

28
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CUAUTITLAN

" CUANTIFICACION DE GLUCOSIDOS CIANOGENICOS
EN FORRAJES COMUNES EN EL PAIS "

BIBLIOTECA CENTRAL

Que para obtener el título
de Químico-Farmacéutico-
Biólogo.

PRESENTA

SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

Director de tesis

Dr. Jacques Adés Totah.

1979

16751



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

C O N T E N I D O

A.- INTRODUCCION

- i) Generalidades
- ii) Antecedentes
- iii) Objetivo

B.- MATERIALES Y METODOS

- i) Métodos
- ii) Muestras
- iii) Observaciones a la técnica

C.- RESULTADOS Y DISCUSION

D.- CONCLUSION

E.- BIBLIOGRAFIA

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

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

La ganadería ha sufrido muchas pérdidas debido al consumo de plantas venenosas existentes en la naturaleza, lo cual representa un problema económico muy importante. A partir de 1891 los investigadores de las estaciones experimentales en otros países, han efectuado estudios para poder caracterizar los tóxicos de las plantas venenosas consumidas, y gracias a éstos, en la actualidad se han reducido las pérdidas (10): Aunque mucha de esta información es todavía incompleta, se sabe que muchas áreas sufren sequías periódicamente y no permiten el desarrollo de plantas forrajeras nutritivas, sin embargo, las plantas tóxicas pueden desarrollarse muy bien y son resistentes al drástico clima.

Los vegetales que contienen glucósidos cianogénicos tienen una amplia distribución entre las plantas superiores, en algunos helechos, y en dos clases de animales (Myriapoda e Insecta) (7).

Cuando las plantas cianogénicas sufren algún daño en su estructura celular, se desencadenan mecanismos enzimáticos que provocan la hidrólisis del heterósido (glucó

sido cinogénico). El mecanismo de autólisis se demuestra en la siguiente figura:

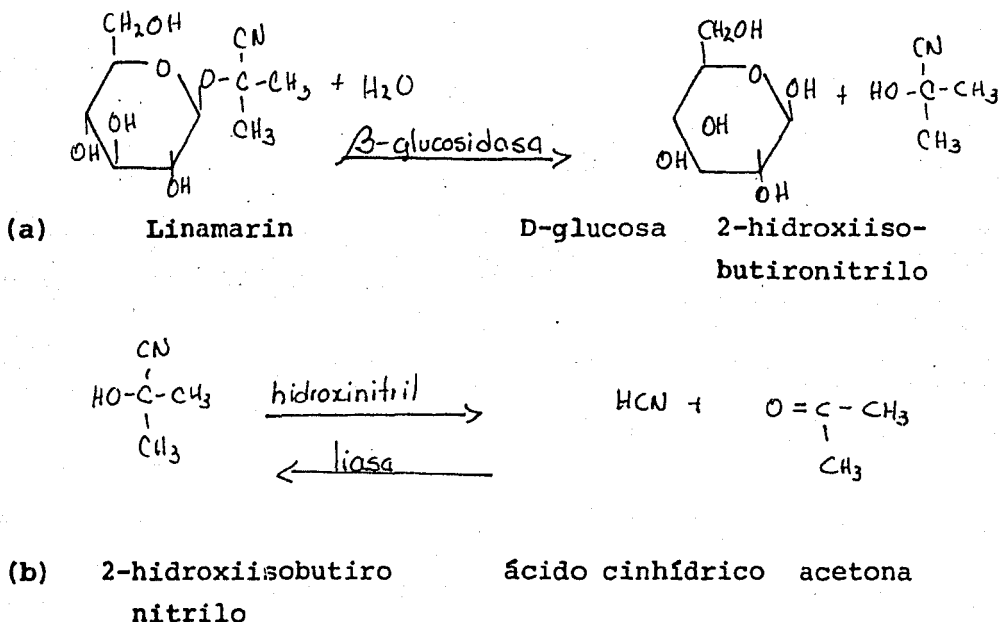


Figura 1. MECANISMO DE DESCOMPOSICION ENZIMATICA DE LINAMARIN

La figura 1 presenta la estructura de Linamarin, uno de los glucósidos cianogénicos que aparecen comunmente en los vegetales. En el paso (a), el enlace β -glucosídico- que une a β - D-glucosa y 2 hidroxiiisobutironitrilo es --- hidrolizado por la enzima endógena β -glucosidasa, forman- do dos compuestos. En el paso (b), el hidroxiiisobutironi- trilo se disocia formando acetona y ácido cianhídrico (24).

Otro de los glucósidos más comunes en vegetales es el Lotaustralin, este glucósido aparece siempre con el Linamarin, dependiendo del tipo de vegetal, varía la proporción Linamarin/ Lotaustralin. Dicho glucósido en el paso (b), su hidroxinitrilo se disocia formando metiletilcetona y ácido cianhídrico (3) (4).

Armstrong y col. (2), fundamentan que el glucósido cianogénico y la correspondiente enzima, son esenciales para la liberación del ácido cianhídrico. Por lo tanto cuatro categorías de plantas son esperadas bajo estas bases teóricas: (2)

- 1.- Plantas conteniendo tanto el glucósido como la enzima
- 2.- Plantas conteniendo solamente el glucósido
- 3.- Plantas conteniendo solamente la enzima
- 4.- Plantas carentes del glucósido y la enzima.

El resultado de la hidrólisis del glucósido, provoca la liberación del ácido cianhídrico, siendo éste uno de los venenos más comunes (25). La intoxicación por cianuro en los animales, se puede producir porque las plantas tóxicas que crecen junto con las forrajeras son cosechadas indistintamente, o porque las semillas de las plantas tóxicas sean tóxicas por sí mismas (13) (14).

