

5B
211
C3
C81
1979
C.2

Ensayo enzimático para determinar el contenido de cianuro en las raíces y en los productos derivados de la yuca

R.D. Cooke



6 NOV. 1979

Editado por:

Trudy Brekelbaum
Guillermo Gómez

Centro de Información sobre Yuca
Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT
Apartado Aéreo 67-13, Cali, Colombia. S.A.

SERVICIOS REFERENCIALES Y BIBLIOTECARIOS

ENSAYO ENZIMATICO PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE CIANURO EN LAS RAICES Y EN LOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LA YUCA

R.D. Cooke*

Resumen

Se presenta una nueva metodología para la preparación y análisis de linamarasa y su utilización para determinar los contenidos de cianuro total y libre en la yuca. El análisis enzimático es reproducible, más rápido y más sensible que los métodos cuantitativos anteriores. El método para purificar la linamarasa a partir de la cáscara de yuca le permite a un técnico preparar en dos días suficiente enzima para 5.000 determinaciones. También se describe la preparación de extractos a partir del tejido parenquimatoso, la cáscara o las hojas; un técnico puede procesar fácilmente 40 muestras por día. Los glucósidos cianogénicos se hidrolizan por medio de una incubación corta con la enzima purificada, y el cianuro liberado se mide colorimétricamente. El límite de detección del cianuro es $<0,01$ mg/100 g de peso fresco de la raíz pelada. Los productos químicos y las soluciones que se requieren y cálculos representativos de los contenidos de cianuro se presentan en el Apéndice.

I. Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) no es tan sólo una fuente importante de calorías para más de 200 millones de personas, sino que su uso como componente de alimentos para animales va en aumento (8). Sin embargo, la toxicidad crónica y aguda en humanos y animales ocasionada por su consumo permanente limita su empleo en la alimentación. La yuca contiene los glucósidos cianogénicos linamarina y lotaustralina que producen ácido cianhídrico cuando se activa la enzima endógena linamarasa al destruirse la estructura celular de las raíces (1).

Aunque la toxicidad del cianuro libre (no glucosídico) se ha establecido claramente, el grado de toxicidad de los glucósidos cianogénicos es

* Dirección permanente, Tropical Products Institute, 56-62 Gray's Inn Road, London, WC1X 8LU; dirección actual, Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos (CITA), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

incierto (7). Definir la magnitud de este problema no es tan sencillo, debido a las dificultades de los métodos usuales para la determinación cuantitativa del cianuro. Estos métodos son tediosos, irreproducibles e inexactos (9), ya que utilizan prolongadas hidrólisis químicas o autólisis de los glucósidos, seguidas por destilación o aspiración del cianuro liberado.

Recientemente se ha desarrollado un ensayo o análisis enzimático para la determinación del contenido de cianuro en la yuca (2,4), que elimina la necesidad de la destilación o aspiración por vapor. Este ensayo es reproducible, más rápido y más sensible que los métodos cuantitativos anteriores. La muestra de yuca se extrae en ácido lo cual inactiva la linamarasa endógena, permitiendo así la medición de la proporción del cianuro en la muestra que se presenta tanto como glucósido cianogénico, como cianuro libre. El ensayo se puede aplicar al tejido parenquimatoso (raíz pelada), a la cáscara y a las hojas de yuca, así como a los productos derivados de ella, por cuanto se basa en la enzima exógena purificada a diferencia de los métodos autolíticos. El límite de detección de cianuro es $<0,01$ mg/100 g de peso fresco de la raíz pelada. Un técnico puede procesar fácilmente 40 muestras por día empleando los métodos que se describe en forma detallada en la Sección II.

El método para purificar la linamarasa de la cáscara de yuca es sencillo y permite a un técnico purificar suficiente enzima a partir de 500 g de cáscara en un período de dos días, como para efectuar unas 5.000 determinaciones. Los glucósidos cianogénicos que se encuentran en los extractos se hidrolizan por medio de una incubación corta (15 min) con esta enzima purificada, y el cianuro libre producido se mide colorimétricamente.

