-30 January, 1973.

Conn Eric E. Biosynthesis of cyanogenic glycosides. Biochemistry Soc. Symp. 38, 277-302, 1973.

Conn Eric E. Cyanogenetic glycosides. Toxicant occurring naturally in foods. National Academy of Science. Washington, D.,C. 1973.

Contreras Sergio, Araya Héctor. Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. Archivo Venezolano de nutrición 5, 1956.

Coursay D.G. Cassava as food toxicity and technology. - Chronic cassava toxicity. Proceeding of an interdisciplinary workshop. London, England. 20-30 January, 1973.

De Bruijn G.H. The cyanogenic character of cassava (Manihot esculenta). Chronic cassava toxicity. Proceeding of an -- interdisciplinary workshop. London, England. 20-30 January, 1973.

Delonge F., Van Der Velden and A.M. Ermans: Evidence of an antithyroid action of cassava in man and in animals. Chronic cassava toxicity. Proceeding of an interdisciplinary workshop. London, England. 20-30 January, 1973.

Encuestas nutricionales en México. Vol. II. Estudios de -- 1963-1974. Encuestas familiares. Instituto Nacional de -- Nutrición.

Epstein J. Estimation of microquantities of cyanide. *Anal. Chem.* 19, 272, 1947.

Las leguminosas en la agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia, marzo, 1955.

Liener Irwin E. Cyanogenetic glycosides. Toxicants occurring in foods. National Academy of Science. Washington, D., C. 1966.

Maner H. Jerome and Gómez Guillermo: Implication of cyanide toxicity in animal feeding studies using high cassava rations. Chronic cassava toxicity. Proceeding of an interdisciplinary workshop. London, England. 20-30 January, 1973.

Mendieta Alatorre Angeles, Tesis profesionales. Ed. Porrúa S.,A. 11 ava edición. 1978.

Mitchell N. D. Quantification of the picrate test for cyanide in plant genetic studies. *Can., J., Genet., Cytol.* 16 895-897, 1974.

Montgomery R.D. Cyanogens. Toxic constituents of plant foodstuffs. Edited by Irvin E. Liener. Academic Press, 1969.

Oke L.O : The mode of cyanide detoxication. Chronic cassava toxicity. Proceeding of an interdisciplinary workshop.-

London, England. 20-30 January, 1973.

Seigler D.S., K.L. Mikolajszac : Structure and reactions of a cyanogenetic lipid from cordia verbenacea D.C., seed oil. Chem. Phys. Lipids. 4, 147-161, 1970.

Seigler D.S. Isolation and characterization of naturally - occurring cyanogenic compounds. Phytochemistry. 14, 9-29, 1975.

Stoewsand y Anderson. Cyanide content of apricot kernels.- J. Food Sci. 40, 1107. 1975.

Topperman Jay. Fisiología metabólica y endócrina. Ed. Interamericana.

Velarde Gómez Victor Manuel. Bocio endémico en los derecho-habientes de la clínica T 3 # 8 del IMSS en Nvo. León.- Estudio clínico por muestreo. (Tesis) Fac. de Medicina. Universidad de Veracruz. 1972.

