



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA

ESTUDIO SOBRE LA POSIBLE TOXICIDAD
DE LOS FRUTOS DE LA ESPECIE
PYRACANTHA KOIDZUMII Rehd.
EN EL VALLE DE MEXICO
(AREA METROPOLITANA)

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G I A

P R E S E N T A:

ROXANA GRACIELA FLORES GALVEZ

E. N. E. P. I.

Iztacala Edo. de México

1986



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.

A mis padres:

José Antonio Flores de Imbert

y

Graciela Gálvez Leal

por sus consejos y apoyo
en todo momento

A mis hermanos:

José Antonio

Ricardo Marcelo

Carlos Roberto

y

Juan Manuel

por su ayuda y compañía

Agradecimientos:

A la Q.F.B. Irma Delfín Alcalá por haberme dado la oportunidad de elaborar el presente trabajo en el Departamento de Química de la E.N.E.P Iztacala, por sus enseñanzas, consejos y la ayuda que tan amablemente me ha brindado.

A la señora Yolanda Adán (técnico académico) por su ayuda y experiencia en el trabajo de laboratorio.

A los biólogos José Luis Andrade, Beatriz Flores P., Gabriela Pérez y al I.B.Q. Abel Fuente T por sus apreciaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Al personal que labora en los Herbarios del Instituto de Biología (MEXU) y del Colegio de Postgraduados (CHAPA) por las facilidades otorgadas para la revisión de ejemplares.

A mi hermano P.A. José Antonio por su ayuda en la elaboración de figuras (mapas y gráficas) incluidas en este trabajo.

A mis hermanos Carlos Roberto, Juan Manuel y Ricardo Marcello por su colaboración en el trabajo de campo.

A la P.B. Edith Benítez por su comprensión, ayuda y principalmente su amistad durante el transcurso de la carrera y aún hoy.

The purpose of an experiment
is to better understand the
real world, not to understand
the experimental data.

Diamond.

Las investigaciones en las ciencias
aplicadas conducen a las reformas,
las investigaciones en las ciencias
puras llevan a las revoluciones.

J.J. Thomson

"Necesitamos hacer ciencia, crear ciencia
nosotros mismos, Si no tenemos tradición
científica, habrá que crearla; si en
ciencia, más que en nada, no existe el
mañana sin el ayer, comencemos por con
vertirnos nosotros en ayer, para que ten
gan un mañana los que nos siguen"

I. Chávez.

CONTENIDO

		Pág.
1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
3.	Antecedentes	3
3.1	Presencia de materiales tóxicos en vegetales	3
3.1.1	Presencia de materiales cianogé- nicos en rosáceas.	5
3.2	Causas de la variación en la con- centración de materiales cianogé- nicos en plantas.	6
3.3	Evolución de especies cianogénicas	9
3.4	Efectos fisiológicos de los cianuros	12
4.	Objetivos	15
5.	Material y Métodos	16
6.	Resultados	23
6.1	Muestras maceradas en Agua	23
6.1.1	Muestras maceradas en Saliva	28
6.1.2	Muestras maceradas con Sacarasa	31
6.1.3	Comparación entre los 3 tratamientos	33
7.	Análisis de resultados	38
7.1	Variación en la concentración de HCN " en los frutos de <u>Pyracantha koidzumii</u> Rehd. durante el periodo Julio-Diciem- bre de 1985.	"

7.1.1	Variación en la concentración de HCN en los frutos de <u>P. koidzumii</u> Rehd. dependiendo del estadio de maduración	39
7.1.2	Variación en la concentración de HCN en los frutos de piracanto colectados en 5 localidades	40
7.1.3	Variación del HCN liberado por los frutos de piracanto en función de los factores hidrolíticos	40
7.1.4	Variación en la concentración de HCN no atribuibles a: estación del año, estadio de maduración del fruto y la localidad	41
8.	Conclusiones	43
9.	Apéndices	45
9.1	Clasificación taxonomica de la especie	45
9.1.1	Descripción de la especie	46
9.2	Determinación de cianuros	49
9.3	Análisis estadístico	52
10.	Bibliografía	53

Se analizaron los frutos inmaduros y maduros del piracanto (Pyracantha koidzumii Rehd.) con respecto a su contenido de productos cianogénicos, presumiblemente glucósidos.

La presente investigación, se realizó en 5 localidades del área metropolitana: Texcoco, Chalco, Tlalmanalco, Vista Hermosa y la Escuela Nacional de Estudios Profesionales (E.N.E.P) Iztacala; durante un periodo de 5 meses.

Se investigó la influencia de una enzima exógena glucolítica en la liberación del ácido cianhídrico a partir de frutos macerados.

Se comparó la variación en la cantidad liberada de ácido cianhídrico en función de la localidad y la estación del año.

Los resultados obtenidos, muestran la liberación de ácido cianhídrico después de someter a maceración en agua durante 24 horas los frutos maduros e inmaduros del piracanto.

Se encontraron diferencias individuales en la concentración de ácido cianhídrico liberado, no solo entre ejemplares de diferentes localidades, sino también dentro de la misma localidad.

Los arbustos de piracanto encontrados en Tlalmanalco, mostraron consistentemente concentraciones de ácido cianhídrico elevadas.

En todas las localidades se observaron variaciones de concentración de ácido cianhídrico, obteniéndose un máximo para frutos inmaduros en el mes de agosto y para los maduros en Octubre y Noviembre.

El efecto de la adición de una enzima exógena (se ensayaron 2) no parece ser determinante para la liberación del ácido cianhídrico, ya que en el propio fruto debe existir la enzima hidrolítica requerida para su liberación.

Las concentraciones encontradas de ácido cianhídrico liberado en la mayoría de los ejemplares muestreados son muy bajas y no parecen representar un riesgo para la salud, ya que para presentar síntomas de intoxicación se tendría que consumir una cantidad considerable de frutos.

2.

Introducción

* La especie Pyracantha koidzumii Rehd. es muy común como planta ornamental en los parques y jardines, tanto públicos como privados de la zona urbana metropolitana. Durante muchos meses del año, el arbusto tiene abundancia de frutos inmaduros (verdes) y maduros (de llamativo color rojo) en todo el follaje (1,6,12,31,34).

Los reportes sobre la existencia de glucósidos cianogénicos en las semillas de algunos miembros de la familia Rosacea (27,32,49), sumados a un caso reciente de intoxicación severa, provocada (aparentemente) por frutos de P. koidzumii Rehd. (13,40) perteneciente a ésta familia y el que la información oral obtenida, en el sentido de que mucha gente los come y aún los usa para hacer agua fresca (Texcoco), contradicen la hipótesis de su posible toxicidad.

Por lo antes expuesto, consideramos de interés el estudio de los frutos inmaduros y maduros de Pyracantha koidzumii Rehd. colectados en la zona urbana metropolitana.

3.

Antecedentes

3.1 Presencia de materiales tóxicos en Vegetales

* Los ecólogos suponen que muchos productos naturales existen como productos metabólicos secundarios para la protección de la planta, existiendo en equilibrio dinámico, incluyendo niveles de cambios rápidos y ciclos que envuelven productos primarios como azúcares y aminoácidos. Sin em-

bargo, la selección natural de compuestos secundarios se realiza tanto por su papel en procesos metabólicos primarios como en el de defensa' (37).

Los compuestos secundarios en plantas, tienen la función de repeler o inhibir herbívoros, patógenos o competidores (18,33)

*Seigler (37) opina que es impresionante la evidencia acerca del papel defensivo que desempeñan los compuestos secundarios en plantas y discute la existencia de otras ventajas selectivas, que aún no han sido ampliamente consideradas, como por ejemplo, el que estos compuestos pudieran estar íntimamente ligados a funciones metabólicas primarias en los vegetales. Por otra parte, comenta que Fairbain y El-Masry en 1967 expresaron el punto de vista de la mayoría de los bioquímicos, al concluir que las sustancias secundarias eran intermediarias de otros compuestos posiblemente importantes en procesos metabólicos. Sugiriéndose finalmente que los compuestos secundarios pueden actuar como importantes reguladores de procesos bioquímicos.

Otra evidencia de la distribución general de los compuestos secundarios (entre las plantas y las partes que las constituyen) puede ser encontrada en un trabajo de Hegnauer publicado en 1969, citado por Jones(19), donde argumenta que la distribución de los compuestos secundarios podría ser la base de la quimio-taxonomía vegetal.

De todas las sustancias secundarias que han sido caracterizadas en plantas superiores, los glucósidos cianogénicos son los más abundantes, ocurriendo aproximadamente en 2% de angiospermas y en la misma frecuencia en gimnospermas (19).

3.1.1 Presencia de materiales cianogénicos en Rosaceas.

*Rengade (32) menciona: "sí por razón de sus frutos son agradables y nutritivas la mayoría de las especies que constituyen a la familia Rosaceas; en cambio, contienen un veneno enérgico, activo, violento, que puede decirse que es característico de la familia, el ácido cianhídrico, encerrado en mayor o menor cantidad en las semillas".

† Nahrstedt y Limmer (27) proponen que dentro de las Rosaceas, la fenilalanina es la base de los glicósidos cianogénicos como la amigdalina y prunasina, encontrados principalmente en las subfamilias Maloideae y Prunoideae, y de aquí el que sea considerada la familia como típicamente cianogénica, de cualquier modo, quizá se presenten otro tipo de glucósidos cianogénicos en esta familia.

‡ Entre las especies que contienen ácido cianhídrico (o prúsico) en sus semillas, se mencionan a los duraznos, las almendras amargas, el albaricoque, las peras y las fresas (32,48)†

§ Las almendras amargas contienen el glucósido amigdalina que por efecto de la humedad libera pequeñas cantidades de ácido cianhídrico, que le confiere propiedades toxicas además de ser, junto con los aceites esenciales, el responsable del olor y sabor característico de esta semilla. El ingerir 7 almendras amargas produce ansiedad en los individuos y en mayor dosis puede ocasionar la muerte (32). Por destilación de la pulpa de almendras silvestres se obtiene el aceite esencial de almendras, que llega a contener hasta 10% de ácido cianhídrico, bastaría con 10-30 gotas de

este producto, para causar la muerte a un individuo adulto. Una sola gota, puesta en la boca de un pájaro le ocasiona la muerte en pocos minutos (48). También se han dado casos graves de intoxicación al ingerir semillas de peras.

No se encontró en la bibliografía consultada una referencia directa sobre la toxicidad de Pyracantha koidzumii Rehd.; sin embargo en publicaciones no científicas (periódicos) se reportó: "la especie Pyracantha koidzumii Rehd, conocida con el nombre de piracanto, vegetal perteneciente a la familia de las Rosaceas, contiene glucósidos cianogénicos en sus frutos (sobre todo en los verdes), que al contacto con la saliva desencadenan un proceso químico que conlleva a la liberación de ácido cianhídrico, por lo que está catalogada como planta ornamental de riesgo tóxico, si se llegan a ingerir cantidades sustanciales de los frutos" (13,40).

3.2 Causas de la variación en la concentración de materiales cianogénicos en plantas.

Se ha escrito mucho acerca de que el contenido de glucósidos cianogénicos depende del genotipo, de las condiciones ambientales, la época del año, del día, el estadio de desarrollo y el órgano de la planta que se estudie (45).

Se han realizado numerosos trabajos en relación a la variación en la concentración de ácido cianhídrico liberado por los vegetales. Por ejemplo, en el castaño de Indias mexicano (Ungnadia speciosa) se presentan cianolípidos en cantidades arriba del 15% de peso seco. Sin embargo, a 3 días de la germinación los cianolípidos desaparecen, sugiriendo que los compuestos secundarios han actuado como al-

macén de compuestos esenciales (37).

En algunas especies de Sorghum se sugiere que los glucósidos cianogénicos actúan como almacén de nitrógeno, siendo utilizado para la producción de semillas (37).

Jones y sus colaboradores (33) estudiaron el trébol blanco y el pie de pájaro, especies que son capaces de producir glucósidos cianogénicos, compuestos hechos de azúcares ligados a cianuros complejos y depositados en sus hojas. Si dos enzimas particulares están presentes cuando las hojas de la planta son dañadas, los glucósidos cianogénicos se rompen, liberando el CN^- eventualmente. Estos dos tipos de trébol son "polimorficos" para la cianogénesis. Solo algunas plantas pueden producir los glucósidos y las enzimas requeridas para la liberación del cianuro. No todas las plantas pueden defenderse por medio de glucósidos cianogénicos.*

Un mapa publicado* en 1954 por Daday (5,33), mostró la distribución geográfica de plantas capaces de sintetizar glucósidos cianogénicos y las enzimas apropiadas para liberar el cianuro. Daday encontró una relación entre la temperatura de Enero (dentro de su área de estudio) y la proporción de tréboles en esta región que podían liberar CN^- . En regiones calurosas como en el Mediterraneo cerca del 70-90% de las plantas colectadas mostraron cianogénesis, en regiones frías ninguno de los tréboles analizados resultó cianogénico. La habilidad de producir CN^- libre, podría ser una ventaja para plantas que habitan zonas **calientes**. La cianogénesis podría ser menos valiosa en áreas donde el clima o el tiempo invernal controla la población de herbívoros (6,32).*

Janzen (18), reporta que en Acacia farnesiana existe variación en el contenido de HCN inter-individualmente. Además observó que el contenido de ácido cianhídrico en la temporada de sequía era más bajo que en la húmeda, encontrándose que el cambio de época húmeda a seca es proporcional con respecto al contenido de HCN.

Treub en 1896, referido por Jones (19), no acepto que las sustancias cianogénicas fueran defensivas, pero sí, que posiblemente serían un precursor en la síntesis de proteínas. Ahora existen evidencias de que el HCN no es un precursor principal en la biosíntesis de aminoácidos y podríamos agregar que en algunas plantas normalmente no se puede determinar como empieza la cinogénesis de la β -cianoalanina y asparagina que son sintetizadas a partir de ácido cianhídrico.

Al mismo tiempo Fowden en 1967, estudio la vía normal de biosíntesis de asparagina puesto que es uno de los principales problemas a resolver en cuanto al metabolismo de aminoácidos en vegetales se refiere, por lo que se considera una posibilidad atractiva que dicha vía sea a partir de ácido cianhídrico (19).

La sugerencia hecha por Conn y Butler en 1969, citada por Jones (19), sobre la síntesis de β -cianoalanina y asparagina a partir de HCN como parte de una desintoxicación es muy probable. Por otra parte, Solomonson y Spehar en 1977 comentaron que el papel fundamental del ácido cianhídrico es la regulación de un sistema finamente balanceado, que controla la actividad de la nitrato-reductasa en Chorella vulgaris y en otras plantas.