El ácido cianhídrico, liberado de los glucósidos cianogénicos, es un potente inhibidor de la respiración celular. El mecanismo por el cual el cianuro causa envenenamiento, es por medio de una inhibición del sistema citocromo oxidasa (25). El complejo enzimático citocromo oxidasa y la hemoglobina son hemoproteínas que durante su función normal sufren una reducción y reoxidación alterna en el hierro que poseen. Estas hemoproteínas se ven seriamente dañadas en su función debido a una intoxicación por cianuro (25).

El envenenamiento por cianuro se manifiesta en animales con espasmos y parálisis que afectan principalmente a los músculos del tronco, produciéndose instantáneamente la muerte. Pequeñas dosis de cianuro causan un período corto de estimulación inicial, asociado con excitaciones y convulsiones. Después aparece la depresión. La respiración se vuelve profunda y acelerada, posteriormente débil e irregular antes de cesar finalmente. Las pupilas de los ojos se dilatan. Los ojos son prominentes vidriosos e insensibles a la luz. Los ollares y el hocico están llenos de espuma. Hay micción involuntaria y posteriormente defecación. La necropsia presenta en la sangre venosa un color rojo brillante. Algunas veces son vistas petequias sobre la traquea y la mucosa bronquial, y descargas de sangre por la boca. También se ha observado la musculatura

obscura y congestión o hemorragias en los pulmones (22).

Existen dos formas de destoxificación de cianuro en los animales cuando ingieren pequeñas cantidades del tóxico, y son:

a) Por formación de tiocianatos, catalizada esta reacción por la enzima "rodanasa", que se encuentra distribuida en todo el cuerpo y en mayor concentración en el hígado. Los tiocianatos resultantes son excretados por la orina, - sangre y saliva (20).

b) Por formación de cianocobalamina en el hígado. La vitamina B_{12a} (hidroxicobalamina) almacenada en este órgano tiene una gran afinidad por el ión cianuro, y la molécula resultante (cianocobalamina) es atóxica y metabolizable (16) (20).

Wokes y Pickard en 1955 aseguraron que el hígado contiene algo de vitamina B_{12a} y una gran cantidad de rodanasa. Cuando el cianuro es ingerido, ambas compiten por él (26).

En síntesis, los vegetales que contienen glucósidos cianogénicos pueden ser letales o dañar seriamente a los animales que ingieren este tipo de alimentos, de ahí - la importancia de la detección y cuantificación de dicho tóxico.

Los primeros trabajos sobre cianógenos que estudiaban casos de toxicidad aguda y algunas veces letal, ---

establecieron pocas demandas en cuanto a los límites de de
tección de cianuro, ya que era suficiente determinar "con-
tenidos potenciales tóxicos" (10).

Muchas especies de plantas contienen ácido cianhí-
drico en la forma de glucósidos cianogénicos, el cual es -
liberado por hidrólisis. Por lo menos 300 especies de plan-
tas probadas dan lugar a ácido cianhídrico, con 52 especies
en la familia de la Leguminoseae y 25 en la Gramineae (12)
(10).

Generalmente en la literatura se reporta a este-
tipo de plantas como "potencialmente tóxicas", pero muy po-
cos autores expresan el contenido del tóxico (10).

La siguiente tabla es una relación de plantas que
pueden contener cantidades peligrosas de ácido cianhídrico.
En esta tabla el autor no expresa la cantidad del tóxico -
ni la procedencia de las plantas (12) (10).

Tabla # 1

RELACION DE PLANTAS QUE CONTIENEN HCN

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| - <u>Acacia spp.</u> | - <u>Heterodendron oleifolium</u> |
| - <u>Adenia digitata</u> | - <u>Hydrangea spp.</u> |
| - <u>Andrachne decaisnei</u> | - <u>Indigofera australis</u> |
| - <u>Anthemis spp.</u> | - <u>Lambertia spp.</u> |
| - <u>Aquilegia vulgaris</u> | - <u>Linum usitatissimum</u> |
| - <u>Bahia oppositifolia</u> | - <u>Lotonis laza</u> |
| - <u>Brachyachne spp.</u> | - <u>Lotus spp.</u> |
| - <u>Bridelia ovata</u> | - <u>Loudonia spp.</u> |
| - <u>Calotis scapigera</u> | - <u>Macadamia ternifolia</u> |
| - <u>Canthium vaccinifolium</u> | - <u>Manihot esculenta</u> |
| - <u>Carex vulpina</u> | - <u>Medicago sativa</u> |
| - <u>Cercocarpus spp.</u> | - <u>Nandina domestica</u> |
| - <u>Chenopodium spp.</u> | - <u>Nerium oleander</u> |
| - <u>Chloris distichophylls</u> | - <u>Panicum spp.</u> |
| - <u>Cynodon spp.</u> | - <u>Passiflora spp.</u> |
| - <u>Cynodon incompletus</u> | - <u>Phaseolus lunatus</u> |
| - <u>Dactyloctenium radulans</u> | - <u>Phyllanthus gastroemii</u> |
| - <u>Digitaria sanguinalis</u> | - <u>Paranthera microphylla</u> |
| - <u>Dimorphoteca spp.</u> | - <u>Prunus spp.</u> |
| - <u>Eleusine indica</u> | - <u>Sambucus nigra</u> |
| - <u>Eremophila maculata</u> | - <u>Sorghum vulgare</u> |
| - <u>Eriobotrya japonica</u> | - <u>Sorghum halepense</u> |
| - <u>Eschscholtzia spp.</u> | - <u>Sorghum sudanense</u> |
| - <u>Eucalyptus spp.</u> | - <u>Stillingia treculeana</u> |
| - <u>Euphorbia spp.</u> | - <u>Suckleya suckleyana</u> |
| - <u>Florestina tripteris</u> | - <u>Trifolium repens</u> |
| - <u>Glyceria spectabilis</u> | - <u>Triglochin maritima</u> |
| - <u>Goodia latifolia</u> | - <u>Trigonella spp.</u> |
| - <u>Grevillea spp.</u> | - <u>Vicia sativa</u> |
| - <u>Gyrostemon ramulosus</u> | - <u>Xylomelum angustifolium</u> |
| - <u>Habea spp.</u> | - <u>Zea mays</u> |
| - <u>Haloragis spp.</u> | - <u>Zieria spp.</u> |

Existen algunos trabajos en los que si se reporta el contenido de ácido cianhídrico liberado como es el caso de la siguiente tabla. En este trabajo se resumen algunos datos de diferentes autores para las mismas especies de plantas. Se puede observar que para una misma especie se presentan diferentes resultados (13).