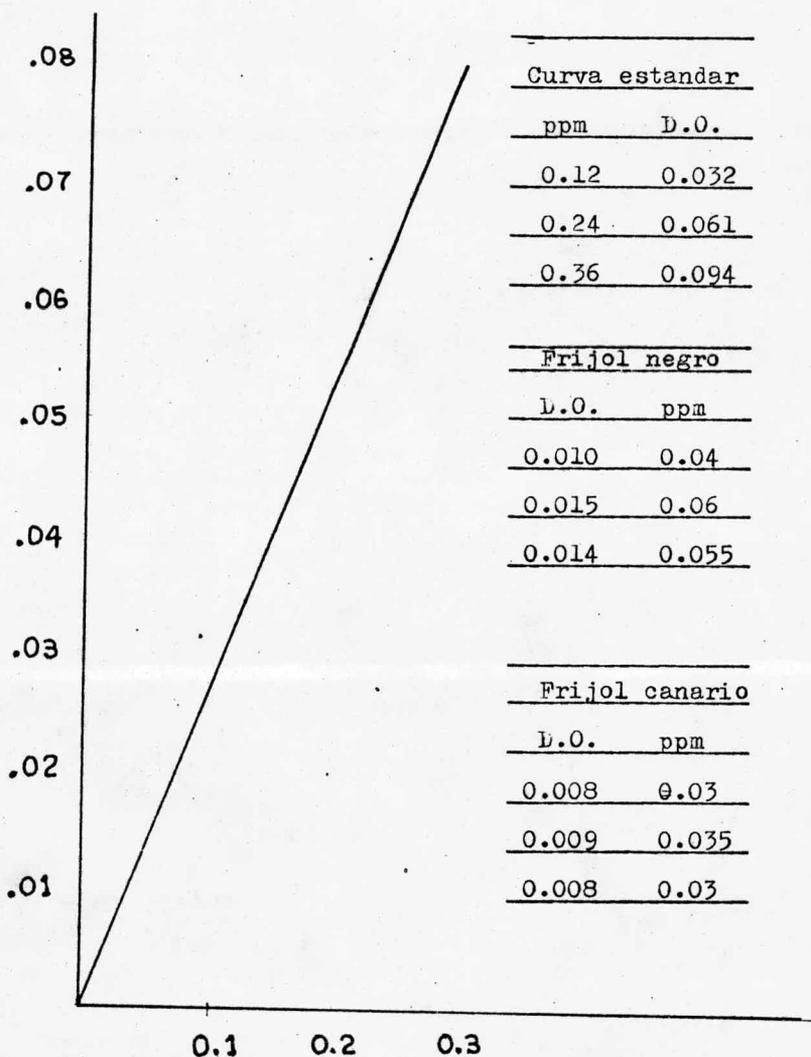
Wilson J. : Cyanide and human disease. Chronic cassava toxicity. Proceeding of an interdisciplinary workshop. London, England. 20-30 January, 1973.

Winkler O.W. : Report on methods for glucosidal HCN in Lima Beans. Journal of the AOAC. 41, 282, 1958.

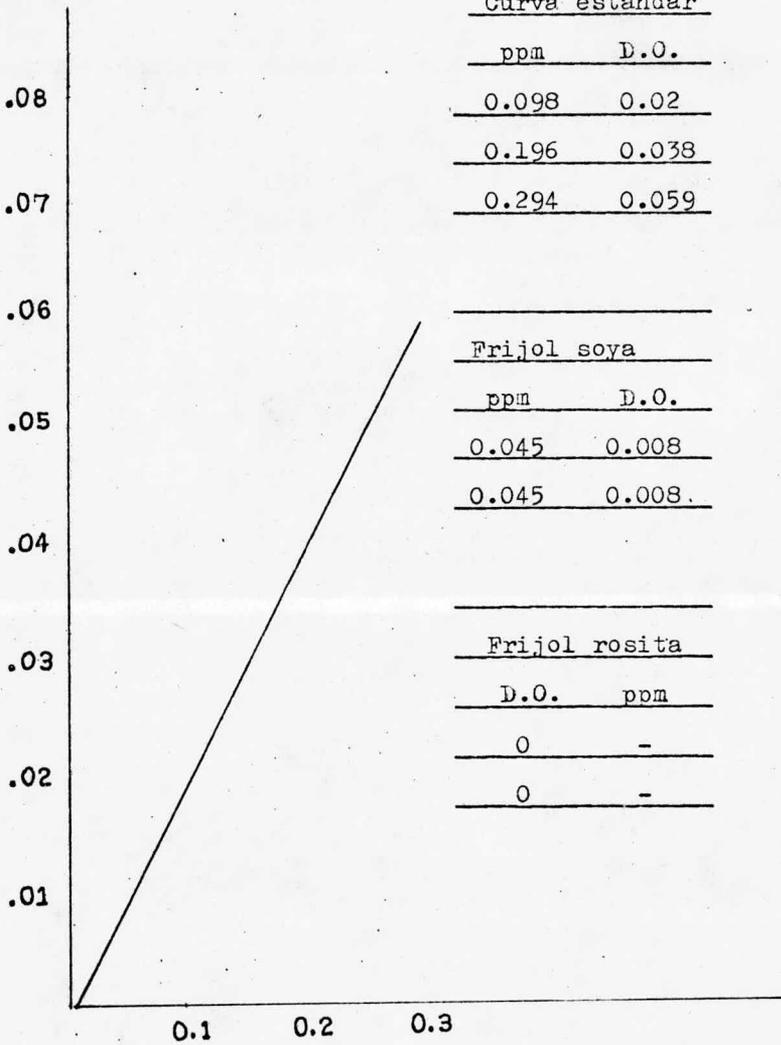
Wokes F. and S.G. Willimott. : The determination of cyanide in seeds. J. Pharm. Pharmacol., 3, 905, 1951.