El efecto del HCN sobre la nitrato-reductasa en Sorghum, Zea y Triticum es evidente. Existen varias razones para establecer una relación entre el HCN y la cantidad de desintoxicación (19).

Otro aspecto importante a considerar es la variación en la cantidad de ácido cianhídrico dentro de una especie, una población y dentro de un individuo, si tomamos en cuenta las diversas partes que lo constituyen y sus diferentes capacidades cianogénicas (38).

Las hojas, los tallos y los frutos inmaduros han sido reportados como las partes más cianogénicas en varias especies (39).

En un arbusto del chaparral de California Heteromeles arbutifolia se correlacionó la variación de taninos y glucósidos cianogénicos con respecto a las variaciones estacionales. Resultando que las hojas jóvenes y los frutos inmaduros tuvieron altas concentraciones de taninos y cianoglucósidos, pero en los frutos maduros la concentración de taninos disminuyó y los glucósidos fueron transportados hacia la pulpa y las semillas. Esto sugiere que ambos compuestos son transportados y/o catabolizados dentro de la planta (37).

3.3 Evolución de especies cianogénicas.

Jones (19) menciona que los resultados de Conn en 1976 y Hughes-Conn en el mismo año, sugieren un mecanismo para la evolución de especies cianogénicas basándose en las mutaciones que ocurren ocasionalmente en los genes responsables de la regulación para mantener la síntesis de glucósi

dos cianogénicos en un bajo nivel. Como consecuencia de la mutación los cianoglucósidos podrían producirse en grandes cantidades. En algunos casos esta producción excesiva podría ser muy nociva y los nuevos individuos podrían ser seleccionados. Sin embargo, en algunas especies esta sobreproducción podría considerarse normal al paso del tiempo. Esta hipótesis se considera difícil de suponer, ya que las mutaciones a este nivel (genes reguladores) ocurren con baja probabilidad.

Otros mecanismos propuestos son el de Wittaker y Feeny en 1971, citados por Jones (19) y Seigler (37), sugiriendo que los compuestos secundarios son productos de desecho o compuestos nuevos.

Jones (19) propone que las substancias defensivas (compuestos secundarios) pueden considerarse compuestos primarios por lo siguiente:

- 1.- No es posible esperar que los individuos cianogénicos ocurran ocasionalmente en especies que normalmente no son cianogénicas. La presencia esporádica de individuos cianogénicos en maíz es significativa porque Oaks y Jackson en 1972, referidos por Jones (19), mostraron que sus plantas eran capaces de sintetizar asparagina a partir de HCN exógeno. Ahora parece que Zea maiz regularmente produce compuestos cianogénicos en concentraciones por debajo del nivel normal de detección, por lo consecuente se explica la presencia de ácido cianhídrico endógeno en plantas.
- 2.- Por el uso de mutágenos que no contenían cianoglucósidos en cantidades detectables, podría ser posible la obtención de plantas cianogénicas.

3.- La relación más cercana entre especies, géneros y familias podría ser la estructura y biosíntesis de sus glucósidos cianogénicos.

Las plantas que no contienen compuestos cianogénicos en cantidades considerables podrían deberse a que son capaces de utilizar el ácido cianhídrico (19).

Knowles en 1976, citado por Jones (19), afirmó que los organismos más primitivos eran capaces de metabolizar cianuro en condiciones anaerobias. Con el incremento de oxígeno en la atmósfera y la evolución de la respiración aerobia los organismos capaces de desintoxicarse de cianuro bajo estas nuevas condiciones se vieron favorecidos.

Shivelbein en 1969 (19), sugirió que la función original de la enzima rhodanasa fué la desintoxicación de cianuro y que la presencia de una amplia distribución de ella en los organismos vivientes tal vez sea una reliquia-bioquímica. Jones (19), concluyó que el cianuro aparece comunmente en algún estadio, durante la vida de muchas plantas, animales y microorganismos.

Treub de 1896 a 1907 pensó que la producción de ácido cianhídrico fué favorecida, haciendo la sugerencia de que el HCN es "un precursor universal en la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados en las plantas" (19).

La principal razón por la cual se dificulta el reconocimiento de ácido cianhídrico en vegetales, es la baja concentración en que habitualmente se encuentran en la mayoría de ellos. Los métodos mediante los cuales se reconocía el HCN llevaban mucho tiempo (15-20 horas) y los resultados eran poco confiables, debido a que las técnicas utilizadas eran poco específicas (14,17,21,28,29,35).

Gewitz y Hegnauer en 1974, citados por Jones(19), aplicaron un bioensayo en hojas de espinaca (Chorella) y en algas verde-azules (Plectonema boryanum) presumiendo que pudieran ser cianogénicas y obtuvieron resultados positivos para ácido cianhídrico en ambas plantas. Hegnauer en 1976 escribió "consecuentemente el ácido prúsico puede estar presente en todas las plantas".

3.4 Efectos fisiológicos de los cianuros

Los cianuros son compuestos extremadamente tóxicos. Pueden clasificarse en dos grupos:

- 1.- HCN y sus sales como el NaCN, KCN, $\text{Ca}(\text{CN})_2$, $\text{Cu}(\text{CN})_2$ que constituyen el grupo de mayor riesgo.
- 2.- Derivados halogenados como el cloruro y bromuro de cianógeno, el ferricianuro de sodio o los sulfocianuros.

El ácido cianhídrico y sus sales se consideran entre los venenos más activos que se conocen.

El ácido cianhídrico es un líquido transparente, casi incoloro, de sabor amargo y de olor característico, muy soluble en agua (11).

Se han reportado intoxicaciones por beber licor de almendras (Kirsch) que llega a contener de 20 a 80 mg de ácido cianhídrico por litro (30).

La inhalación de ácido cianhídrico en concentraciones elevadas, o la ingestión de 50 a 100 mg de NaCN o KCN ocasionan inmediatamente la anoxia y la muerte. "A dosis más débiles aparece irritación digestiva y confusión mental, el ritmo respiratorio se retrasa en forma extraordinaria" (11,30).

Los cianuros de sodio y potasio liberan normalmente ácido cianhídrico en contacto con el aire, se descomponen rápidamente en el estómago en contacto con el HCl y ocasionan la muerte en una dosis de centigramos (30).

Los derivados cianogénicos y la acetona-cianhidrina o acrilonitrilo son mortales a dosis de 1 gr. (30).

La hidrólisis de los nitrilos alifáticos produce liberación de cianuro. La rapidez variable de esta hidrólisis, determina la toxicidad relativa de ciertos nitrilos (11).

El mecanismo común de intoxicación es una anoxia histotóxica debido al bloqueo de la respiración celular por el ión cianuro (11,30,49,50).

Los cianuros inhiben cierto número de enzimas, formando complejos estables con sus metales, por el hecho de su localización al comienzo de la cadena respiratoria, la citocromo oxidasa, es sin duda, la enzima cuya inhibición es más crítica (7,11). (Cuadros 1 y 2).

Se inhiben más de 40 reacciones enzimáticas, finalmente el cianuro se combina con la metahemoglobina fisiológica del organismo. El cianuro es tóxico en animales y humanos, en dosis extremadamente pequeñas. La muerte por envenenamiento con cianuro ha sido atribuida a la interferencia con el sistema de la citocromo oxidasa. Esta forma clásica de envenenamiento con cianuro, da por resultado la hipoxia histológica, causando la muerte rápidamente, no habiendo antídoto contra esto (11).

La muerte lenta, por bajas dosis de cianuro producen un inmediato y profundo colapso cardiovascular-respiratorio, que no responde a las técnicas normales de resucitación. La muerte está caracterizada por una caída en la presión sanguínea arterial, hiperventilación, un incremento en la presión venosa central y bradicardia (50).

Reacción con

Citocromo	Origen	CO	<u>Cianuro</u>	O ₂
a	Mitocondria	no	no	no
a ₃	Mitocondria	si	si	si
b	Mitocondria	no	no	muy ligeramente
b ₃	Microsomas	no	no	si
b ₆	Cloroplastos	no	no	si
b ₇	Mitocondria de <u>Aurum</u> y <u>Symlocarpus</u>	no	no	si
c	Mitocondria	no	no	no
c ₁	Mitocondria	no	no	no
f	Cloroplastos	no	no	no

Cuadro 1.- Algunas propiedades de los citocromos vegetales incluyendo algunos que han sido determinados con citocromos animales (tomado de Davies et.al. (7)).

I N H I B I D O R E S			
	CO	<u>Cianuro</u>	Dietil-ditiocarbamato Na
Citocromo oxidasa	+	+	ligeramente inhibida
Peroxidasa	-	+	?
Catalasa	-	+	?
Polifenoloxidasa	+	+	+
Laccasa	-	+	+
Acido Ascorbico oxidasa	ligera- mente inhibida	+	+
Acido glicolico oxidasa	-	-	?

Cuadro 2.- Efectos de los inhibidores respiratorios sobre las oxidasas vegetales.

A los 3-5 minutos después de la administración de cianuro, la presión sanguínea se incrementa y ocurre la parálisis respiratoria, seguido por una apnea terminal, una hipotensión progresiva, una bradicardia profunda y cambio hipoxico en el electrocardiograma (50).

La presión venosa central se incrementa de un valor normal de 2.3 mm Hg a 14-20 mm Hg a la hora de la muerte. Las concentraciones plasmáticas de histamina se incrementan significativamente después de la administración de cianuro. Los resultados antes mencionados, no descartan la posibilidad de que las muertes por cianuro sean el resultado de la disrupción de una enzima (49).

Sí la concentración del ión CN^- no es lo suficientemente elevada para ocasionar la muerte, es poco a poco desplazado de su complejo con el ión férrico de la citocromo oxidasa y de la metahemoglobina, y es convertido en tiocianato y eliminado por la orina (11).

4. Objetivos Generales

Determinar sí en los frutos de Pyracantha koidzumii Rehd. común en el Valle de México, existe un principio tóxico, presumiblemente un glucósido cianogénico, capaz de liberar ácido cianhídrico por la acción de enzimas hidrolíticas.

Relacionar la concentración del principio tóxico con el estadio de maduración del fruto, la localización geográfica (dentro del área metropolitana) y la época del año.

Determinar por apoyo bibliográfico sí la concentración del glucósido hace que este arbusto pueda constituir un riesgo para la salud.

Objetivos secuenciales

Seleccionar un método conveniente para la determinación cualitativa y cuantitativa del ácido cianhídrico liberado por maceración en agua de frutos de Pyracantha koidzumii Rehd.

Analizar el fruto de la especie P. koidzumii Rehd. para determinar la posible presencia de glucósidos cianogénicos.

Determinar el cambio en la concentración de ácido cianhídrico liberado, cuando la maceración se hace en presencia de enzimas hidrolíticas exógenas (α -amilasa y β -amilasa).

Comparar el cambio de concentración del glucósido en función de:

- a) Del estado de maduración de los frutos
- b) de la situación geográfica: Zona NE, E, NW del área metropolitana.
- c) de la estación del año.

5. Material y Métodos

La zona de trabajo (Fig. 1) se escogió en función del elevado número de arbustos de Pyracantha koidzumii Rehd. encontrados y su fácil acceso.

La colecta se realizó en 5 parques de la zona urbana metropolitana (Cuadro 3) Texcoco al Noreste del Distrito Federal Chalco y Tlalmanalco al Este, E.N.E.P Iztacala y Vista Hermosa al Noroeste.

En cada parque se muestrearon 10 arbustos, por ser el número que podía trabajarse adecuadamente en el laboratorio y por haber sido éste el número total de arbustos con frutos durante todo el periodo de colecta en la localidad de Texcoco.

FIGURA 1--

Mapa del Estado de Mexico y Distrito Federal ubicando los sitios de muestreo.



Cuadro 3.- Ubicación, características climáticas y tipo de suelo de las localidades estudiadas:

Localidad	Ubicación		Unidad del Suelo	Clima ⁺
	Lat. N	Long. E		
Texcoco	19° 30'	98° 55'	Vertisol crómico pélico	C(wo)(w)b(i)
Chalco	19° 15'	98° 55'	Fluvisol eútrico	"
Tlalmanalco	19° 13'	98° 50'	Regosol eútrico	"
		Long.W		
Vista Hermosa	19° 29'	99° 14'	Foezem haplico	"
E.N.E.P Iztacala	19° 32'	99° 13'	Foezem haplico	"

clima: Subhúmedo templado.

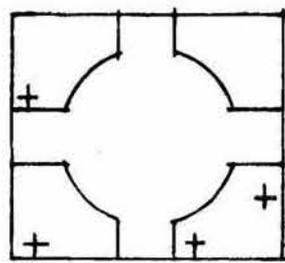
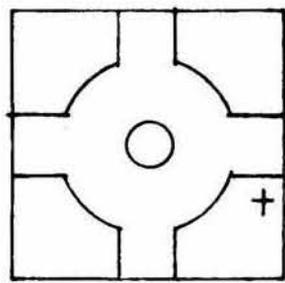
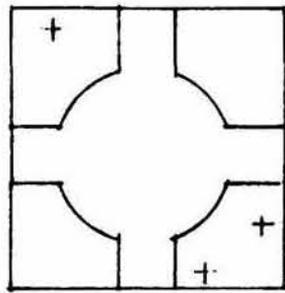
+ Sistema de clasificación climática de Köppen, modificada por García (42).

La ubicación de los arbustos en cada parque (Fig. 2) se realizó en forma aleatoria (sorteo al azar). Excepto en Texcoco, donde se muestrearon todos los arbustos con frutos (Cuadro 4).

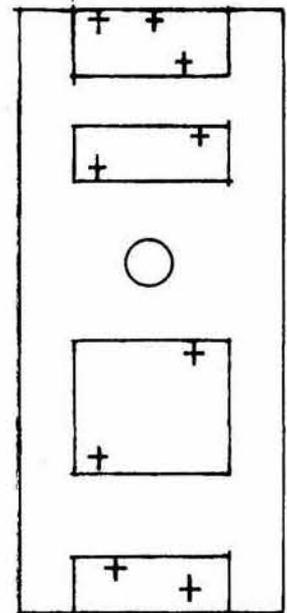
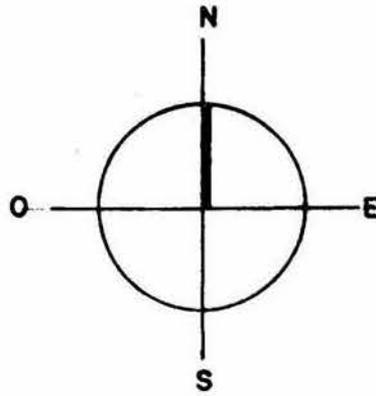
Localidad	Número de Arbustos	No. muestras sugeridas	No. muestras seleccionadas
Texcoco ⁺⁺	960	32	10
Chalco	491	20	10
Tlalmanalco	66	5	10
Vista Hermosa	569	20	10
E.N.E.P Iztacala	123	8	10

Cuadro 4.- Número de arbustos para cada localidad, número de muestras sugeridas para el análisis (8), número de muestras analizadas, ejemplares seleccionados y su distribución en los parques (Fig. 2).