Tabla # 2

ESPECIES	LUGAR	HCN mg / 100 g		
		Montgomery	Jaffé	Wokes
Phaseolus lunatus	Jamaica	16.7		
Vigna sinensis	Jamaica	2.1	1.7	
Pisum sativum	Inglaterra	2.3	1.7	0.05
Phaseolus vulgaris	Jamaica	2.0	1.2	0.8
Cicer arietinum	India	0.8	0.6	0.3
Cajanus cajan	Jamaica	0.5	0.7	
Lens esculenta	India		1.7	
Pisum arvense	S. América	0		
Dolichos lablab			2.1	
Canavalia ensiformis			1.2	
Vicia faba				0.1
Vicia sativa	Inglaterra	52		0.5

Existen otra serie de datos aislados y de diferentes autores acerca del contenido de ácido cianhídrico - en plantas, que a continuación se presentan:

- *Trifolium répens* 129 mg HCN / 100 g de materia seca
- *Manihot esculenta* (var. dulce en hojas) 468 mg de HCN por Kg de tejido fresco
- *Manihot esculenta* (var. amarga en hojas) 310 mg de HCN por Kg de tejido fresco
- *Nandina domestica* en las hojas 500 mg HCN / 100 g de tejido fresco (7)(12)(17).

Según Conn, las raíces de Cassava, las hojas de Sorgo y Laurel cerezo, pueden contener de 25 a 250 mg de ácido cianhídrico por 100 g de tejido fresco (7).

La mayoría de los investigadores se han avocado a la tarea de encontrar mejores métodos de detección y determinación del cianuro, más que a la cunatificación de éste en los tejidos vegetales. Además que la toxicidad crónica debida al cinuro ha despertado el interés por elaborar métodos más precisos y de gran sensibilidad. A continuación se presenta una tabla que resume varios métodos y sus límites de detección (28).

Tabla # 3

LIMITES DE DETECCION DE CIANURO POR VARIOS METODOS

REACCION	AUTOR	LIMITE DE DETECCION	PROCEDIMIENTO
Nitrato de plata	A.O.A.C.	0.54-1.08 mg/ml	titulación
Acido pícrico	Snell & Snell 1959	5-50 mg/ml	colorimetría (lectura a 530 nm.
Acido pícrico	Guignard 1906	30-50 mg/ml	cualitativo
p-benzoquinona	Guilbault & Kramer 1965	0.6-150 mg/ml	fluorometría (lectura a 400 y 480 nm
Piridoxal	Takanashi & Tamura 1970	0.026-1.3 mg/ml	fluorometría (lectura a 356 y 432 nm

CONTINUACION

TABLA # 3

REACCION	AUTOR	LIMITE DE DETECCION	PROCEDIMIENTO
p- cloramina	Pulss 1962	0.01-1.0 mg/ ml	colorimetría (lectura a 538 nm)

En realidad existe muy poca información de plantas que contienen al glucósido cianogénico, los investigadores que trabajan con este tóxico dirigen sus trabajos hacia la biosíntesis del tóxico (18) (21), a los efectos del tóxico en la planta (23), hacia casos particulares de intoxicaciones crónicas o agudas, al metabolismo (28) y des--toxicación del tóxico en el animal (20) y al desarrollo de nuevas técnicas de cuantificación.

O B J E T I V O

El objetivo de éste trabajo, es poner a la disposición de las personas interesadas, la información de plantas forrajeras que contienen glucósidos cianogénicos y su contenido expresado en ácido cianhídrico liberado. Estos forrajes representan algunas de las variedades más comunes en la República Mexicana.

Dentro de este mismo objetivo se pretende motivar a las personas que poseen ganado, para que realicen estas prácticas, ya que las técnicas que se usan en este trabajo para la detección y cuantificación de los glucósidos cianogénicos, no presentan dificultad alguna ni en el material que se usa, ni en el desarrollo de la técnica, lo que sugiere que en los lugares en donde no se cuente con muchos recursos, también se pueden llevar a cabo estos análisis.

Esperamos que en todos los centros de investigaciones agrícolas de los Estados de la República Mexicana, cuenten con estos análisis para asegurar la alimentación de los animales y evitar pérdidas en la ganadería debido a intoxicaciones por plantas que contienen glucósidos cianogénicos.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Se recibieron treinta y cinco muestras de forrajes, algunas de estas enviadas por el Centro de Investigaciones Agrícolas del Noreste del País (C.I.A.N.E.), específicamente del área de la Sierra de Chihuahua. Otras de las muestras fueron enviadas por el Centro de Investigaciones Agrícolas de la Mesa Central (C.I.A.M.E.C), y el área de influencia al campo agrícola es Zacatepec Morelos. Por último, se recolectaron algunas muestras en el Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

De las treinta y cinco muestras presentadas en este trabajo, algunas son del mismo género y especie, no así de la misma variedad, por lo tanto el número de forrajes diferentes es de veintisiete.

Las muestras que fueron enviadas de los Centros Experimentales, se encontraban en forma seca, y sin más especificación que el nombre común y científico. Las muestras recolectadas en el Estado de México se secaron a temperatura ambiente.

Todas las muestras fueron molidas momentos antes de hacer la detección y cuantificación del glucósido cianogénico.