Apéndice I



Apéndice II

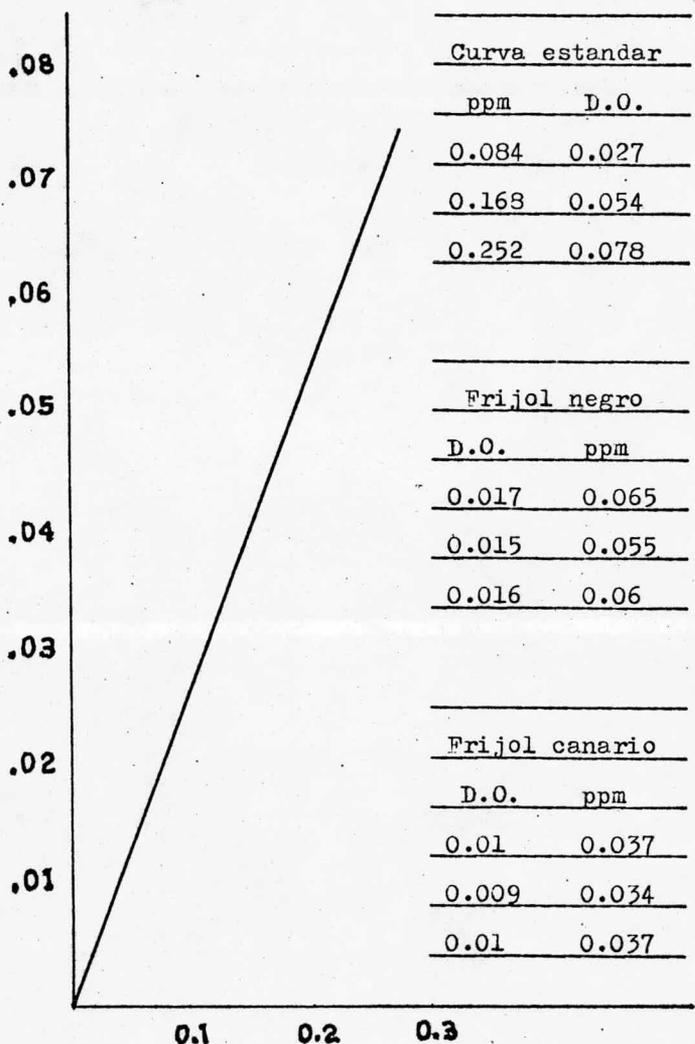


Curva estandar	
ppm	D.O.
0.098	0.02
0.196	0.038
0.294	0.059

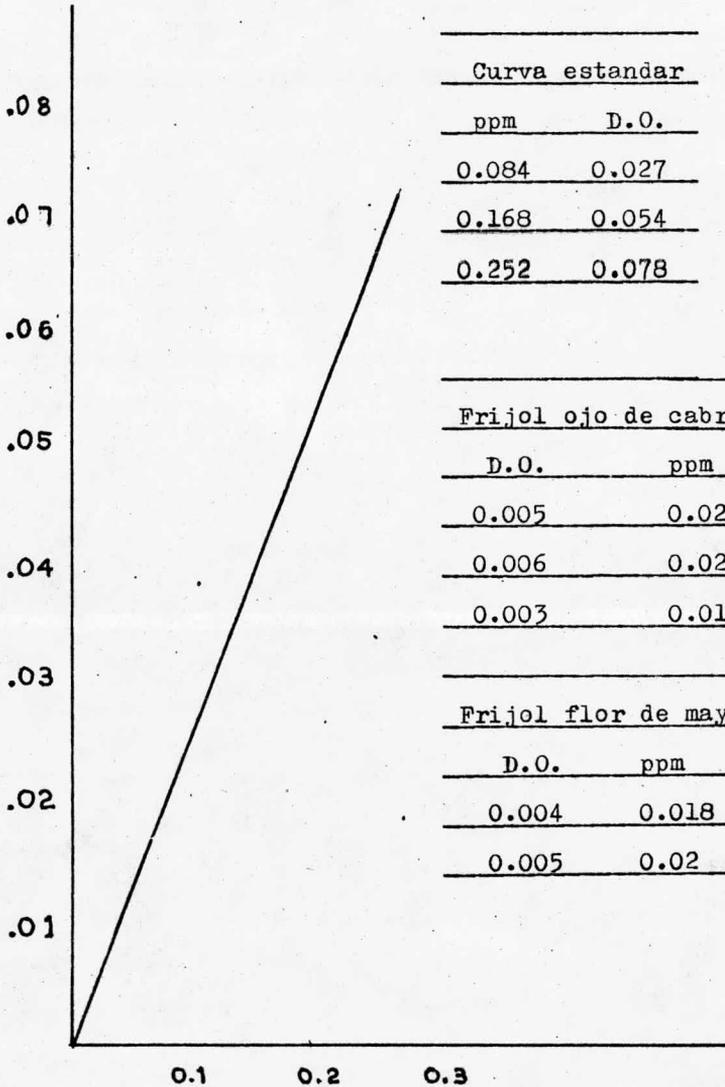
Frijol soya	
ppm	D.O.
0.045	0.008
0.045	0.008