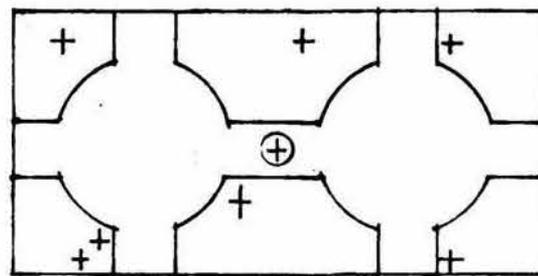
⁺⁺ En esta localidad sólo en los 10 arbustos muestreados se encontrarán frutos durante el periodo en que se realizó el estudio, por lo que se eligió una muestra homogénea de 10 arbustos para las otras localidades.



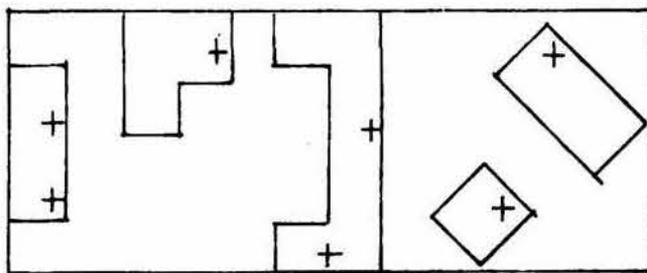
Texcoco



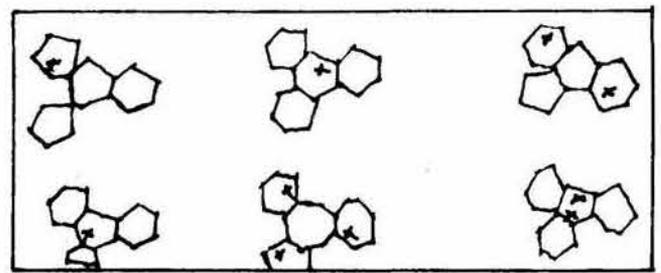
Tlalmanalco



Chalco



E.N.E.P Iztacala



Vista Hermosa

FIGURA 2- Ubicacion de los arbustos muestreo en las 5 localidades estudiadas.

Arbustos de Pyracantha koidzumii Rehd.

De cada arbusto se colectaron de 10 a 30 frutos inmaduros y/o maduros para trabajarse en el laboratorio. Para nuestra investigación clasificamos los frutos en inmaduros y maduros, dependiendo de su color: verdes o rojos (ningún color o tonalidad intermedio); no se tuvo otro criterio que permitiera conocer la "edad" (estadio de maduración) de los frutos que se trabajaron, aunque podía variar ampliamente, ya que durante todo el tiempo del estudio coexistían en un mismo arbusto frutos verdes, rojos e incluso flores.

En cada parque se colectó durante un periodo de 5 meses a intervalos de 15 días (10 colectas), periodo que para Texcoco, Chalco y Tlalmanalco fué de Julio a Noviembre; y para Vista Hermosa y E.N.E.P Iztacala fué de Agosto a Diciembre. El periodo de colecta estuvo limitado por la existencia de frutos en los arbustos.

Los frutos fueron colectados en la parte superior de cada arbusto a una altura aproximada de 1.09 ± 0.45 m; excepto durante los meses de Noviembre y Diciembre en que la escasez de frutos nos hizo colectar todos los existentes.

Los frutos fueron guardados en bolsas de polietileno hasta su análisis en el laboratorio.

La cuantificación de cianuros se hizo por el método de Guignard (14,17,21,26,29,35), el análisis consistió de los siguiente:

Lavado.- Los frutos colectados se lavaron en agua corriente durante aproximadamente 4 minutos y se secaron sobre papel absorbente.

Hidrólisis del glucósido y cuantificación del ácido cianhídrico:

- a) 10 frutos inmaduros (0.042 ± 0.036 gr/fruto) y/o 10 frutos maduros (0.197 ± 0.107 gr/fruto) se trituraron en un mortero con 2 ml. de agua destilada.

El macerado se dejó en un pequeño vial durante 24 horas a temperatura ambiente en presencia de 2 tiras reactivas de Guignard.

- b) 10 frutos inmaduros y/o maduros se maceraron en 2 ml de saliva y se dejaron en presencia de las tiras de Guignard durante 24 horas a temperatura ambiente.
- c) 10 frutos inmaduros y/o maduros se trituraron en agua destilada y se les agregaron aproximadamente 10 g de sacarasa (200 w/mg), se dejaron macerar en presencia de las tiras reactivas de Guignard durante 24 horas a temperatura ambiente.

Se comparó el color (intensidad y tono) de las tiras reactivas con el de la escala patrón (Apéndice 9.2)

El valor de CN^- encontrado se relacionó con la muestra que contenía 5 frutos/ml para poder determinar la concentración de CN^- /fruto.

6.

Resultados

6.1

Muestras maceradas en agua

- 1.- Texcoco, la concentración de HCN tanto en frutos maduros como en inmaduros fué fluctuante tendiendo a disminuir al paso de los meses. No hubo frutos maduros durante los meses de Julio y Noviembre. La concentración más alta se detecto en Agosto en frutos inmaduros. Cabe mencionar que durante todo el tiempo que duro el trabajo se encontraron muy pocos arbustos con frutos y éstos eran muy escasos, los frutos inmaduros fueron relativamente más abundantes que los maduros y persistieron durante todo el tiempo de colecta (Fig. 3)
- 2.- Chalco, la concentración de ácido cianhídrico tanto en frutos maduros como en inmaduros fué fluctuante, observándose una disminución al finalizar el año. Los frutos maduros mostraron consistentemente concentraciones de HCN más elevadas que los frutos inmaduros; la concentración más alta se obtuvo en Octubre para los frutos maduros y en Septiembre para los inmaduros. (Fig 4, Cuadros 5 y 6)
- 3.- Tlalmanalco, la concentración de HCN tanto en frutos maduros como en inmaduros fué fluctuante observándose una disminución al finalizar el año. Durante el mes de Julio no se encontraron frutos maduros. Los frutos maduros mostraron consistentemente concentraciones más elevadas que los frutos inmaduros. La concentración más alta se obtuvo en Octubre tanto para frutos maduros como inmaduros (Fig. 5, cuadros 5 y 6).

- 4.- Vista Hermosa: la concentración de HCN tanto en frutos maduros como en inmaduros fué fluctuante observándose una disminución hacia el final del año. Los frutos maduros mostraron consistentemente concentraciones más elevadas que los frutos inmaduros. La concentración más alta se obtuvo en Octubre para los frutos maduros y en Noviembre para los inmaduros (Fig. 6, cuadros 5 y 6).
- 5.- E.N .E.P Iztacala; la concentración de HCN, tanto en frutos maduros como en inmaduros fué fluctuante tendiendo a disminuir al paso de los meses. La concentración más alta se detectó en Agosto en frutos inmaduros (Fig. 7 cuadros 5 y 6).
- 6.- Todas las localidades: Se compararon las concentraciones de HCN de los frutos maduros e inmaduros a través de los meses (tiempo) obteniéndose un comportamiento fluctuante. Los frutos inmaduros presentaron su concentración promedio más alta en el mes de Agosto y los maduros tuvieron sus picos más elevados en Octubre y Noviembre. En Diciembre al comenzar el invierno, tanto frutos maduros como inmaduros tienden a bajar sus concentraciones de HCN (Fig. 8, cuadros 5 y 6).

MUESTRA EN AGUA

Fig.3 Texcoco

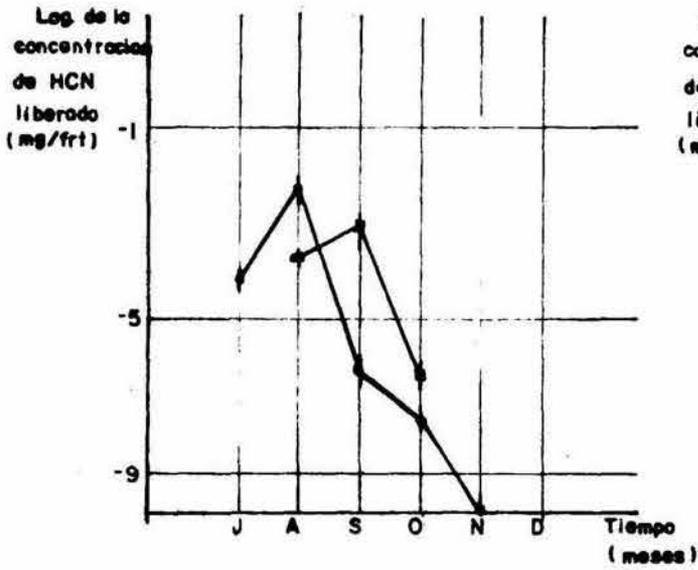


Fig.4 Chalco

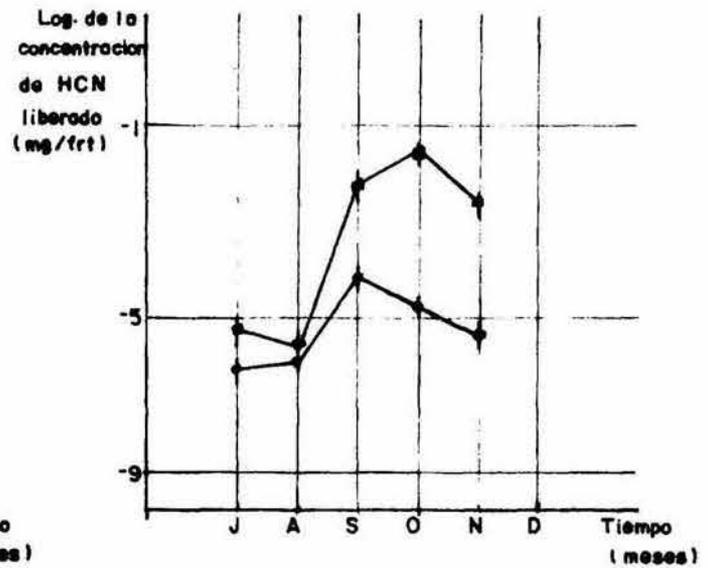


Fig.5 Tlalmanalco

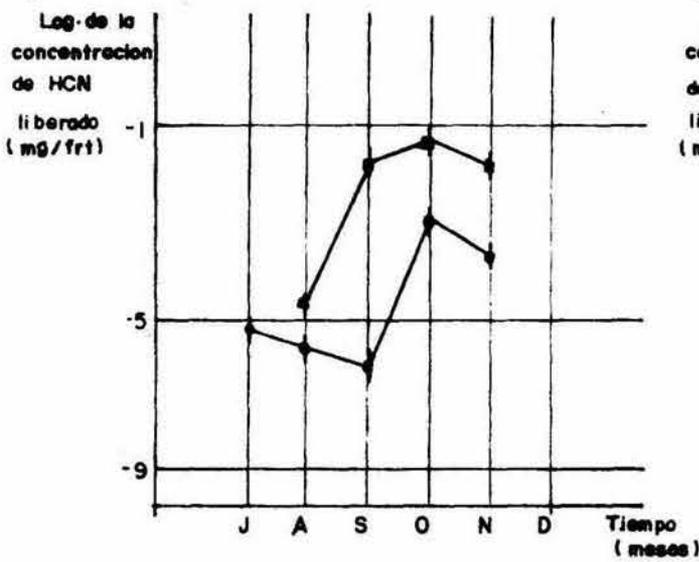


Fig.6 Vista Hermosa

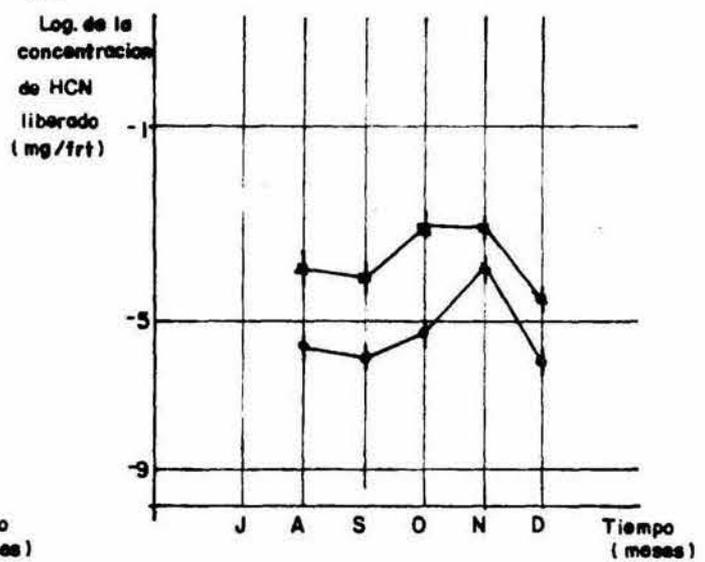


Fig.7 E.N.E.P.I

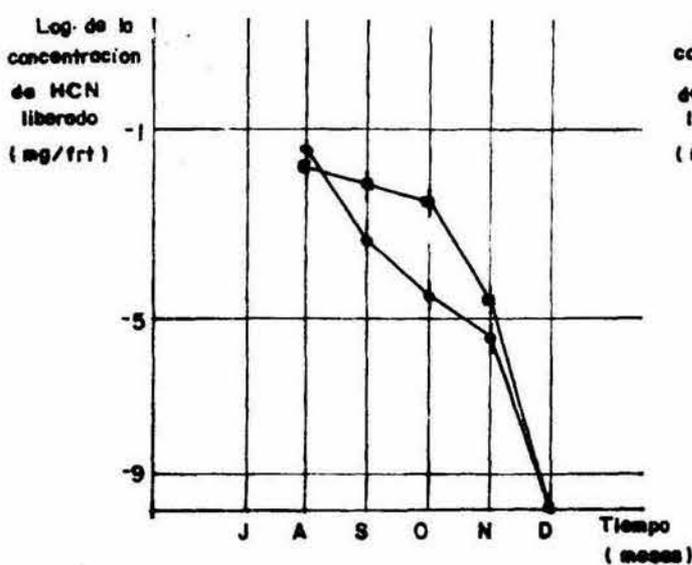
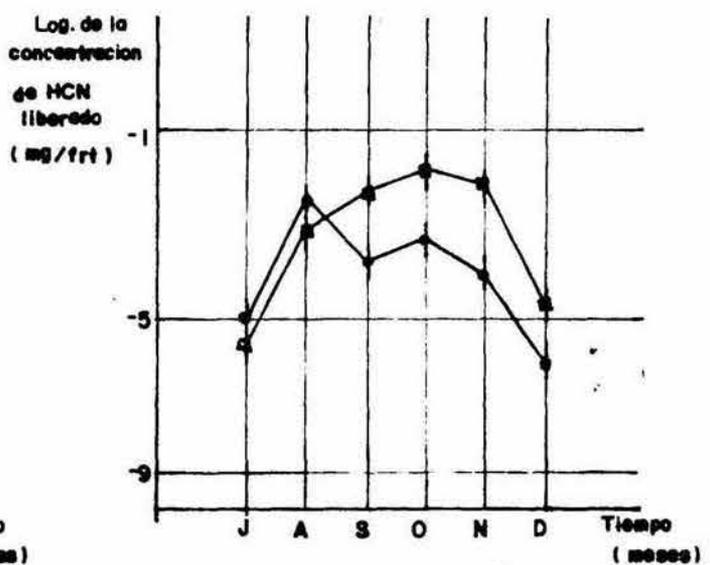


Fig.8 Localidades



Relacion entre la concentración de HCN liberado (mg/frt) a través de los meses (Tiempo) y el estado de maduración del fruto.