Las formas de determinación son las siguientes:

- a) Método oficial cualitativo. Prueba 26.113 de la A.O.A.C.
- b) Método oficial cualitativo. Prueba 26.113 de la A.O.A.C. con modificación sugerida (adición de emulsina).
- c) Método oficial cuantitativo. Prueba 26.115 de la A.O.A.C.

La prueba 26.113 es cualitativa, según reacción - de Guignard (11), basada en la formación de isopurpurina - por fijación de ácido cianhídrico en el ácido pícrico en - presencia de un álcali (9) (11).

Para resultados negativos a la prueba 26.113, se adiciona "emulsina" (complejo enzimático conteniendo las - siguientes enzimas: amigdalasa, glucosidasa e hidroxinitri- lasa)

La prueba 26.115 es cuntitativa y consta de dos - partes muy importantes: primero, destilación por el método de Kjeldahl, y segundo titulación alcalina del cianuro por el método modificado de Liebig-Denigés (19).

Las formas de determinación son las siguientes:

- a) Método oficial cualitativo. Prueba 26.113 de la A.O.A.C.
- b) Método oficial cualitativo. Prueba 26.113 de la A.O.A.C. con modificación sugerida (adición de emulsina).
- c) Método oficial cuantitativo. Prueba 26.115 de la A.O.A.C.

La prueba 26.113 es cualitativa, según reacción - de Guignard (11), basada en la formación de isopurpurina - por fijación de ácido cianhídrico en el ácido pícrico en - presencia de un álcali (9) (11).

Para resultados negativos a la prueba 26.113, se adiciona "emulsina" (complejo enzimático conteniendo las - siguientes enzimas: amigdalasa, glucosidasa e hidroxinitri- lasa)

La prueba 26.115 es cuntitativa y consta de dos - partes muy importantes: primero, destilación por el método de Kjeldahl, y segundo titulación alcalina del cianuro por el método modificado de Liebig-Denígés (19).

Métodos de análisis A.O.A.C. (19)

Glucósidos cianogénicos en semillas y materiales similares.

26.113. Prueba cualitativa.

Prep. Las tiras de papel filtro se sumergen en una solución de ácido pícrico al 1% y se dejan secar, posteriormente se sumergen en una solución de Na_2CO_3 al 10 % y se dejan secar. Se guardan estas tiras de papel en un frasco con tapón.

Se cortan finamente cantidades pequeñas de material vegetal, y se colocan en un tubo de ensaye. Se inserta una tira de papel picrato de sodio húmedo en el tubo, teniendo cuidado de que no toque la muestra, ni la pared del tubo. Se agregan unas gotas de cloroformo, y se tapa el tubo. El papel picrato de sodio se tornará gradualmente de color naranja, después a un rojo ladrillo si el tejido vegetal contiene glucósidos cianogénicos. (Esta prueba es delicada y la rapidez de los cambios de color dependen de las cantidades de ácido cianhídrico libre). Esta prueba funciona mejor con material vegetal fresco, pero con algunos elementos relativamente secos particularmente semillas, deben ser molidas y humedecidas con agua y permitir la hidrólisis en un tubo cerrado que contenga una tira de papel picrato de sodio. Si es necesario se pueden agregar pequeñas cantidades de "emulsina" (19).

Método de titulación alcalina (19)

26.115. Prueba cuantitativa

Ponga de 10 a 20 g de muestra que pase por malla 20 - en un matraz de Kjeldahl de 800 ml, agregue 200 ml de agua y deje reposar de 2 a 4 horas. (La autólisis deberá ser llevada a cabo completamente pero ya conectada al destilador).

Colecte por destilación al vapor de 150 a 160 ml del destilado en una solución de NaOH (0.5 g en 20 ml de agua) y diluya a un volumen definido.

A 100 ml del destilado (es preferible diluir a 250 ml y titular una alícuota de 100ml) agregue 8 ml de NH_4OH 6 N y 2 ml de IK al 5 % y titule con nitrato de plata 0.02 N, usando microbureta. El punto final de la titulación es difícil de observar, pero una turbidez permanente puede ser reconocida, especialmente si se compara con un fondo negro (19).

Equivalencia $1 \text{ ml AgNO}_3 \text{ 0.02 N} = 1.08 \text{ mg HCN}$

La siguiente tabla muestra las treinta y cinco muestras tratadas con el nombre científico y el nombre común de estos forrajes.

Tabla # 4

MUESTRAS DE FORRAJES.

Nombre común	Nombre científico
1.- ELEFANTE	<u>Pennisetum purpureum</u> Schumach.
2.- COOPER	<u>Glycine javanica</u> L.
3.- BERMUDA	<u>Cynodon dactylon</u> Pers.
4.- ALEMAN	<u>Echinochloa polystachya</u> Hitch.
5.- SETARIA	<u>Setaria faberii</u> Herrm
6.- FERRER	
7.- PARA	<u>Panicum barbinoide</u> Trin
8.- KUDZU	<u>Pueraria phaseoloides</u> Benth
9.- TANNER	<u>Brachiaria rivulosa</u> L.
10.- ESTRELLA AFRICANA	<u>Cynodon plectostachyum</u> Pilger.
11.- ESTRELLA STO.DOMINGO	<u>Cynodon plectostachyum</u> Pilger.
12.- YUCA	<u>Manihot esculenta</u> Plum.
13.- JICAMA	<u>Pachyrrhizus erosus</u> Urb.
14.- JARAGUA	<u>Hyparrhenia rufa</u> Stapf.
15.- CLARENCE	<u>Glycine javanica</u> L.
16.- DOLICOS	<u>Dolichos lablab</u> L.
17.- CHAYA	<u>Cnidoscus chayamanza</u> Pohl.