Las distintas respuestas del glucósido cianogénico y el cianuro libre al procesamiento sencillo se investigaron mediante un estudio preliminar utilizando esta nueva metodología (3). Este ensayo también se ha aplicado a un estudio preliminar de un programa de fitomejoramiento de la yuca para producir líneas con bajos contenidos de cianuro (5).

II. Procedimientos experimentales

A. Preparación de la linamarasa a partir de la cáscara de yuca

La cáscara de yuca (200 g) se corta en trozos (0,2 x 0,5 cm) y se homogeniza en una licuadora Waring durante 3 min a velocidad máxima en acetato 0,1 M, con un pH de 5,5. (La operación se efectúa en 8 tandas de 25 g de cáscara cada una, en 200 ml de acetato). El homogenizado se centrifuga a 10.000 g durante 30 min, y los sobrenadantes (ca. 1.600 ml) se saturan hasta un 60% con sulfato de amonio y se mantienen a 4°C durante 16 horas (de un día para otro). El precipitado que se obtuvo mediante la centrifugación a 10.000 g durante 1 hora se disuelve en 150 ml de fosfato 0,1 M, pH 6,0, y se dializa (3 x 50 vol) contra la misma solución tampón. Para mayor comodidad la solución se debería almacenar en porciones de 20 ml a -18°C; después de 2 meses de almacenamiento, la solución pierde ca. 10% de su actividad.

B. Determinación de la actividad de la linamarasa

La actividad de la solución de linamarasa se debe determinar antes de usarla en los análisis de cianuro. Alícuotas (0,1 ml) de la enzima se agregan a tubos que contienen linamarina 5 mM (0,5 ml). Los tubos se incuban a 30°C durante 30 min; la reacción se detiene añadiendo 0,6 ml de NaOH 0,2 M. La cantidad de cianuro presente en cada tubo se determina en un espectrofotómetro utilizando el siguiente método: se añaden 2,8 ml de fosfato 0,1 M, pH 6,0 a cada tubo y luego se agrega 0,2 ml de cloramina-T. Después de agitar los tubos, éstos se colocan en agua con hielo por aproximadamente 5 min. Luego se añade 0,8 ml del reactivo pirazolona/piridina a cada tubo y se agitan nuevamente para que éste quede bien mezclado. El color azul que se desarrolla después de un periodo de almacenamiento de 90 min a temperatura ambiente se mide a 620 nm; esta absorbencia no cambia (<5%) entre 60 y 120 min después de la adición del reactivo de color. Tampoco cambia la absorbencia final con un tiempo de incubación entre 3 y 15 min con cloramina-T.

La velocidad de liberación del HCN en el rango de 0 a 1,2 $A_{620}/30$ min es proporcional a la cantidad de enzima añadida. El cianuro de potasio secado sobre H_2SO_4 concentrado se utiliza para calibrar los valores de absorbencia; por lo general 2,5 μ g de KCN en un volumen final de 5 ml dan una absorbencia de

aproximadamente $0,84 A_{620}$ (i.e. $1 \mu\text{Mol}$ produce $21,8 A_{620}$). La absorbencia medida se utiliza para calcular la actividad de la solución enzimática en unidades/ml; una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce un μMol de HCN/min a 30°C .

Cuando la enzima se ha preparado de la manera descrita anteriormente y se ha diluido 600 veces con tampón de fosfato, generalmente da una absorbencia de casi 1,0 (es decir cerca de 9 unidades de actividad/ml de la solución enzimática sin diluir), dependiendo, por supuesto, de la edad, la condición y la variedad de yuca utilizada. La actividad de la enzima requerida para hidrolizar totalmente los glucósidos cianogénicos presentes en los extractos (en el sistema que se describe en la Sección C) es 0,3 unidades o sea 0,1 ml de dicha solución enzimática diluida tres veces.