■ Fruto maduro
○ Fruto inmaduro

± error estandar promedio 10 arbustos.

Cuadro No. 5

Concentración de HCN liberado en frutos inmaduros (mg/fruto) $\times 10^{-6}$ *

		Texcoco	Chalco	Tlalmanalco	Vista-Hermosa	E. N. E. P. I	Promedio
JULIO	Agua	24 \pm 7.6	0.83 \pm 0.3	6.2 \pm 2.8	—	—	9.7 \pm 2.1
	Saliva	* *	* *	* *	—	—	
	Sacarosa	* *	* *	* *	—	—	
							9.7 \pm 4
AGOSTO		5100 \pm 1612	2 \pm 0.6	2.3 \pm 0.7	1.6 \pm 0.5	10000 \pm 3162	3300 \pm 476
		0.5 \pm 0.2	* *	* *	170 \pm 69	* *	510 \pm 154
		* *	* *	* *	0	* *	0
							11400 \pm 6582
SEPTIEMBRE		0.2 \pm 0.09	62 \pm 21	1.4 \pm 0.5	1.2 \pm 0.4	120 \pm 38	32 \pm 4.9
		1.4 \pm 0.7	1.3 \pm 0.7	2.6 \pm 1.1	2.2 \pm 0.7	* *	2.7 \pm 0.6
		0.13 \pm 0.07	170 \pm 98	0	0.13 \pm 0.05	* *	25 \pm 5.6
							20 \pm 11.5
OCTUBRE		0.07 \pm 0.03	83 \pm 3.4	1250 \pm 442	6 \pm 1.6	14 \pm 5.3	270 \pm 43
		0.43 \pm 0.2	0	63 \pm 22	1100 \pm 348	59 \pm 22	310 \pm 51
		0	0	1400 \pm 529	0	0	300 \pm 52
							290 \pm 167.4
NOVIEMBRE		0	0.71 \pm 0.2	110 \pm 37	100 \pm 32	2.9 \pm 1.1	49 \pm 7.8
		83 \pm 29	0.83 \pm 0.3	1.2 \pm 0.4	0	4.4 \pm 1.7	18 \pm 28
		0	0	0	0	0.17 \pm 0.07	0.5 \pm 0.08
							22 \pm 13
DICIEMBRE		—	—	—	1.2 \pm 0.4	0	0.61 \pm 0.2
		—	—	—	0	0	0
		—	—	—	0	0	0
Promedio	general	910 \pm 86	32 \pm 3.17	230 \pm 22.3	68 \pm 4.8	1700 \pm 209	.

* La concentración reportada es el promedio de 10 arbustos \pm error estándar

* El número de frutos por arbusto no fue suficiente para realizar las pruebas

* No hubo frutos

Las concentraciones $< 1 \times 10^{-7}$ se consideraron ≈ 0

Cuadro No. 6

Concentración de HCN liberado en frutos maduros (mg/fruto) x 10⁻⁶ *

		Texcoco	Chalco	Tlalmanalco	Vista-Hermosa	E.N.E.P.I	Promedio	
JULIO	Agua		4 ± 1.8				4 ± 1.8	
	Saliva	* * *	* *	* * *	—	—		
	Sacarasa							
								4 ± 2.1
AGOSTO		100 ± 32	3.8 ± 1.9	13 ± 5.3	213 ± 67	3500 ± 1107	950 ± 150	
		5 ± 3.5	* *	* *	1400 ± 443	* *	7000 ± 2021	
		* *	* *	* *	50 ± 25	* *	50 ± 25	
								2700 ± 1558
SEPTIEMBRE		380 ± 134	7300 ± 2308	20000 ± 6324	150 ± 47	2000 ± 632	6200 ± 894	
		380 ± 190	360 ± 114	4700 ± 1570	1100 ± 348	* *	1700 ± 296	
		170 ± 98	2500 ± 833	2300 ± 766	1300 ± 411	* *	1700 ± 305	
								3200 ± 1848
OCTUBRE		0.5 ± 0.5	30000 ± 10000	60000 ± 20000	2500 ± 833	1100 ± 348	20000 ± 3244	
		100000 ± 100000	60000 ± 20000	60000 ± 21213	8900 ± 2976	1200 ± 379	33000 ± 5425	
		* *	10000 ± 3333	210 ± 79	2300 ± 766	200 ± 63	3800 ± 643	
								9000 ± 10969
NOVIEMBRE			4300 ± 1625	20000 ± 5164	1600 ± 605	12 ± 4	11000 ± 1784	
		* * *	20000 ± 7559	100000 ± 44720	3 ± 1.13	33 ± 10	23000 ± 4271	
			2100 ± 939	30000 ± 15000	14 ± 5.3	10 ± 3.2	4200 ± 823	
								13000 ± 7512
DICIEMBRE					16 ± 5.7	0	8 ± 2.4	
		—	—	—	15 ± 5.7	0	7 ± 2.2	
					290 ± 109	0	200 ± 63	
								71 ± 41
Promedio	general.	6800 ± 1221	14600 ± 1230	36400 ± 3487	1500 ± 112	910 ± 97		

* La concentración reportada es el promedio de 10 arbustos ± error estándar

* * El número de frutos por arbustos no fue suficiente para realizar las pruebas

* * * No hubo frutos

Las concentraciones $< 1 \times 10^{-7}$ se consideraron = 0

6.1.1

Muestras maceradas en saliva

Aún cuando el trabajo de laboratorio se inició en Julio, no fúe sino hasta Agosto que se investigo la posibilidad de que el HCN se liberara bajo la influencia de alguna enzima contenida en la saliva.

En todas las localidades muestreadas los frutos maduros liberaron concentraciones mayores de HCN que los frutos inmaduros.

- 1.- Texcoco, en Octubre se detectó la concentración mayor en frutos maduros y en Noviembre en los frutos inmaduros. La concentración de ácido cianhídrico liberado tiende a ser mayor en los últimos meses del año a diferencia de lo observado en las muestras maceradas en agua, lo que parece mostrar el efecto de alguna enzima contenida en la saliva (Fig. 9, cuadros 5 y 6).
- 2.- Chalco, se detectó la concentración más elevada en los frutos maduros en el mes de Octubre. En los frutos maduros se aprecia el efecto de alguna enzima de la saliva, no así en los inmaduros (Fig. 10, cuadros 5 y 6)
- 3.- Tlalmanalco: Se detectó la concentración más elevada en los frutos maduros en Noviembre. En los frutos maduros se aprecia el efecto de alguna enzima contenida en la saliva, no así en los inmaduros (Fig. 11, cuauros 5 y 6).

- 4.- Vista Hermosa; la concentración más elevada se detectó en el mes de Octubre en frutos maduros. Tanto en los frutos inmaduros como en los maduros se apreció el efecto de alguna enzima de la saliva (Fig.12, cuadros 5 y 6).
- 5.- E.N.E.P Iztacala: En Agosto y Septiembre los arbustos tuvieron pocos frutos, por lo que no se pudo hacer la prueba en saliva durante esos meses. La concentración más elevada de HCN se detectó en frutos maduros en Octubre. La gráfica corresponde exactamente a la de las muestras maceradas en agua, por lo que no se considera que exista una influencia de ninguna de las enzimas contenidas en la saliva (Fig.13, cuadros 5 y 6).
- 6.- En todas las localidades: Se hizo la comparación global de la concentración de HCN liberado entre frutos maduros e inmaduros tratados en saliva a través de los meses. En promedio las concentraciones más altas se encontraron en los frutos maduros, teniendo como picos los meses de Octubre y Noviembre, tendiendo a disminuir en Diciembre. Los frutos inmaduros tuvieron su concentración más alta en Agosto disminuyendo paulatinamente hasta llegar a concentraciones por debajo del nivel de medición en Diciembre (Fig. 14, cuadros 5 y 6).

Al trabajar con el promedio de las concentraciones detectadas en los frutos de Pyracantha koidzumii Rehd. de todas las localidades no se hizo evidente la acción de la saliva, que se había manifestado en forma clara en 4 de las cinco localidades estudiadas.