Continuación Tabla # 4

Nombre común	Nombre científico
18.- PUNTA DE CAÑA	<u>Saccharum officinarum</u> L.
19.- SIRATRO	<u>Phaseolus atropurpureus</u> D.C.
20.- TINAROO	<u>Glycine javanica</u> L.
21.- PANGOLA	<u>Digitaria decumbens</u> Stent.
22.- GANDUL	<u>Cajanus cajan</u> Mills.
23.- CENTROSEMA	<u>Centrosema pubescens</u> Benth.
24.- GUAJE	<u>Leucoena leucocephala</u> Benth.
25.- CEBADA (13 var.)	<u>Hordeum</u> sp.
26.- GIRASOL (6 var.)	<u>Helianthus</u> sp.
27.- MAIZ (criollo)	<u>Zea mays</u> L.
28.- AVENA (var. Páramo)	<u>Avena sativa</u> L.
29.- NAVAJITA AZUL	<u>Bouteloa gracilis</u> Log ex Steud
30.- TRITRICALÉ	<u>Triticum sativum</u> L.
31.- AVENA TEXAS	<u>Avena sativa</u> L.
32.- GIRASOL	<u>Helianthus annuus</u> L.
33.- CEBADA	<u>Hordeum vulgare</u> L.
34.- PASTO NAVAJITA	<u>Bouteloa gracilis</u> Log ex Steud
35.- ALFALFA	<u>Medicago sativa</u> L.

Observaciones a la técnica

Estas observaciones fueron hechas durante la preparación de la prueba 26.115 de la A.O.A.C. para material seco.

1.- En primer término la necesidad de agregar una mayor cantidad de agua al matraz de destilación para la hidrólisis, debido al tipo de muestra de que se trata (plantas secas - y molidas), se practicó la prueba por duplicado de la muestra Yuca (Manihot esculenta) variando el volumen de agua y manteniéndolos constantes los demás parámetros (peso del forraje, tiempo de incubación).

2.- En cuanto al tiempo de incubación de la muestra antes de la destilación. Esta prueba que también se practicó por duplicado en la muestra Estrella Santo Domingo, se hicieron variaciones de una hora, dos horas y veinticuatro horas, manteniéndolos constantes el peso del forraje y la cantidad de agua.

3.- Y por último otra observación que se hace sobre la técnica de cuantificación, y consiste en saber si la adición de ácido expele al cianuro del sustrato en una mayor cantidad, ya que Wood en 1966 y Pulss en 1962 lo aseguraron, mientras que Bruijin en 1971 y el método de la A.O.A.C. 1965 practican la destilación sin acidificación (1) (21) (27). - Esta última prueba se llevó a cabo sobre la muestra Tinaroo.

La siguiente tabla nos ilustra estas tres pruebas y sus resultados.

Tabla # 5

PRUEBA N°	PESO FORRAJE	VOLUMEN AGUA	TIEMPO DE INCUBACION	ADICION DE ACIDO	RESULTADO (mg HCN - por 100g forraje)
<u>1</u>	20 g	200 ml 300 ml 400 ml	2 horas	no	6.048 6.048 6.048
<u>2</u>	20 g	400 ml	1 hora 2 horas 24 horas	no	5.4 8.1 8.1
<u>3</u>	20 g	400 ml	2 horas	si no	2.7 2.7

1.- Los resultados obtenidos en este ensayo con la muestra # 1 y diferentes cantidades de agua, fueron similares (6.048 mg HCN / 100 g de forraje seco).

Por lo que concluimos que la variación en el contenido de agua para la hidrólisis no determina un cambio en los valores de ácido cianhídrico liberado.

2.- Los resultados de esta variación con respecto al tiempo de incubación en la muestra # 2, nos dice que el tiempo mínimo será de 2 horas, para que exista la mayor cantidad de ácido cianhídrico liberado, ya que los resultados con menor tiempo de incubación difieren totalmente.

3.- En esta prueba la adición de ácido en la hidrólisis no expede una mayor cantidad de ácido cianhídrico proveniente de los glucósidos. Esto se concluye de la variación en la muestra # 3.

En resumen las tres observaciones hechas, sugieren modificaciones a la técnica cuando se trate de plantas secas. En este caso los parámetros quedan de la siguiente manera:

- i) Peso del forraje = 20 gramos
- ii) Volumen de agua para la hidrólisis = 400 ml
- iii) Tiempo de incubación mínimo = 2 horas

R E S U L T A D O S

Y

D I S C U S I O N

R E S U L T A D O S

Prueba 26.113 cualitativa. Los resultados se advierten positivos cuando el papel "prueba" vira al color naranja o rojo, dependiendo de la concentración de ácido cianhídrico que se libera. En este caso se dice que la muestra contiene el glucósido y la enzima que lo degrada.

Para evitar una interpretación falsa de los casos que salieron positivos con la prueba 26.113, y tomando en cuenta que las plantas pueden contener el glucósido pero no el complejo enzimático que permita la liberación del ácido cianhídrico durante la hidrólisis, se llevó a cabo la prueba 26.113 con la modificación sugerida (agregando emulsina). En ambas pruebas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla # 6

PRUEBAS CUALITATIVAS.

Nombre común*	Prueba 26.113 sin emulsina	con emulsina
1.- Elefante	negativa	negativa
2.- Cooper	negativa	negativa
3.- Bermuda	positiva	
4.- Aleman	positiva	
5.- Setaria	negativa	negativa
6.- Ferrer	positiva	
7.- Para	negativa	negativa
8.- Kudzu	negativa	negativa
9.- Tanner	positiva	
10.- Estrella Africana	positiva	
11.- Estrella Sto. Domingo	positiva	
12.- Yuca	positiva	
13.- Jicama	negativa	negativa
14.- Jaragua	negativa	negativa
15.- Clarence	negativa	negativa
16.- Dolichos	negativa	negativa
17.- Chaya	positiva	
18.- Punta de caña	negativa	negativa
19.- Siratro	negativa	negativa
20.- Tinaroo	positiva	

Continuación Tabla # 6

Nombre común*	Prueba 26.113 sin emulsina	con emulsina
21.- Pangola	negativa	negativa
22.- Gandul	negativa	negativa
23.- Centrosema	negativa	negativa
24.- Guaje	negativa	negativa
25.- Cebada	negativa	negativa
26.- Girasol	negativa	negativa
27.- Maíz	negativa	negativa
28.- Avena	negativa	negativa
29.- Navajita azul	negativa	negativa
30.- Tritricale	negativa	negativa
31.- Avena Texas	negativa	negativa
32.- Girasol	negativa	negativa
33.- Cebada	negativa	negativa
34.- Pasto navajita	negativa	negativa
35.- Alfalfa	negativa	negativa

* El nombre común que aquí aparece para cada una de las -muestras, venían inscritas en los envíos que nos hicieron de los Centros Experimentales de la Sierra de Chihuahua y de Zacatepec, Mor.