Frijol rosita	
D.O.	ppm
0	-
0	-

Apéndice III



Apéndice IV

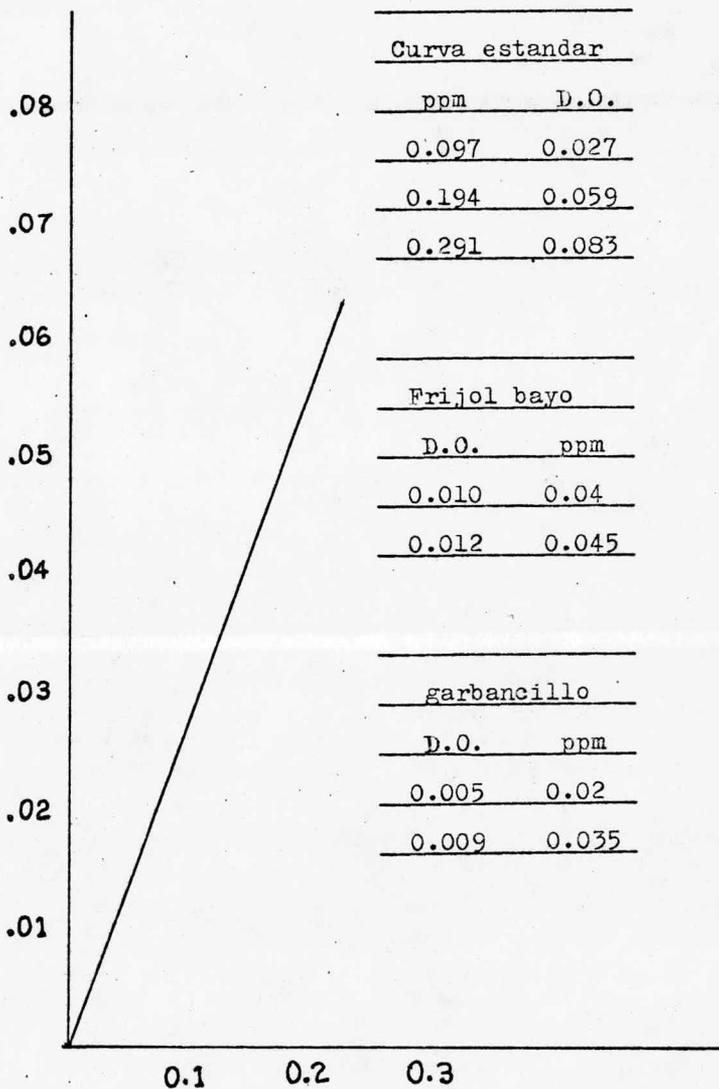


<u>Curva estandar</u>	
<u>ppm</u>	<u>D.O.</u>
0.084	0.027
0.168	0.054
0.252	0.078