MUESTRA EN SALIVA

Fig.9 Texcoco

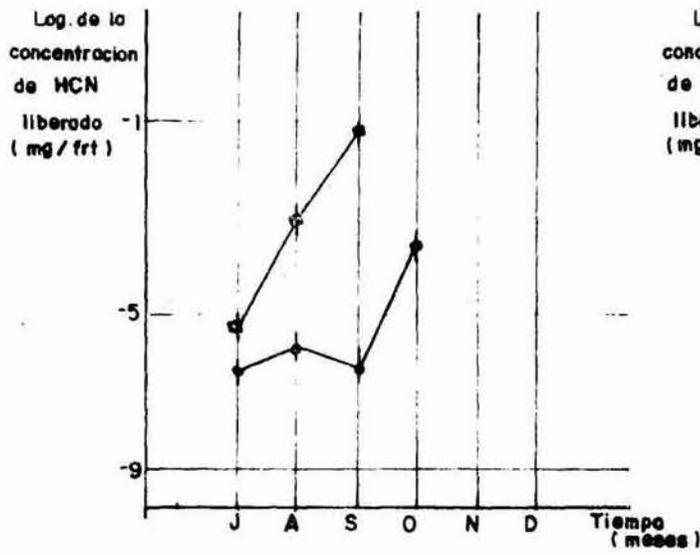


Fig.10 Chalco

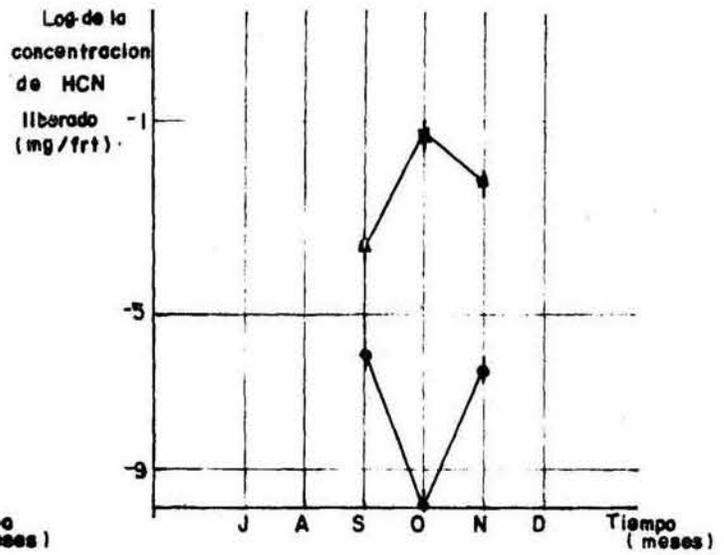


Fig.11 Tlalmanalco

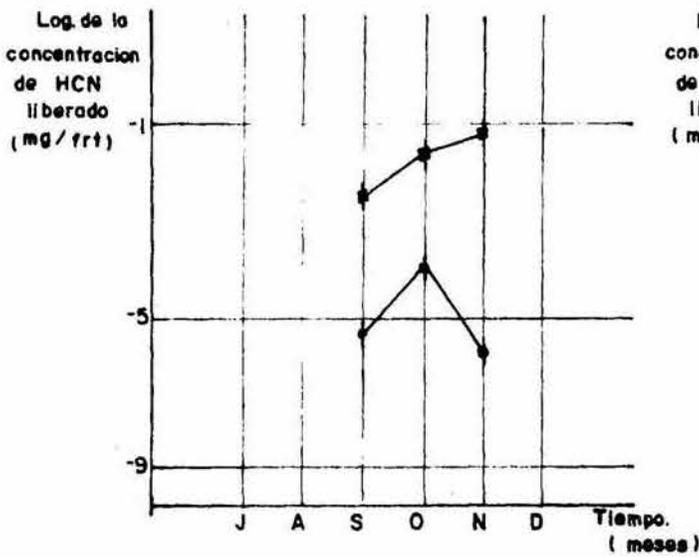


Fig.12 Vista Hermosa

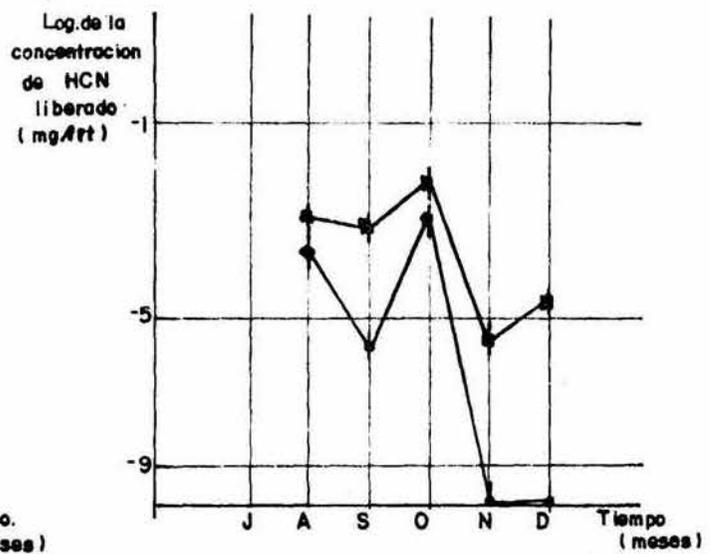


Fig.13 E.N.E.P.I

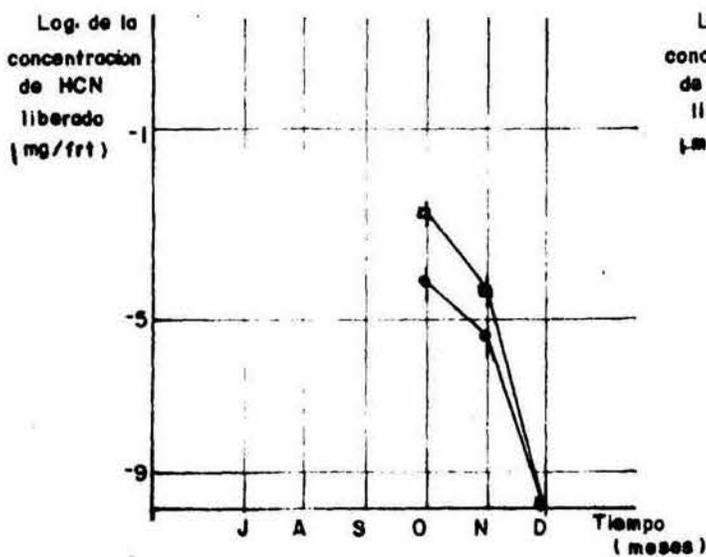
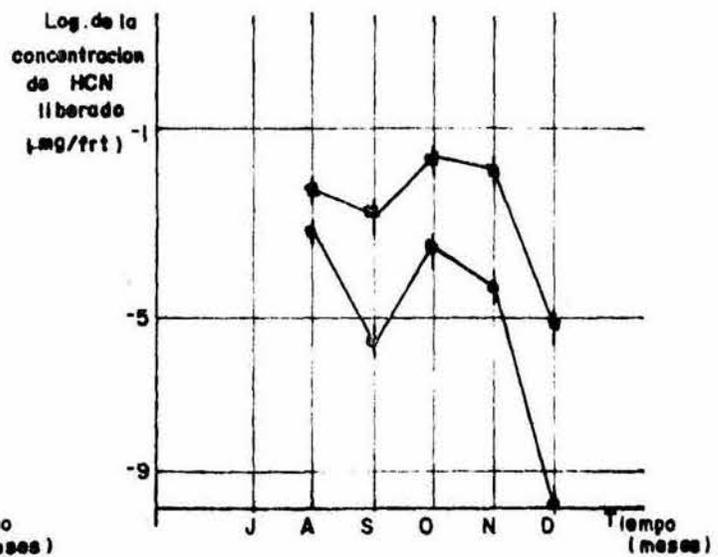


Fig.14 Localidades



Relacion entre la concentración de HCN liberado (mg/frt) a través de los meses (Tiempo) y el estado de maduración del fruto.

□ Fruto maduro
○ Fruto inmaduro

* error estándar promedio 10 arbustos.

El trabajo comenzó en Julio, pero posteriormente se investigó sobre la posible liberación del ácido cianhídrico bajo la influencia de una enzima del tipo α -hidrolasa como la sacarasa y el trabajo en este sentido se inició en Agosto; sin embargo, durante éste mes, no se colectó una cantidad suficiente de frutos en Texcoco, Chalco, Tlalmanalco y E.N.E.P Iztacala debido a la escasa cantidad de dichos frutos presente en los arbustos.

Tampoco se obtuvieron muestras suficiente los demás meses, lo que se puede apreciar en las figuras 15 a 20.

En Vista Hermosa se obtuvo un registro más completo, debido a que la mayoría de los arbustos muestreados tuvieron durante todo el tiempo de colecta frutos maduros e inmaduros. Cabe mencionar que la cantidad de frutos por arbusto fué abundante, facilitando el uso de los mismos en las 3 pruebas que se trabajaron (agua, saliva y sacarasa).

Los resultados obtenidos en todas las localidades muestran variaciones erráticas, lo único que parece cierto es que la enzima no ayudó a la hidrólisis del glucósido. Las diferencias en los resultados se pueden atribuir parcialmente al pH de las muestras estudiadas que iba desde 4 hasta 11 (figuras de la 15 a la 20, cuadros 5 y 6).

MUESTRA EN SACARASA

Fig. 15 Texcoco

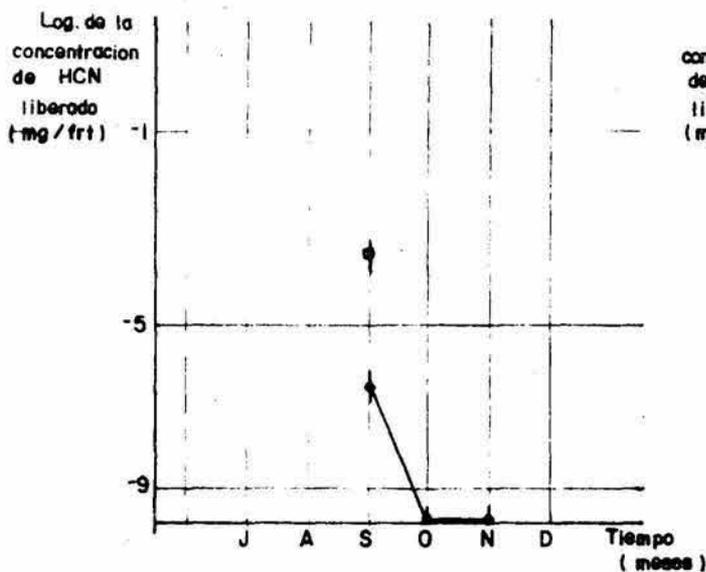


Fig. 16 Chalco

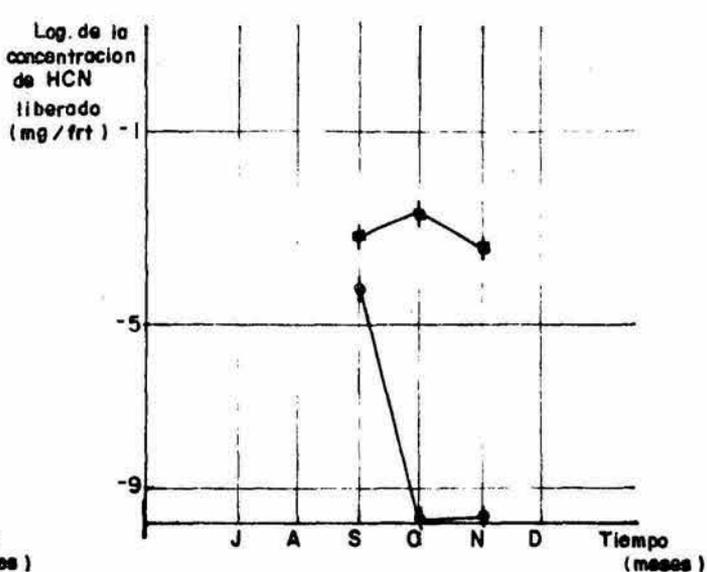


Fig. 17 Tlalmanalco

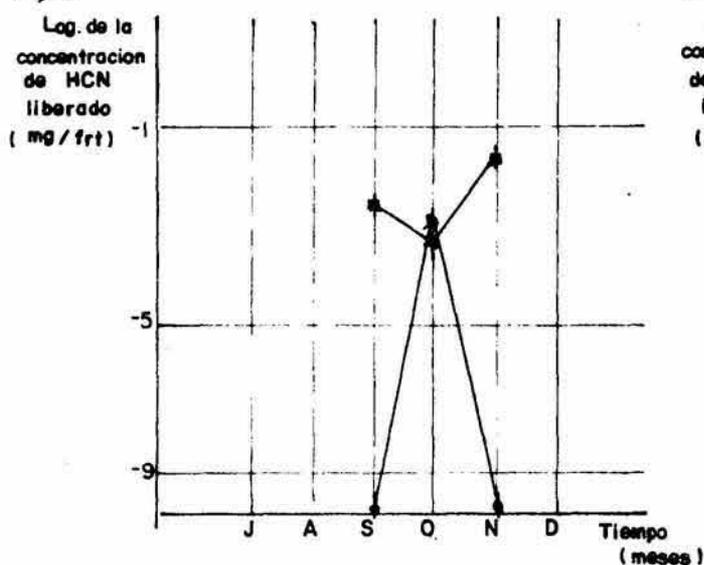


Fig. 18 Vista Hermosa

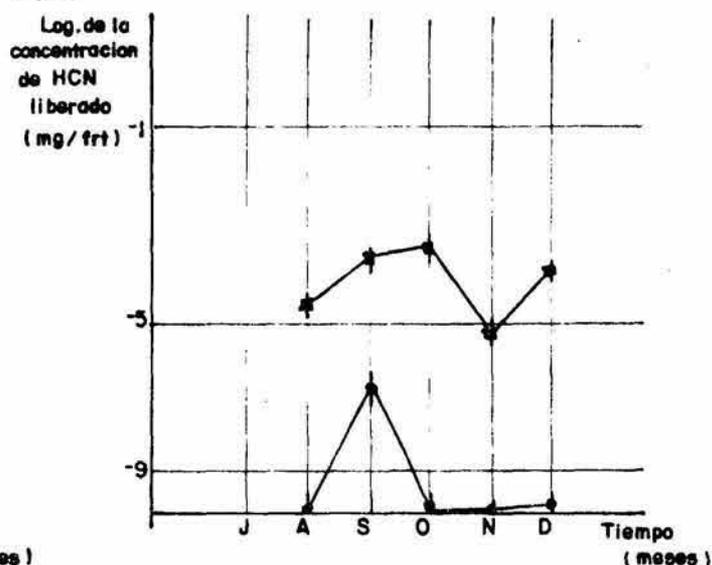


Fig. 19 E.N.E.P.I

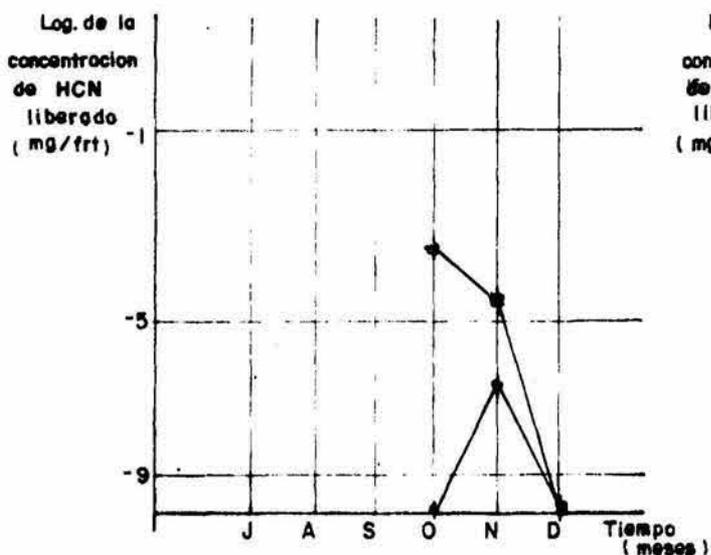
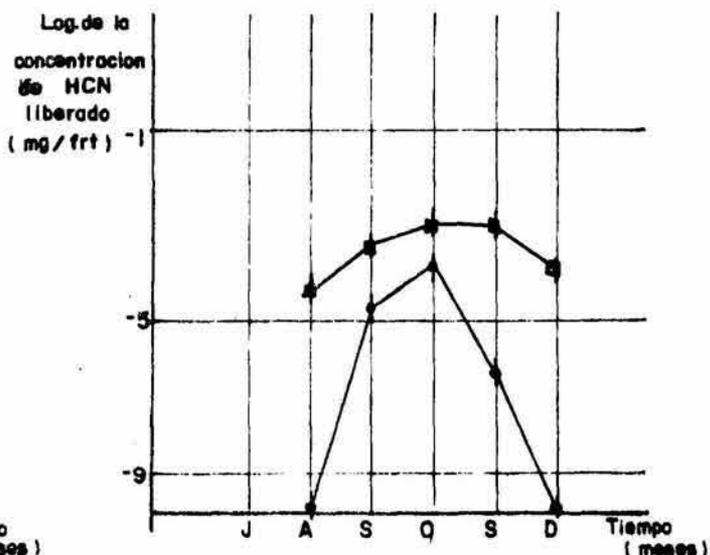


Fig. 20 Localidades



Relacion entre la concentración de HCN liberado (mg/frt) a través de los meses (Tiempo) y el estado de maduración del fruto.

□ Fruto maduro
○ Fruto Inmaduro

± error estándar promedio 10 arbusto.

6.1.3 Comparación entre los 3 tratamientos

Al gráfícarse la concentración promedio de ácido cianhídrico bajo la influencia de los 3 tratamientos (agua, saliva y sacarasa) contra los meses (tiempo), se observó en los tres un comportamiento similar. En el mes de Octubre se obtuvieron las concentraciones más altas para las muestras en agua, seguidas por las muestras en saliva. El tratamiento con sacarasa, en promedio, mostro bajas concentraciones de HCN. En los tres tratamientos se observó una tendencia a disminuir la concentración en Diciembre (Fig. 21, cuadros 7 y 8).

Del mismo modo se graficaron las concentraciones de HCN para los tres tratamientos en las 5 localidades, observándose que los arbustos presentes en Tlalmanalco obtuvieron las concentraciones más altas en los 3 tratamientos. En 4 de las 5 localidades, las muestras que se trabajaron con saliva tuvieron las concentraciones más elevadas de HCN liberado; la excepción fué E.N.E.P Iztacala donde la concentración más elevada se obtuvo al macerar las muestras con agua. En general, las concentraciones más bajas se obtuvieron en muestras tratadas con sacarasa (Fig. 22, cuadros 7 y 8).