En la prueba 26.113 con la modificación sugerida (adición de emulsina) todas las muestras negativas a la primera prueba, salieron negativas, lo que quiere decir que los demás forrajes no presentan ni el glucósido ni la enzima que lo degrade.

Según estos resultados, nueve de treinta y cinco muestras fueron positivas a la prueba. O sea que representa un 25.7 %. Estas muestras positivas presentan tanto el glucósido como la enzima.

Las nueve muestras que fueron positivas a la prueba cualitativa, se sometieron por quintuplicado a la prueba 26.115 arrojando estos resultados como promedio:

Tabla # 7

CONTENIDO DE ACIDO CIANHIDRICO EN LOS FORRAJES
POSITIVOS A LA PRUEBA CUALITATIVA

NOMBRE COMUN	PRUEBA CUANTITATIVA 26.115 A.O.A.C.
BERMUDA	54 mg HCN/ Kg de forraje seco
ALEMAN	44.6 mg HCN/ Kg de forraje seco
FERRER	35.1 mg HCN/ Kg de forraje seco
TANNER	27 mg de HCN/ Kg de forraje seco
ESTRELLA AFRICANA	40.5 mg HCN/ Kg de forraje seco
ESTRELLA SNTO. DOMINGO	79.9 mg HCN/ Kg de forraje seco
YUCA	60.4 mg HCN/ Kg de forraje seco
CHAYA	318 mg HCN / Kg de forraje seco
TINAROO	27 mg HCN / Kg de forraje seco

Las concentraciones en ácido cianhídrico de estas nueve muestras varían de 27 mg de HCN/ Kg de forraje seco, hasta 318 mg de HCN/ Kg de forraje seco.

D I S C U S I O N

En cuanto a lo que a la técnica respecta, se puede decir que es segura ya que Montgomery (13) afirma que el método de titulación alcalina con nitrato de plata es confiable cuando los resultados están por arriba de 1 mg % de HCN y las muestras presentadas en este trabajo, que fueron positivas a la prueba cualitativa, arrojaron valores mínimos de 27 mg de HCN por cada Kg. de material seco.

Las técnicas tanto cualitativa como cuantitativa que presenta la Asociación Oficial de Químicas Analíticas - (A.O.A.C.) con los números 26.113 y 26.115 respectivamente, son adaptaciones de la técnica original de Guignard (11). - La diferencia existente entre la técnica de Guignard y la de la A.O.A.C., es que el destilado de HCN, Guignard lo recibe en hidróxido de amonio mientras que en el segundo caso es recibido en hidróxido de sodio.

A la prueba 26.115 cuantitativa se le hicieron algunas modificaciones en el presente trabajo por que se consideró que dicha técnica solo se aplica a semillas ya que el contenido de agua para la hidrólisis es insuficiente y el tiempo mínimo para la incubación antes de la hidrólisis es de dos horas. Además se comprobó que la acidificación, factor señalado por algunos investigadores como coadyuvante para la liberación de una mayor cantidad de ácido cianhídrico (27) (21) (1), puede ser descartada.

Por lo que compete a las muestras trabajadas, estas fueron recibidas de los Centros Agrícolas Experimentales de la sierra de Chihuahua y de Zacatepec Morelos mientras que otras fueron recolectadas en el Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Debido a que en el envío no se especificaron los datos pedidos acerca de la planta, se procedió a hacerles las pruebas cualitativas y cuantitativas sin considerar algunos factores como edad, condiciones de crecimiento, procedimiento de secado, los cuales permitirían concluir más ampliamente en cuanto al contenido real del tóxico.

Ya que las muestras se han recibido como "forraje de consumo", en este sentido los resultados guardan todo su valor para juzgar la toxicidad de cada planta.

Además los resultados obtenidos deben de considerarse como un mínimo por la razón de que el procedimiento de secado, en algunos casos pudo haber destruido una parte del glucósido, encontrándose así, una cifra menor que la real.

En caso de que el forraje se consumiera fresco en el campo-independientemente del hecho de que va a tener más agua en sus tejidos- la planta podría tener una mayor cantidad del glucósido cianogénico, que después de su desecación.

Generalmente en la literatura se reporta a este tipo de plantas que contienen el glucósido cianogénico como

potencialmente tóxicas y son pocos los autores que expresan el contenido del tóxico (12) (10).

Si se considera que los valores mínimos y máximos obtenidos en el presente trabajo fueron 27 mg de HCN y 318 mg de HCN respectivamente por cada Kg de materia seca, -- que las muestras trabajadas se encontraban en forma seca -- con un 8.7% de humedad y las observaciones de algunos autores como Radeleff (22) en cuanto a que la planta conforme -- pierde humedad disminuye en contenido cianogénico, se puede concluir que las plantas aquí muestreadas son potencialmente tóxicas (12) (13).

Haciendo una comparación no muy estricta podemos observar la pérdida de glucósido con respecto a la pérdida de agua en el siguiente caso: Nartey en 1968 (18) reporta -- que la Cassava (*Manihot* spp) contiene 468 mg de HCN por cada Kg de material fresco mientras que en este trabajo se reporta para la *Manihot* esculenta 60.4 mg de HCN por cada Kg de material seco. Esto significa una pérdida de 407.6 mg de HCN liberado del glucósido en la planta con 3 ó 4% menos de humedad considerando que ésta en la muestra fresca es de 12% aproximadamente.