C. Preparación de los extractos de yuca para analizar el contenido de cianuro

En una licuadora Waring se homogenizan trozos de 1 cm^3 de tejido parenquimatoso (30 a 100 g) a temperatura ambiente durante 15 segundos a velocidad baja en 160 ml de ácido ortofosfórico 0,1 M, seguido por 2 homogenizaciones de 1 min cada una (a intervalos de 1 min) a velocidad alta. Este procedimiento minimiza el desgaste y el recalentamiento del motor de la licuadora. Para analizar la cáscara se utilizan 2-10 g cortados en trozos de 0,5 cm, y para las hojas 1-4 g y éstas pueden estar enteras o cortadas.

El líquido resultante se filtra a través de papel de filtro GF/A (fibra de vidrio, diámetro 15 cm)* utilizando un embudo tipo Buchner. El vaso del homogenizador se enjuaga con ácido ortofosfórico 0,1 M (60 ml), que se filtra de la misma manera. Después de medir el volumen final del filtrado se transvasa a una botella con tapa de rosca, utilizando 10 ml de agua destilada para enjuagar el recipiente del filtrado. Estos extractos se deben

* Whatman's Ltd., Maidstone, Kent ME 14 2 LE, UK.

almacenar a 4°C, temperatura a la cual permanecen estables por lo menos durante 4 días.

La etapa de filtración con fibra de vidrio (GF/A) se puede sustituir por centrifugación de los extractos a 10.000 g por 30 min, pero por lo general la filtración es más rápida. La centrifugación se recomienda para productos derivados de raíces hervidas, ya que el almidón gelatinizado retarda el proceso de filtración.

D. Determinación del cianuro total y libre en los extractos de yuca

Se añaden 4 alícuotas (0,1 ml) de los extractos mencionados anteriormente (diluidos si es necesario con ácido ortofosfórico 0,1 M) a 4 tubos de ensayo (con tapa de vidrio) que contienen 0,4 ml de solución tampón fosfato 0,2 M, ajustada a un pH de 7,0 con NaOH 5 M. Se agrega una alícuota (0,1 ml) para producir una actividad de por lo menos 0,3 unidades, según se describió en la Sección IIB) de linamarasa a dos de los cuatro tubos para determinar el cianuro total, y 0,1 ml de fosfato 0,1 M, pH 6,0 a los otros dos tubos para determinar el cianuro libre.

Los tubos se incuban a 30°C durante 15 min; la reacción se detiene con la adición de NaOH 0,2 M (0,6 ml). El contenido de cianuro de cada tubo se determina utilizando el método modificado cloramina-T más pirazolona/piridina, descrito en la Sección IIB. Los contenidos de cianuro libre y total de las muestras de yuca se calculan a partir del peso de la muestra y el volumen del extracto obtenido. (El Apéndice II da un cálculo representativo).

El contenido de cianuro libre en yuca fresca es por lo general $\leq 10\%$ del contenido del cianuro total. Por lo tanto, a fin de obtener un resultado más exacto se utilizan alícuotas $> 0,1$ ml para la determinación del cianuro libre. Un procedimiento común es el uso de 0,5 ml del extracto seguido por 1,0 ml de NaOH 0,2 M para cerciorarse de que el pH sea > 10 . Después se añade el

fosfato 0,1 M, pH 6,0 (2,5 ml), seguido por la cloramina-T más pirozolona/piridina, en la forma descrita en la Sección IIB.

El contenido total de cianuro de las alícuotas analizadas debe ser $\leq 1,5 \mu\text{g}$ de HCN ($A_{620} \leq 1,2$); en algunos casos es necesario diluir los extractos. Es posible aumentar la sensibilidad del ensayo agregando entre 0,1 y 0,3 ml de extracto ácido al fosfato 0,2 M, pH 7,0, para obtener un volumen final de 0,5 ml. El pH de las mezclas para incubación está en el rango de $6 \pm 0,6$, según la cantidad de extracto que se tomó; un control más exacto del pH o de la molaridad del fosfato es innecesario. Esto evita el tener que neutralizar inicialmente los extractos, a menos de que se emplee 0,5 ml del extracto.

También se pueden emplear tubos abiertos en lugar de tubos con tapa de vidrio, pero el rendimiento disminuye en aproximadamente 10% según el porcentaje de cianuro total. No obstante, el uso de tubos corrientes disminuye considerablemente el tiempo de ensayo, y esta reducción en rendimiento puede ser aceptable en algunos casos.