Al graficar las concentraciones de HCN liberado (mg/frt) contra el tiempo (meses), se observó que de Julio a Octubre los frutos maduros de Pyracantha koidzumii Rehd. incrementan la concentración de ácido cianhídrico liberado, para luego decrecer ligeramente en Noviembre y continuar descendiendo en Diciembre. Los frutos inmaduros tuvieron un comportamiento fluctuante alcanzando en el mes de Agosto el nivel más alto de HCN liberado y disminuyendo consi-

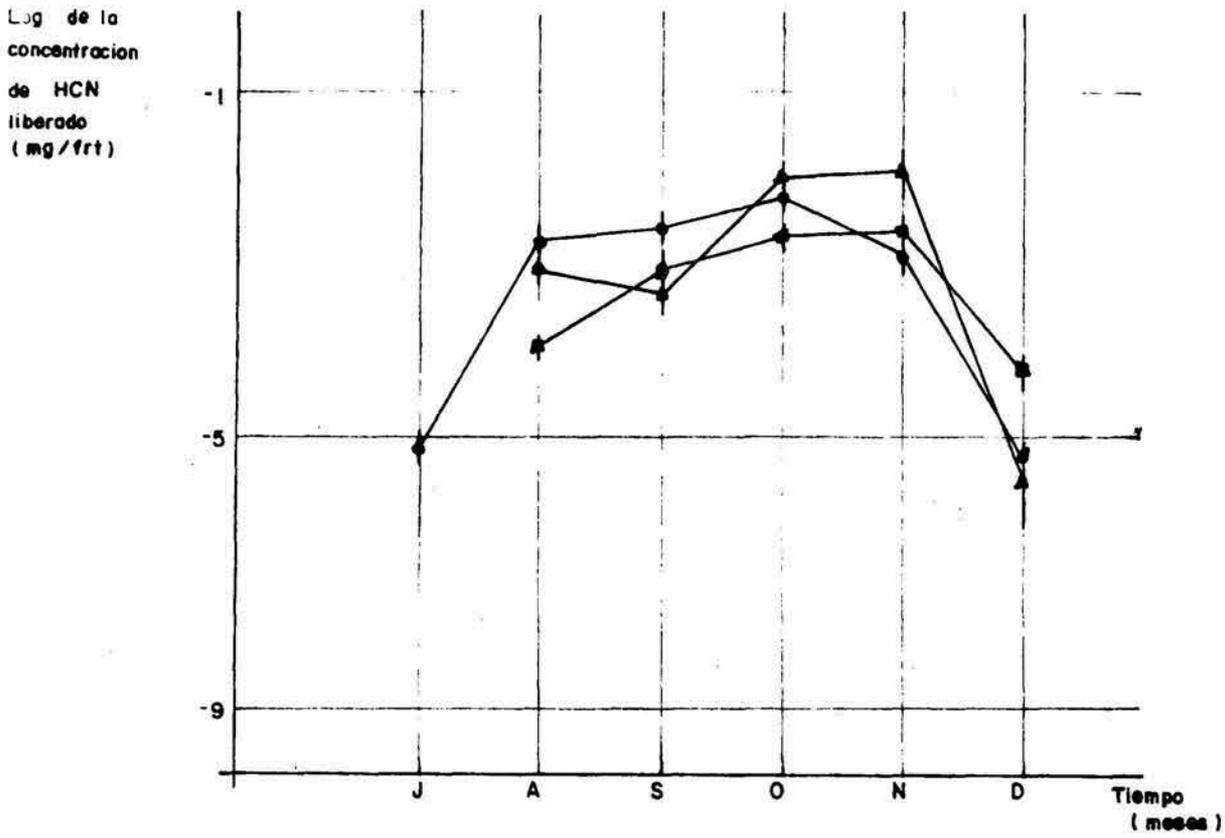
derablemente en Diciembre (Fig. 23, cuadros 5 y 6).

Al graficar las concentraciones de ácido cianhídrico liberado tanto en frutos maduros como en inmaduros en las diferentes localidades se encontro que, Tlalmanalco tuvo los arbustos con mayor capacidad de liberar HCN en concentraciones elevadas (Fig. 24, cuadros 5 y 6).

Los resultados que arrojaron diferencias estadística mente significativas ($P > .01$) fueron las comparaciones entre frutos maduros e inmaduros de Pyracantha koidzumii Rehd. con respecto a las concentraciones de HCN liberado, independientemente de la localidad y el tiempo (meses). Apéndice 9.3.

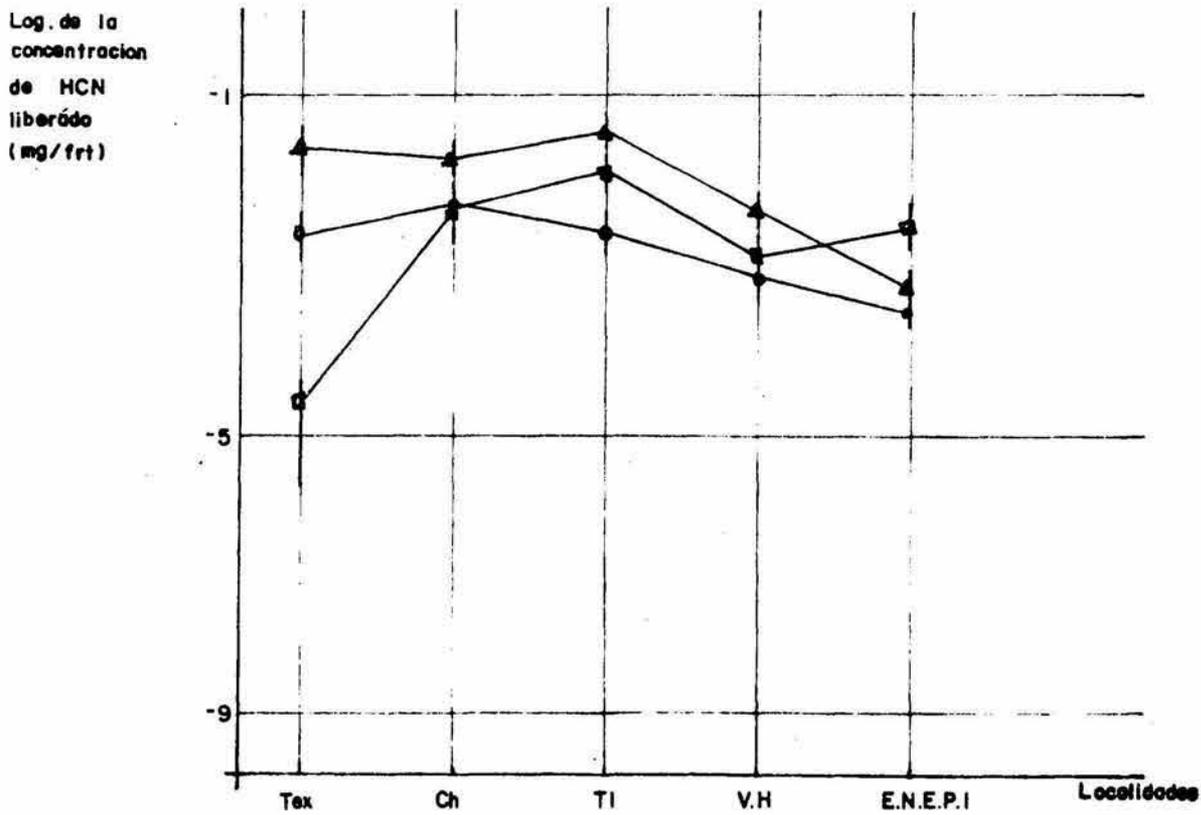
No cabe duda de que el contenido de glucósidos cianogénicos varia dentro de la misma población de P. koidzumii Rehd. y que debemos poner especial cuidado al interpretar los análisis químicos cuantitativos, ya que están basados en muestras de sólo unas pocas plantas.

Fig. 21 Tiempo



Comparación de los tres tratamientos y los cambios sufridos en la concentración promedio de HCN (mg/frt)

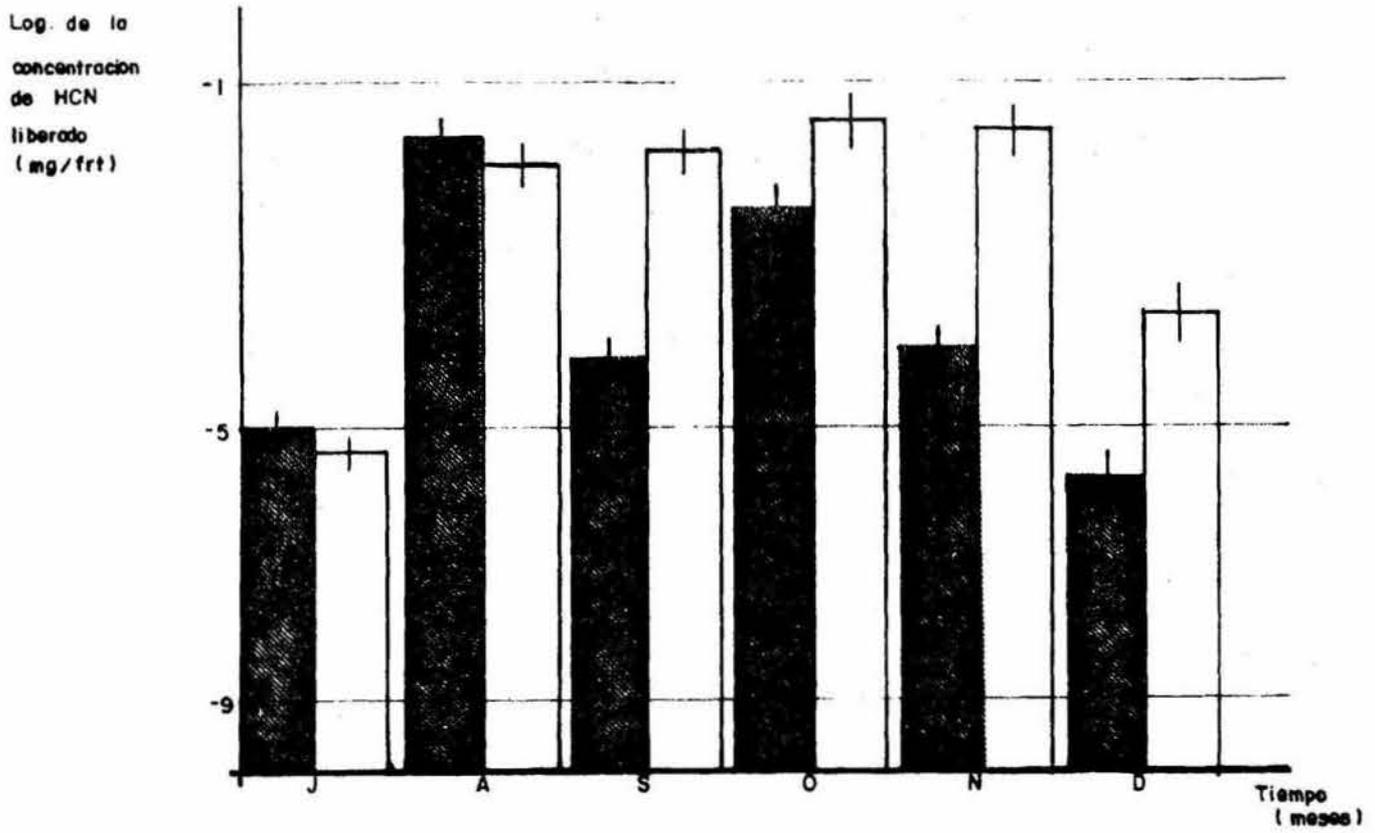
Fig. 22 Localidades



± error estándar

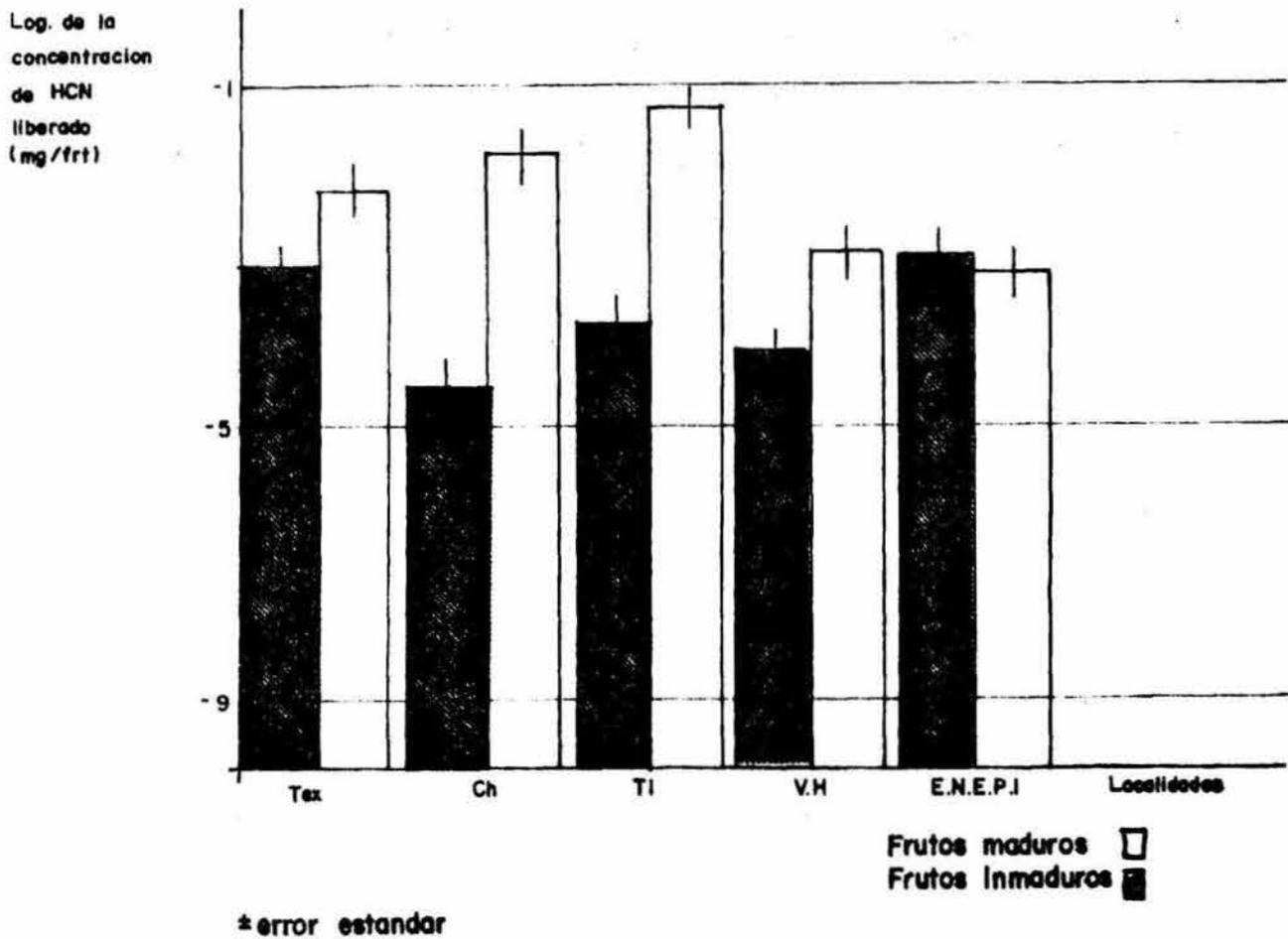
○ Agua.
 △ Saliva.
 ◻ Sacarosa.