En cuanto a la intoxicación en animales Couch (8) considera que el material vegetal que contiene menos de 20 mg de HCN / Kg no es tóxico, pero si la cantidad es mayor puede provocar serios daños.

Se sabe que la dosis letal mínima de ácido cianhídrico libre, es del orden de 2.0 a 2.3 mg / Kg de peso vivo y que esta cantidad puede ser aplicada a la mayoría de -- las especies animales (10) (22).

Algunos autores reportan que la flora microbiana ruminal en los ovinos tiene la capacidad de hidrolizar al -- glucósido cianogénico. Esto quiere decir que si la planta -- contiene solamente el glucósido y no la enzima que permita la liberación del HCN, de cualquier forma el ácido cianhídrico -- se desprendería en el rumen (2). Esto sugiere que los rumian -- tes son más susceptibles a la intoxicación por plantas ciano -- génicas, que los monogástricos ya que además en éstos el -- ácido clorhídrico del estómago destruye la enzima liberado -- ra de ácido cianhídrico (6).

Otro de los investigadores hacen estimaciones de la cantidad de tóxico que en un momento dado se puede acumular -- en el rumen de un poligástrico y por ejemplo señala lo si -- guiente: " las cantidades de ácido cianhídrico encontradas en el maíz Kafir son muy pequeñas y difíciles de determinar sin embargo serían suficientes para matar a un animal; un -- cálculo muy sencillo puede indicar la cantidad de tóxico que puede encontrarse en el rumen de un bovino. Asumiendo que la capacidad del rumen sea de 275 litros, el peso de su conte -- nido sería de aproximadamente 200 Kg. De esta cantidad por -- lo menos 50 Kg serían materia seca que significarían una ---

concentración total de ácido cianhídrico de 5 g considerando el contenido de éste en el alimento en 0.01 % ". Esta cantidad muy probablemente es suficiente para matar a un bovino adulto, sin embargo se están pasando por alto algunos factores como el hecho de que raramente se reportan casos de animales que de una sola vez ingieran 200 Kg de alimento, ya que el rumen en ningún momento se encuentra totalmente vacío, más bien permanece con un contenido constante en un animal regularmente alimentado. Esto hace que la estimación anterior aunque teóricamente es posible, existen pocas probabilidades de que se presente en la práctica (6).

Ahora bien, es imposible indicar con certeza la dosis tóxica de cianuro en forma de glucósido cianogénico ya que varía de acuerdo a las condiciones que se den en la planta y en el animal en el momento de la ingestión. En la intoxicación de rumiantes se han reportado (10)(12) los siguientes elementos como importantes en el desarrollo de la misma:

- _ Edad de la planta cianogénica
- _ Cantidad de la planta ingerida
- _ Dieta del animal
- _ pH del contenido gástrico
- _ porcentaje de ácido cianhídrico total presente en estado libre en la planta
- _ concentración de la enzima liberadora de cianuro presente en la planta

- _ velocidad de liberación y metabolismo del cianuro en el tracto digestivo
- _ velocidad relativa de absorción y detoxificación del cianuro.

La importancia de todos estos factores se destacan en la práctica y se reporta que en los animales que comen con rapidez son los que generalmente mueren y una ingestión de material vegetal equivalente a 4 mg de HCN / Kg de peso vivo debe considerarse decididamente mortal si se consume con excesiva rapidez (10).

A manera de ilustración puede decirse que si un carnero de 50 Kg de peso ingiere con excesiva rapidez una ración de 500 g del forraje Chaya (*Cnidosculus chayamanza*) cuyo contenido reportado en este trabajo es de 318 mg de HCN / Kg de forraje seco y bajo las condiciones previamente mencionadas para la presentación de la intoxicación, esta cantidad sería más que suficiente para provocar la muerte del animal puesto que éste habría ingerido 3.18 mg de HCN por Kg de peso vivo, cifra que rebasa la dosis letal mínima de 2.3 mg de HCN / Kg de peso vivo.

C O N C L U S I O N

C O N C L U S I O N

En síntesis, este trabajo ha cumplido su objetivo, que fué el poner a la disposición de las personas interesadas, el contenido de glucósidos cianogénicos expresado en ácido cianhídrico liberado de plantas forrajeras comunes de la República Mexicana; ha cumplido hasta donde fué posible, ya que nuestro deseo era el obtener el mayor número de muestras representativas de cada región. Por lo tanto este trabajo, se verá culminado cuando todos los Centros de Investigaciones Agrícolas, practiquen estos análisis y aseguren la alimentación del ganado evitando pérdidas económicas debido a intoxicaciones.

El trabajo presentó treinta y cinco muestras tratadas por métodos oficiales de la A.O.A.C. (Estadounidense); nueve de estas muestras contienen glucósidos cianogénicos, representando un 25.7% de los forrajes analizados. Las tres muestras que presentan la mayor cantidad de ácido cianhídrico liberado son: Bermuda (Cynodon dactylon P.) con 54 mg de HCN por Kg de materia seca; Estrella Santo Domingo (Cynodon plectostachyum P.) con 79.9 mg de HCN por Kg de materia seca, y Chaya (Cnidoscylus chayamanza P.) con 318 mg de HCN por Kg de materia seca*.

* El término "materia seca" se refiere al forraje recibido en estado seco con 8.7% de humedad.

Las nueve muestras que fueron positivas a la prueba cualitativa y cuantitativa, presentan tanto el glucósido cianogénico, como la enzima liberadora del ácido cianhídrico. Además deberán de considerarse "potencialmente tóxicas", si se ingieren como material fresco, con rapidez y en grandes cantidades.