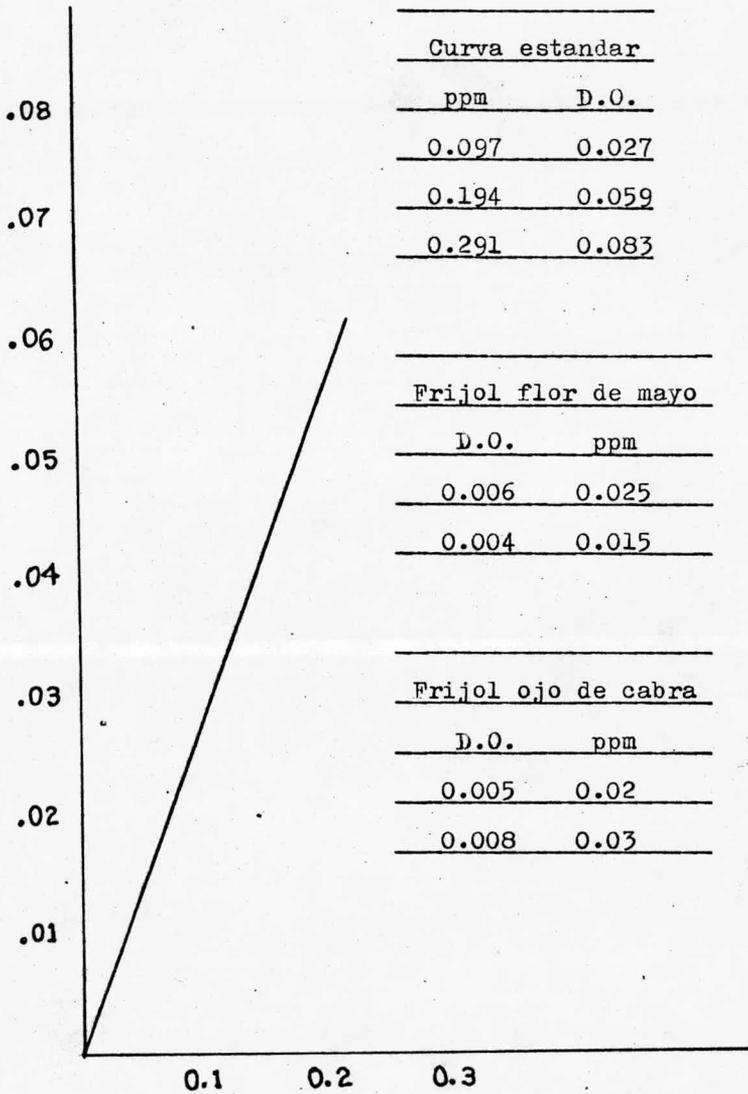
<u>Frijol ojo de cabra</u>	
<u>D.O.</u>	<u>ppm</u>
0.005	0.02
0.006	0.025
0.003	0.015