Fig. 23 Tiempo



Concentración de HCN liberado (mg/frt) por los frutos maduros e inmaduros.

Fig. 24 Localidades



Cuadro 7.- Concentración de HCN liberado (mg/frt) independientemente del estadio de maduración del fruto y la localidad a través de los meses, \pm error estandar

Tiempo (meses)	TRATAMIENTOS		
	Agua	Saliva	Sacarosa
	Concentración de HCN (mg/frt) $\times 10^{-6}$		
Julio	8.3 \pm 4.6		
Agosto	2700 \pm 1316	720 \pm 462	41 \pm 22
Septiembre	3830 \pm 1430	700 \pm 231	750 \pm 266
Octubre	13100 \pm 8320	20000 \pm 14415	2640 \pm 1315
Noviembre	2260 \pm 1452	20000 \pm 16693	3130 \pm 2249
Diciembre	6.0 \pm 3.9	4.2 \pm 4.1	87 \pm 59

Cuadro 8.-

localidades	TRATAMIENTOS		
	Agua ⁺	Saliva ⁺	Sacarasa ⁺
Texcoco	2740 \pm 1823	24300 \pm 2302	35 \pm 34
Chalco	5100 \pm 1919	18400 \pm 14896	4670 \pm 2624
Tlalmanalco	15900 \pm 10130	33700 \pm 21750	4530 \pm 2663
Vista Hermosa	514 \pm 170	1248 \pm 755	367 \pm 161
E.N.E.P.I	2280 \pm 1294	315 \pm 253	57 \pm 37

+ Concentración de HCN liberado (mg/frt) $\times 10^{-6}$, independientemente del estadio de maduración del fruto y los meses (tiempo), para cada localidad, \pm error estandar.

7.1 Variación en la concentración de ácido cianhídrico en los frutos maduros e inmaduros de Pyracantha koidzumii Rehd. durante el periodo Julio-Diciembre de 1985.

La investigación se desarrolló de Julio a Diciembre, temporada en que se encontraron tanto frutos inmaduros como maduros en los arbustos. Durante ese tiempo se observó una amplia fluctuación en la concentración de HCN liberado: desde aproximadamente 1×10^{-7} hasta 1 mg/frt. Variaciones semejantes han sido reportadas con anterioridad para otras especies (Seigler (38), Sprainaitis (45)).

Se encontró que en el mes de Octubre (segundo periodo de floración), los frutos maduros liberaron HCN en concentraciones altas, de hecho, las más elevadas que se encontraron durante el estudio (Fig. 22). Esta elevada concentración puede estar relacionada con los estadios de maduración y el almacenamiento de nutrientes, lo que menciona Seigler (37) para el castaño de Indias mexicano (Ungnadia speciosa), algunas semillas de leguminosas, algunas especies de Sorghum y para un arbusto del chaparral de California Heteromeles arbutifolia. En el piracanto se dificulta el seguimiento del almacenamiento y consumo de glucósidos en función del estadio de maduración porque durante los periodos de floración se encuentran también frutos maduros e inmaduros, no pudiéndose determinar la "edad" de los frutos colectados, haciéndose el muestreo al azar.

Las concentraciones más altas se encontraron en Octubre y Noviembre (frutos maduros) y Agosto (frutos inmaduros), a lo que siguió un descenso brusco que en muchos arbustos llegó a niveles no detectables en Diciembre. La disminución de

este producto tóxico en los meses fríos del año se puede atribuir a que en la época invernal los arbustos no requieren de defensas contra predadores o competidores, como ha sido sugerido por Jones (19,33).

7.1.1 Variación en la concentración de HCN en los frutos de piracanto dependiendo del estadio de maduración.

En todas las determinaciones con excepción de 2 (el mes de Agosto en Texcoco y E.N.E.P Iztacala) la concentración de cianuros encontrada en frutos maduros fué mayor que en los inmaduros.

Si los cianógenos son fuente de nutrientes (carbón y nitrógeno) las semillas de los frutos maduros deben contener un alto porcentaje de cianógenos como elementos de reserva para la germinación, no siendo necesario en los frutos inmaduros. En este sentido se hizo un experimento que nos indico la localización preferente de los glucósidos, siendo éste el interior de las semillas de los frutos maduros.

7.1.2 Variaciones en la concentración de HCN en los frutos de Pyracantha koidzumii Rehd. colectados en las 5 localidades.

Durante el desarrollo del trabajo, se observaron diferencias entre las localidades: Los arbustos localizados en Tlalmanalco mostraron una concentración de HCN mayor y constante con respecto a las otras localidades estudiadas.

Las características notables de esta localidad son la permanencia constante de gran cantidad de frutos, tanto inmaduros como maduros en todos los arbustos, y de mayor talla con una coloración roja más brillante; lo que nos permite suponer, o bien, un mecanismo de defensa dada la vistosidad de sus frutos, o una mayor reserva energética dado el tamaño (tiempo de maduración) de los frutos.

7.1.3 Variación del HCN liberado por los frutos de piracanto en función de los factores hidrolíticos.

Los frutos contienen tanto el glucósido como la enzima que lo hidroliza, existiendo otras enzimas que también pueden hidrolizar ese glucósido, entre ellas alguna(s) de la saliva humana.

Un factor que podría estar afectando esta hidrólisis sería el pH durante el proceso de maceración, ya que se encontró que variaba desde 4 hasta 11 en los frutos colectados.

No se hicieron experimentos de normalización a un pH determinado, pues nuestro interés era estudiar la cantidad de HCN que podría liberarse al ingerir los frutos tal como se encuentran en los arbustos.

7.1.4 Variaciones en la concentración de HCN no atribuibles a: estación del año, estado de maduración del fruto o localidad.

Encontramos diferencias individuales con respecto a las concentraciones de ácido cianhídrico liberado entre los arbustos en todas las localidades, pero se optó por trabajar con promedios ya que no en todos los muestreos se encontró una cantidad suficiente de frutos inmaduros y/o maduros en cada uno de los arbustos seleccionados inicialmente. Por ejemplo: El número total de arbustos que deberían muestrearse en cada localidad era de 10 pero, en Chalco y Vista Hermosa, después de varias colectas 1 o 2 de los arbustos marcados se secaron por causas naturales o artificiales. Otra de las causas se debió a que no todos los arbustos presentaron al mismo tiempo frutos maduros e inmaduros. Algunos arbustos tuvieron frutos inmaduros y otros sólo maduros.

En el caso de Texcoco, del número total de arbustos presentes en esa localidad (960 arbustos) sólo 10 de ellos tuvieron frutos inmaduros durante el período de colecta y de los cuales sólo 2 o 3 tuvieron en Septiembre frutos maduros.

Como se ha podido observar el estudio de la especie Pyraecantha koidzumii Rehd. apenas ha dado comienzo, por lo que varias preguntas han quedado sin respuesta y podrían ser tema para futuras investigaciones.

Nosotros podemos mencionar las siguientes:

Que factor (climático-tipo de suelo-prácticas y frecuencia de la poda, etc.) determina la variación individual en la concentración de HCN liberado.

Si la variación en el pH de las muestras maceradas, influye significativamente en la enzima (endógena y exógena) hidrolítica que actúa sobre el glucósido.

Aislamiento, purificación y caracterización del tipo de glucósido cianogénico y la enzima que lo hidroliza.

Determinar cual(es) enzima(s) contenida(s) en la saliva contribuye(n) a la hidrólisis del glucósido existente en los frutos de P. koidzumii Rehd.

Tratar de encontrar la dosis mínima letal(D.M.L) del glucósido.

Investigar cuales son los predadores o competidores del arbuto y si su población y acción afectan el contenido de glucósidos cianogénicos.

Hacer una revisión taxonómica exhaustiva del género y especies existentes en el país y principalmente en el Valle de México.

La existencia de glucósidos cianogénicos y de una enzima endógena hidrolítica en Pyracantha koidzumii Rehd. quedó evidenciada por medio de la liberación de ácido cianhídrico al macerar en agua los frutos maduros e inmaduros de este arbusto.

Se encontraron diferencias individuales entre los arbustos de P. koidzumii Rehd. con respecto a la liberación de ácido cianhídrico.

Las concentraciones de ácido cianhídrico liberado variaron significativamente entre frutos maduros e inmaduros.

Los frutos maduros liberaron más HCN que los inmaduros.

Se observó un comportamiento fluctuante en las concentraciones de ácido cianhídrico liberado tanto en frutos maduros como en inmaduros a través de los meses en que se realizó el estudio, en todas las localidades.

Se encontró una tendencia general en ambos estadios de maduración a disminuir la concentración de HCN liberado en el mes de Diciembre.

Con respecto al factor que provoca la hidrólisis del glucósido, se encontró:

- a) Que las muestras maceradas en agua liberaron concentraciones de ácido cianhídrico altas.
- b) La adición de saliva provocó en varias de las muestras la liberación de una concentración mayor de HCN que la observada en agua.
- c) La adición de sacarasa no tuvo efectos significativos sobre las muestras estudiadas.

En Tlalmanalco, una de las 5 localidades estudiadas, se encontraron los arbustos de P. koidzumii Rehd. que liberaron las concentraciones más altas de HCN. Todos los arbustos muestreados liberaron ácido cianhídrico tanto en frutos maduros como en inmaduros durante los meses en que se realizó la investigación, pero dos de ellos en particular liberaron concentraciones muy elevadas de éste compuesto.

✖En términos generales, se considera que las concentraciones encontradas de ácido cianhídrico liberado por los frutos maduros e inmaduros de Pyracantha koidzumii Rehd. estudiados son muy bajas y no parecen representar un riesgo para la salud, pero algunos arbustos, sin que se haya establecido la causa, contienen frutos con una concentración tan elevada de cianógenos que al ser ingeridos liberan ácido cianhídrico en concentraciones tóxicas.✚

9.

Apéndices

9.1 Clasificación taxonómica de la especie

Reino	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Pyracantha
Especie	<u>P. koidzumii</u> Rehd.

Sinonimia:

+ <u>Pyracantha koidzumii</u>	Rehd.
<u>Cotoneaster koizumii</u>	Hayata
<u>Cotoneaster formosana</u>	Hayata
<u>Pyracantha kenikira</u>	Hayata

(1,6,12,46)

9.1.1 Descripción de la especie

Pyracantha koidzumii Rehd.

Shrub with grayish-pubescent branchlets which become glabrous: Lvs. clustered at tips of short branchlets oblong-obovate, 1-2 in. long, emarginate and truncate at apex, tapering at base to a short petiole, entire, becoming glabrous, pale and more or less pubescent beneath: fls. white, 1/4 in. or more across, in bracteate glabrous, infl. 1 in. or more across; calyx lightly pubescent, with 5 triangular lobes: fr. red, depressed-globose, about 1/4 in. across (1).

Los ejemplares colectados en los Parques Centrales de Texcoco, Chalco, Tlalmanalco, Vista Hermosa y en los jardines de la E.N.E.P Iztacala fueron depositados en el Herbario de la E.N.E.P.I.

La determinación de la especie esta respaldada por los siguientes ejemplares de Herbario:

México-Col. Sierra Encantada, 30 de abril 1966, Vazquez 794 (MEXU);

Monte Verde Km 55, Carretera Federal, 4 de julio de 1970, Vazquez 2506 (MEXU).

Edo. de México-Chapingo, 25 abril 1981, Ramirez Villapadua 25 (CHAPA).

La especie es originaria de Asia y el Sur de Europa, al ser introducida y cultivada ampliamente en México, su determinación se presta a confusiones; debido a que en las claves existentes para su identificación (1,12) no se manejan todas las características morfo-fisiológicas del arbusto.

Por otra parte, no debe pasarse por alto la posible existencia de algunas variedades de esta especie que aún no han sido reportadas. La ausencia de trabajos taxonómicos sobre éste género dificulta la investigación sobre las especies y su determinación.

Se hicieron las siguientes observaciones en Pyracantha koldzumai Bhd.:

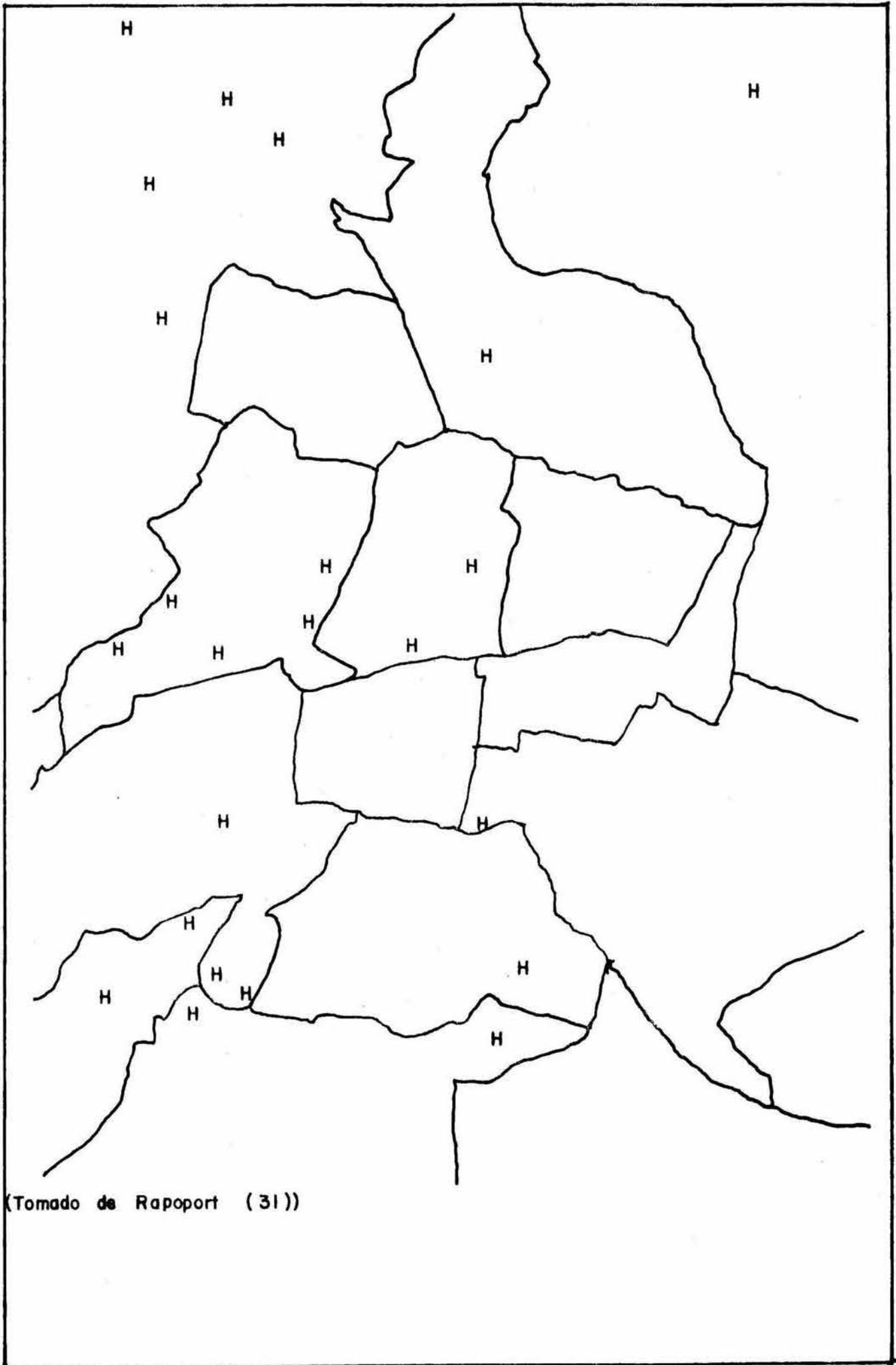
Nombre común.- Piracanto o manzanitas. Arbusto con ramitas que presentan pubescencia grisacea. Hojas agrupadas en pequeñas ramas inclinadas, oblongas de 2.54 a 5 cm de largo, emarginadas y desarrollándose en el ápice en forma truncada. Flores blancas de 63 mm o más de ancho, inflorescencia de 2.54 cm, caliz sub-glabroso, con 5 lobulos triangulares. Frutos rojos deprimido-globosos.