Se recomienda que los forrajes presentados como "potencialmente tóxicos" se sequen a una temperatura mayor de 60°C, ya que así podrán destruir a la enzima liberadora del ácido cianhídrico, además de que al ir disminuyendo la humedad también disminuye el contenido del glucósido cianogénico. Por otra parte se recomienda que las personas que tengan ganado de pastoreo, se cercioren del tipo de plantas que ingieren los animales en esa área, y como una posible solución en el caso de que se presente alguna intoxicación con cianuro, se sugiere proceder de inmediato a aplicar por vía intravenosa o intraperitoneal, una solución de nitrito de sodio al 3%, seguida por una solución de tiosulfato de sodio al 25%. Aplicando en una segunda fase el lavado estomacal.

Con esto queda concluido el trabajo diciendo:

"no es importante el que tan profundo se trate un tema, sino el beneficio que pueda reportar".

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

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

- (1).- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. A.O.A.C., Official methods of analysts, 10 ed. p. 341. (1965). En (28).
- (2).- BANSAL, R.D. Cyanogenesis in birdsfoot trefoil, Lotus - cornicolatus L. Foragenotes. Vol 12. 2. p 40 - 2. (1966).
- (3).- BISSET, F.H., R.C. CLAPP., R.A. COBURN. Cyanogenesis in manioc; concerning lotaustralin. Phytochemistry. 8. p - 2235 - 47. (1969). En (17).
- (4).- BUTLER, G.W. The distribution of the cyanoglucosides - linamarin and lotaustralin in higher plants. Phytochemistry. 4. p 127 - 31. (1965). En (17).
- (5).- BLUMENTHAL - GOLDSCHMIDT. S., G.W. BUTLER and E.E. CONN. Incorporation of hidrocyanic acid labelled with carbon 14 into seedlings. Nature. 197. p 718 - 19. (1965). En (17).
- (6).- C.K. FRANCIS and W.B. CONNELL. J. Am. Chem. Soc. 32. -- 1624. (1913).
- (7).- CONN ERICK E. Cyanogenic glycosides; their occurrence, biosynthesis, and function. p. 55-63. (1973). En "Chronic cassava toxicity. January 1973. Int. Develop. Res.- Centre Monogr. IDRC-010c.
- (8).- COUCH, J.F. Poisoning of livestock by plants that produce hidrocyanic acid, U.S.D.A. Leaflet 88. (1932). En -- (22).

- (9).- FABRE RENE y RENE THUHAUT. Tratado de Toxicología. - Tomo 1. p. 311-32. (1976).
- (10).- GARNER, R.J. Toxicología Veterinaria. p. 83-7. (1965).
- (11).- GUIGNARD. L. The detection and estimation of HCN in beans. Ann. Fals. 9. p.301-5 En Chemical Abstracts - 11. p 675. (1917).
- (12).- HILL, D.C. Chronic cyanide toxicity and domestical - animals. p. 105-11. (1973). En "Chronic cassava toxicity. January 1973. Int. Develop. Res. Centre. Monogr. IDRC-010c.
- (13).- MONTGOMERY, R.D. Observations of the cyanide content and toxicity of tropical pulses. W.I. Med. J. XIII.- (1964).
- (14).- MONTGOMERY, R.D. Cyanogens. Science & Technology - - Food. 5. p. 143-155. (1972).
- (15).- MUKERJI, M. and R.C. Smith. The chemistry and pharmacy of the vitamins. Ann.Biochem. Exp. Med. 3. p. - - 23-41. (1943). En (20).
- (16).- MUSHET, C.W., K.L. KELLEY, G.E. BONER, and J.C. RICHARDS. Antidotal efficiency of vitamin B₁₂ in experimental cyanide poisoning. Pol. Soc. Exp. Biol. 81. p. 234-236. (1952).
- (17).- NARTEY, FREDERICK. Biosynthesis of cyanogenic glucosides in cassava (Manihot spp.). p. 73-87. (1973).- En "Chronic cassava toxicity. January 1973. Int. Develop. Res. Centre. Monogr. IDRC-010c.
- (18).- NARTEY, FREDERICK. Studies on cassava. Manihot utilisima. Pohl 1. Cyanogenesis; The biosynthesis of lin

marin and lotaustralin in etiolated seedlings. Phytochemistry 7. p.1307-1312. (1968).

- (19).- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. p.481. (1975).
- (20).- OKE, O.L. The mode of cyanide detoxication. p. - - 97-104. (1973). En # Chronic cassava toxicity. January 1973). Int. Develop. Res. Centre. Monogr. - - IDRC-010c.
- (21).- PULSS, G. Untersuchungen zur Isolierung und Bestimmung von Blausäure in pflanzlichem Material. Z. -- Anal. Chem. 190. p. 402-409. (1962). En (28).
- (22).- RADELEFF, R.D. Veterinary Toxicology. p. 50-54. - - (1970).
- (23).- ROBINSON, M.F. Cyanogenesis in plants. Biol. Reviews 5. p. 126-141. (1930).
- (24).- SEELY, M.K., R.S. CRIDDLE and E.E. CONN. On the requirement of hydroxynitrile lyase for flavin. J. -- Biol. Chem. 241. p. 4457-4462. (1966). En (7).
- (25).- WHITE ABRAHAM, PHILIPS HANDLER, EMIL L. SMITH. Principios de bioquímica. (1977).
- (26).- WOKES, F. and C.W. Pickard. The role of vitamin B₁₂ in human nutrition. Amer. J. Chem. Nutr. 3. p 383-390. (1955). En (20).
- (27).- WOOD, T. The cyanogenic glucosides content of cassava and cassava products. J. Sci. Food. Agric. 16. - p. 300-305. (1965). En (28).

(28).- ZINTAK. A. Assay methods for hidrocyanic acid in -
plants tissues and their application in studies of
cyanogenic glucosides in Manihot esculenta. p. - -
89-96. (1973). En "Chronic cassava toxicity. Janua-
ry 1973. Int. Develop. Res. Centre. Monogr. IDRC-010c.