Referencias citadas

1. CONN, E.E. 1969. Cyanogenic glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 17(3):519-526.
2. COOKE, R.D. 1978. An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Sci. Food Agric.* 29:345-352.
3. _____ y MADUAGWU, E.N. 1978. The effects of simple processing on the cyanide content of cassava chips. *J. Food Technology* 13:299-306.
4. _____ BLAKE, G.G. y BATTERSHILL, J.M. 1978. Purification of cassava linamarase. *Phytochemistry* 17:381-383.
5. _____ HOWLAND, A.K. y HAHN, S.K. 1978. Screening cassava for low cyanide using an enzymatic assay. *Exp. Agric.* 14(4):367-372.
6. COURSEY, D.G. 1973. Cassava as food; toxicity and technology. *In* Nestel, B. y MacIntyre, R., eds. *Chronic Cassava Toxicity; proceedings of an interdisciplinary workshop*, London, 29-30 Jan. 1973. International Development Research Centre, Ottawa, IDRC-010e. pp. 27-36.
7. MONTGOMERY, R.D. 1969. Cyanogens. *In* Liener, I.E., ed, *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Academic Press, New York. pp. 143-157.
8. NESTEL, B. 1973. Current utilization and future potential for cassava. *In* Nestel, B. y MacIntyre, R., eds. *Chronic Cassava Toxicity; proceedings of an interdisciplinary workshop*, London, 29-30 Jan. 1973. International Development Research Centre, Ottawa, IDRC-010e. pp.11-26.
9. ZITNAK, A. 1973. Assay methods for hydrocyanic acid in plant tissues and their applications in studies of cyanogenic glycosides in *Manihot esculenta*. *In* Nestel, B. y MacIntyre, R., eds. *Chronic Cassava Toxicity; proceedings of an interdisciplinary workshop*, London, 29-30 Jan. 1973. International Development Research Centre, Ottawa, IDRC-010e. pp.89-96.

APENDICE

I. Reactivos y soluciones requeridas

A. Acido ortofosfórico y soluciones tampón de fosfato y acetato

1. Acido ortofosfórico 0,1 M: 5,6 ml de ácido ortofosfórico// de agua destilada (dependiendo de la pureza del ácido)
2. Solución tampón de fosfato 0,1 M, pH 6,0: La solución A1 se ajusta.
3. Solución tampón de fosfato 0,2 M, pH 7,0: 11,0 ml de ácido ortofosfórico// de agua destilada, ajustados a un pH de 7,0 con NaOH 5 M.

(Las soluciones A2 y A3 se pueden preparar con fosfato monosódico o disódico y ajustar al pH requerido, pero se debe observar que el grado de hidratación de los reactivos en las botellas sea el correcto ya que algunas de estas sales son higroscópicas).

4. Solución tampón de acetato 0,1 M, pH 5,5: 5,8 ml de ácido acético glacial// de agua destilada, ajustados a un pH 5,5 con NaOH 5 M.

B. Hidróxido de sodio

1. NaOH 5,0 M: 200 g de NaOH// de agua destilada.
2. NaOH 0,2 M: Diluya 40 ml de la solución B1 con agua destilada hasta completar un litro.

C. Linamarina*

Linamarina 5mM: Disuelva 36 mg de linamarina en 30 ml de la solución tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0.

D. Reactivos de color para determinar el cianuro libre

1. Cloramina-T: Disuelva 0,5 g de cloramina-T en 100 ml de agua destilada. Prepare una solución fresca a diario.

* Calbiochem, 10933 N. Torrey Pines Road, La Joya, CA 92037.

2. Reactivo piridina/pirazolona: Disuelva 0,2 g de bispirazolona [3,3'-dimetil-1,1'-difeníl-(4,4'-bi-2-pirazolona)-5,5'-diona] y 1,0 g de 3-metil-1-fenil-5-pirazolona, en 200 ml de piridina de grado analítico. Este reactivo se debe preparar cada 3 días y almacenarse en botellas de vidrio oscuro.