Es un arbusto ornamental propagado por estacas y semillas. Con dos floraciones en el año: Marzo y Octubre. Tallo espinoso, fruto pomo con 3 a 5 semillas. Frutos formados en Marzo y persisten hasta principios de Diciembre.

Este arbusto se localiza en el Noreste, Norte, Noroeste, Este y Oeste de la zona urbana metropolitana (Fig. 25) del Distrito Federal y el Estado de México.

FIGURA 25-

Distribucion de Pyracantha sp. en la zona urbana metropolitana.



Existen muchos métodos tanto cualitativos como cuantitativos para determinar cianuros, entre los que se encuentran: Métodos potenciométricos, polarográficos, cromatográficos y colorimétricos. Para nuestro estudio no consideramos los 3 primeros ya que, requieren de equipo muy específico y no son muy sensibles a bajas concentraciones del ión (16).

Los métodos colorimétricos son variados:

- 1) Basados en la reacción de Nessler.- El ión cianuro se hidroliza y el amoniaco formado se determina con el reactivo de Nessler. Se menciona como poco práctico (16) porque requiere destilar el amoniaco para poder cuantificarlo.
- 2) Basados en la reducción del ión Cu^{++} .- La técnica es poco sensible y poco específica pues la afectan otros iones o compuestos reductores.
- 3) Basados en derivados del ácido barbitúrico en presencia de piridina.- Los derivados formados son muy inestables.
- 4) Basados en la oxidación de la bencidina en presencia de bromo y piridina.- Es poco confiable en concentraciones bajas.

Las técnicas antes mencionadas no fueron ensayadas en el laboratorio. Las que se probaron para nuestras muestras fueron:

- 5) Método basado en la formación de azul de Prusia.- Aunque se le reporta como un técnica muy sensible (útil para concentraciones de 1×10^{-6}) no se pudo utilizar porque en el macerado total existían productos que oscurecían la observación, y cuando se optó por destilar el ácido cianhídrico para determinarlo en el destilado no

se logro reproducibilidad en los resultados, debido en parte, a los volúmenes y concentraciones tan pequeños que se manejaron.

- 6) Técnica de Feigl-Anger.- Se utilizarón tiras reactivas (indicador de bencidina) que en contacto con el ácido cianhídrico viran a una coloración azul. Las tiras reactivas son muy sensibles y son afectadas por substancias presentes en el aire que les producen diferentes cambios de color. Es por ello que aún cuando sí son eficaces fueron substituídas por las de Guignard.
- 7) Técnica de Guignard.- Utiliza tiras reactivas de solución alcalina de ácido pícrico. Este fué el método de elección para nuestro trabajo pues se logro reproducibilidad en los resultados y hacer determinaciones cuantitativas por comparación con una escala patrón.

9.2.1 Técnica de Guignard

Preparación del papel reactivo:

Remojar o sumergir tiras de papel filtro en solución al 1% de ácido pícrico, secar, después introducir las en solución al 10% de Na_2CO_3 y dejar secar. Preservar los papeles en frascos tapados herméticamente.

El papel de picrato sódico, cambia gradualmente de anaranjado a rojo, sí la muestra vegetal contiene glucósidos cianogénicos. La prueba es delicada y un rápido cambio de color depende de la cantidad de ácido cianhídrico libre, presente en la muestra.

La prueba puede realizarse con material de plantas frescas, pero en caso de substancias relativamente secas, particularmente semillas, el material puede triturarse y humedecer

se con agua, efectuándose la hidrólisis en tubos tapados herméticamente.

Escala patrón:

Se prepararon soluciones acuosas de concentración conocida del ión CN^- . Una alícuota de 2 ml de cada solución se colocó en un pequeño vial y se dejó durante 24 horas a temperatura ambiente en presencia de una tira reactiva, obteniéndose los resultados siguientes:

Coloración	Concentración (mg/ml)
Rojo obscuro +++	1
Rojo obscuro +	0.1
Rosa obscuro	0.01
Rosa pálido	0.001
Naranja obscuro	0.0001
Naranja pálido	0.00001
Anaranjado ++	0.000001
Anaranjado +	0.0000001

COMPARACION GLOBAL ENTRE FRUTOS MADUROS E INMADURAS PARA CADA

TRATAMIENTO

AGUA		SALIVA		Sacarasa	
F.I.	F.M.	F.I.	F.M.	F.I.	F.M.
$171 \times 10^7 = 0$	$78 \times 10^7 = 0$	$117 \times 10^7 = 0$	$56 \times 10^7 = 0$	$141 \times 10^7 = 0$	$62 \times 10^7 = 0$
46×10^6	12×10^6	20×10^6	7×10^6	3×10^6	10×10^6
23×10^5	55×10^5	24×10^5	35×10^5		16×10^5
14×10^4	26×10^4	11×10^4	28×10^4		12×10^4
6×10^3	33×10^3	5×10^3	27×10^3	2×10^3	21×10^3
2×10^2	25×10^2	1×10^2	14×10^2	1×10^2	10×10^2
2×10^1	11×10^1		5×10^1		4×10^1
	2		3		

Muestras maceradas en Agua

A N O V A

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F _e	.05 F _e	.01 F _e
Entre	3.6×10^{-3}	1	3.6×10^{-3}	3.3	3.84	6.04
Dentro	1.1234	502	1.1×10^{-3}			
Total	1.1229	504				

Muestras maceradas en Saliva

A N O V A

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F _e	.05 F _e	.01 F _e
Entre	0.0382	1	0.0382	8.88	3.86	6.78
Dentro	2.9746	348	4.3×10^{-3}			
Total	3.0126	349				

Muestras maceradas con Sacarasa

A N O V A

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F _e	.05 F _e	.01 F _e
Entre	1×10^{-3}	1	1×10^{-3}	14.48	3.89	6.76
Dentro	0.0391	280	7×10^{-5}			
Total	0.0401	282				

- 1.- Bailey, L. (1949). Manual of Cultivated Plants. Ed. The Mac-Millan Company. New York. pp. 493-547
- 2.- Bannister, P. (1976). Introduction Physiological Plant Ecology. Ed. Blackwell Scientific Publications. Great Britain. pp. 214-217
- 3.- Barker, R. (1971). Organic chemistry of biological compounds. Ed. Prentice-Hall, Inc. U.S.A. pp. 344
- 4.- Bidwell, L. (1979). Fisiología Vegetal. Ed. AGT. pp.140-146
- 5.- Butler, G. y R. Bailey. (1973). Chemistry and Biochemistry of Herbage. Vol. 11 Ed. Academic Press. London pp. 394
- 6.* Cronquist. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York Botanical Garden pp.573-77
- 7.- Davies, D.; J. Giovanelly y T. Ap Rees. (1964). Plant Biochemistry Vol. 111 Ed. Blackwell Scientific Publications Great Britain pp. 189-191, 210-211.
- 8.- Department of Defenses. (1963). Military Standard Sampling procedures and tables for inspection by attributes. U.S.A. pp. 1-15
- 9.- Durbin, R. (1981). Toxins in plant disease. Ed. Durbin Academic Press. U.S.A. pp. 365
- 10.- Feigl, F. y V. Anger. (1966). Replacement of Benzidine by Copper Ethylacetoacetate and Tetra Base as Spot-test Reagent for Hydrogen Cyanide and Cyanogen. Analyst 91:282-84
- 11.- Fréjaville, J. y R. Bourdon. (1978). Toxicología clínica y analítica. Ed. Jims Barcelona - pp. 534-37

- 12.- Graff, A. (1970). *Exotic Plant Manual*. Ed. Hoechst. Co. New Jersey. pp. 513,691
- 13.- Hass, A. (1985). *Juguete de Muerte*. *Excelsior Dic.* 4 pp.51
- 14.- Harbone, L.E. (1980). *Phytochemical Method. A guide to modern techniques of plant analysis*. Ed. Science Paperback England. pp. 192-195
- 15.- Holum, J.R. (1978). *Organic and Biological Chemistry*. Ed. John Wiley and Sons. U.S.A. Pp. 323
- 16.- Hulme, A.C. (1981). *The Biochemistry of fruits and their products*. Ed. Academic Press. Great Britain pp.11,25,276
- 17.- Jallageas, J.C., et. al. (1984). *Development of an Assay Method for Cyanide, α -Aminonitriles and α -Hidroxy nitriles for the Study of the Biological Hydrolysis of these Compounds*. Analyst 109:1439-1442
- 18.- Janzen, D.H.; S.T. Doerner y E.E. Conn. (1980). *Seasonal constancy of intra-population variation of HCN content of Costa Rican Acacia farnesiana foliage*. Phytochemistry 19:2022
- 19.* Jones, D.A. (1979). *Chemical defense: Primary or secondary function?* Am. Nat. 113(3):445-451
- 20.- Juscafresa, B. (1978). *Arboles frutales, cultivo y explotación comercial*. 6ta. ed. Ed. AEDOS pp.199-265
- 21.- Kopatschek, F. (1942). *Manual de Laboratorio Químico* Ed. Aniseto López. Buenos Aires. pp. 45-49
- 22.- Lehninger. (1978). *Bioquímica*. Ed. Omega España pp.390
- 23.- *Mathematics and Plant Physiology - Experimental Botany An International Series of Monographs (1981)* Ed. Academic Press. London. pp. 91-309

- 24.- Murray, R. y Spiegel. (1982). Manual de fórmulas y tablas matemáticas. Ed. Mc.Graw-Hill pp.260-261
- 25.- Murray, R. y Spiegel. (1982). Probabilidad y Estadística Ed. McGraw-Hill. México. pp. 348-49
- 26.- Nahrstedt, A. (1980). Absence to Cyanogenesis from Droseraceae. Phytochemistry 19(12):2757
- 27.- Nahrstedt, A. y S. Limmer. (1982). Dhurrin, the cyanogenic glucoside of Cercocarpus ledifolius. Phytochemistry 21(11):2738-2740
- 28.- Nahrstedt, A.; A. Walther y V. Wray. (1982). Sarmentosin Epoxide, a new cyanogenic compound from Sedum cepaea Phytochemistry 21(1):107
- 29.- Official and tentative methods of analysis of the association of official agricultural chemicals. (1940). Ed. Board W.W. a Kinner, Charmain. Washington D.C. pp. 47-56
- 30.- Praxis Medica XL. Dermatología-Intoxicaciones pp. 5
- 31.- Rapoport, E.H. (1983). Aspectos de la Ecología Urbana en la Ciudad de México. Flora de la calles y baldíos. Ed. Limusa pp. 146,181
- 32.- Rengade. (1887). Las plantas que curan y plantas que matan I.N.A.H. pp. 45-90
- 33.- Rosenthal, G. (1986). The Chemical Defenses of Higher Plants Sci. Am. 254(1):76-81
- 34.- Rzedowsky, J.; et. al. (1979). La Flora Fanerogámica del Valle de México. C.E.C.S.A. México pp. 257-276

- 35.- Sabalitschka, T. (1926). Análisis químico-toxicológico-farmacéutico, médico y químico. Ed. Labor S.A. Barcelona pp. 25, 35-36.
- 36.- Sánchez-Sánchez. (1980). La Flora del Valle de México Ed. Herrero México. pp. 191-197
- 37.- Seigler, D. y P.W. Price. (1976). Secondary compounds in plants: Primary functions. Am. Nat. 110(971):101-105
- 38.- Seigler, D.; et.al. (1979). Cyanogenesis in Acacia farne-
siana Phytochemistry 18:1389-1390
- 39.* Seigler, D.; et. al. (1982). Tetraphyllin B and Epitetraphyllin B sulphates: Novel cyanogenic glucosides from Passiflora caeruleae and P. alato-caeruleae Phytochemistry 21(9):2277-2285
- 40.- Sin Mejoría el hijo de Flavio (1984). La Prensa Junio 4 pp. 42
- 41.- Sokal, R. y J. Rohlf. (1969). Biometry . Ed. W.H. Freeman San Francisco pp: 545
- 42.- SP. (1970). Carta de Climas. Escala 1:5000000 14Q-UI
- 43.- SPP. (1982). Carta edafológica. Escala 1:50000 E-14/A-29
- 44.- SPP. (1983). Carta edafológica. Escala 1:250000 E 14-2
- 45.- Sprainaitis, A. y A. Kyarshulis. (1985). The content of cyanogenic glycosides in some species of the genus Trifolium Bio. Abstr. 80(2):AB-3

- 46.- Takhtajan, A.L. (1980). Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). The Botanical Review 46(3):225-359
- 47.- The biochemistry of fruits and their products. (1970). Vol. 1 Ed. A.C. Hume. Great Britain pp. 11, 25, 276,280.
- 48.- Tosco, U. (1971). Atlas de Botanica. Ed. Teide S.A. Barcelona pp. 190
- 49.- Trumper, M. (1979). Memoranda of toxicology. Ed. P. Blakiston S. Aon and Co. Inc. New York pp. 178-183
- 50.- Vick, J. y H. Froehlick. (1985). Studies of cyanid poisoning Arch. int. Pharmacodyn 273:314-322
- 51.- Westwood, N. (1982). Fruticultura de zonas Templadas. Ediciones Mundi-Prensa Madrid pp. 71-77