<u>Frijol flor de mayo</u>	
<u>D.O.</u>	<u>ppm</u>
0.004	0.018
0.005	0.02

Apéndice V



Apéndice VI

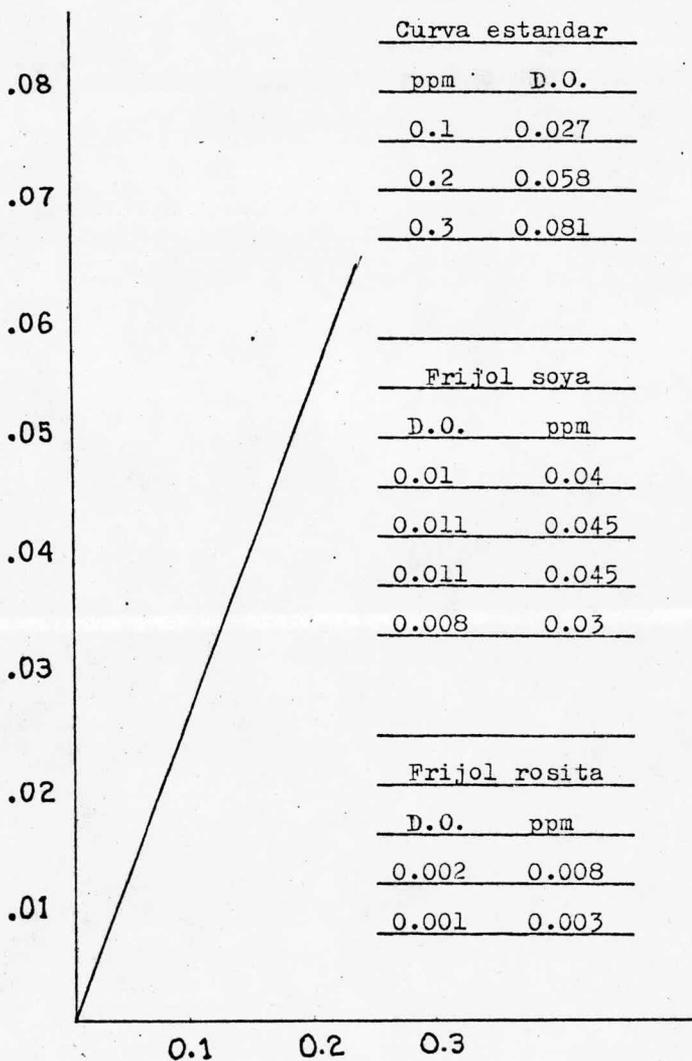


Curva estandar	
ppm	D.O.
0.097	0.027
0.194	0.059
0.291	0.083

Frijol flor de mayo	
D.O.	ppm
0.006	0.025
0.004	0.015

Frijol ojo de cabra	
D.O.	ppm
0.005	0.02
0.008	0.03

Apéndice VII



Curva estandar

ppm	D.O.
0.1	0.027
0.2	0.058
0.3	0.081

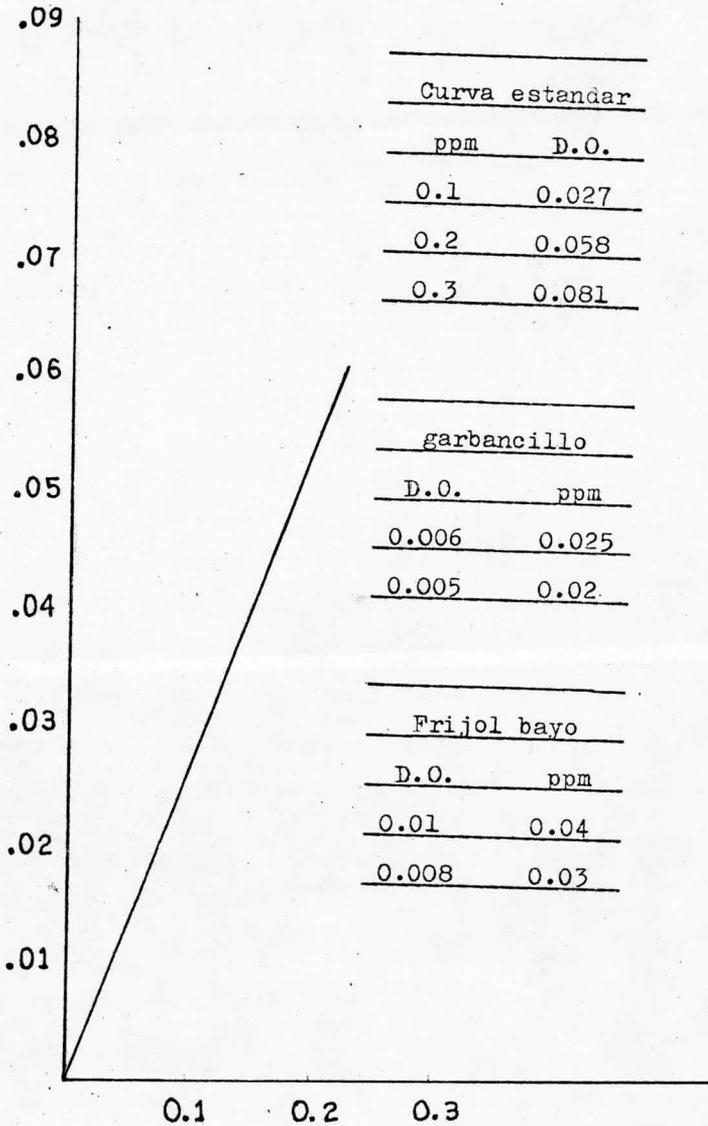
Frijol soya

D.O.	ppm
0.01	0.04
0.011	0.045
0.011	0.045
0.008	0.03

Frijol rosita

D.O.	ppm
0.002	0.008
0.001	0.003

Apéndice VIII



Curva estandar

ppm	D.O.
0.1	0.027
0.2	0.058
0.3	0.081

garbancillo

D.O.	ppm
0.006	0.025
0.005	0.02

Frijol bayo

D.O.	ppm
0.01	0.04
0.008	0.03