E. Cianuro de potasio para la calibración de los valores de absorbencia

Seque el KCN durante por lo menos 12 horas sobre H_2SO_4 concentrado en un desecador. Disuelva 125 mg en 500 ml de NaOH 0,2 M. Inmediatamente antes de usarlo prepare una dilución de 1:100 con la solución tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0 para obtener una solución de 2,5 μg de cianuro/ml.

F. Sulfato de amonio

Sature los extractos de la enzima cruda (Sección IIA) hasta un 60% con $(NH_4)_2SO_4$, disolviendo 460 g del reactivo pulverizado por litro del extracto a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ C$), por medio de un agitador magnético o una varilla de vidrio.

II. Cálculo representativo del contenido de cianuro en los extractos de yuca

A. La calibración de los valores de absorbencia con KCN

Si 2,6 μg de KCN seco en el volumen final del ensayo (5 ml) (Sección IIB) producen una absorbencia de 0,8 a 620 nm bajo las condiciones experimentales usadas, es decir 2,6 μg de KCN, que es el equivalente de 1,08 μg de HCN produce 0,8 A_{620} por consiguiente, 1 μg de HCN produce una absorbencia de 0,741 . . . (a)

El rango de *linearidad* de absorbencia en relación a la concentración de cianuro es de aproximadamente 0-1.2 A_{620} , cuando se usa piridina con grado de pureza analítica. Sin embargo, se ha observado que cuando se emplea piridina de grado reactivo, el rango de *linearidad* es menor, entre 0-0.8 A_{620} . Por lo tanto, se recomienda realizar una calibración de absorbencia para

determinar el límite máximo de su linealidad. El uso de un rango de absorbencia limitado puede ser apropiado cuando se usen espectrofotómetros bajo los cuales son menos exactos en la escala de absorbencia superior a 0,7.

B. Contenido de cianuro en los extractos

Suponiendo que (i) Xg del material de yuca (raíces, hojas, cáscara, etc.) se extrae como se describe en la Sección IIC, y produce un extracto ortofosfórico total de Vml, y (ii) 0,1 ml de este extracto se analiza como se describe en la Sección IID, y produce una absorbencia de A a 620 nm, el contenido de cianuro en este Vml del extracto es

$$\frac{10 V \times A}{0,741} \mu\text{g de HCN} \dots (b)$$

Esta cantidad proviene del Xg del material de yuca, por consiguiente la concentración del cianuro en este material es

$$\frac{10 V \times A}{0,741} \times \frac{100}{X} \mu\text{g de HCN}/100 \text{ g de yuca}$$

$$\frac{10 V \times A}{0,741} \times \frac{100}{1000} \times \frac{1}{1000} \text{ mg de HCN}/100 \text{ g de yuca}$$

$$\frac{1,35 V \times A}{X} \text{ mg de HCN}/100 \text{ g de yuca} \dots (c)$$

Si se muestrea 0,5 ml del extracto (como sucede a menudo en las determinaciones del cianuro libre), esta fórmula se transforma en

$$\frac{0,27 V \times A}{X} \text{ mg de HCN}/100 \text{ g} \dots (d)$$

El tamaño preciso de este coeficiente en estas fórmulas difiere un poco de un laboratorio a otro, por cuanto la calibración de la absorbencia a 620 nm (*a*) con KCN varía ligeramente según la pureza de los reactivos utilizados y la eficiencia del espectrofotómetro.

Por ejemplo, si (i) 68 g de un tejido parenquimatoso de yuca dieron 230 ml de extracto y el análisis de 0,1 ml de este extracto después de la incubación con la enzima (Sección IID) dio una absorbencia de 0,569, el contenido total de cianuro es

2,60 mg/100 g de tejido (26,0 ppm)

o si (ii) al analizar 0,5 ml de este extracto para determinar el cianuro libre (Sección IID), éste dio una absorbencia de 0,097, el contenido de cianuro libre es

0,089 mg/100 g de tejido (0,89 ppm).