

Contenido de ácido cianhídrico en diferentes variedades de frejoles (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

Rosa Palma V.² y Claudio Ciudad B.³

INTRODUCCION

Las leguminosas, especialmente las de grano, contienen un porcentaje de proteínas relativamente alto (alrededor de 20-30%) y representan una buena fuente de este elemento de origen vegetal, frente a la gran demanda que existe tanto para consumo humano como animal.

El valor nutritivo de la proteína de leguminosas depende de su composición aminoacídica. En estas especies, de acuerdo al patrón de Referencias de proteínas de FAO (Aykroyd, W. R., 1964), los aminoácidos limitantes serían metionina y triptofano; en consecuencia, su valor biológico es incompleto. Sin embargo, representa una excelente fuente de lisina, por lo cual se utiliza para suplementar dietas y suplir de este modo los desbalances aminoacídicos.

Por otra parte, Wagh *et al.* (1963) en sus estudios acerca del valor nutritivo del frejol, demostraron la presencia de sustancias tóxicas, tales como aglutininas, que retardan el crecimiento y, además, son inhibidores de la tripsina. Opinan que éstos, en último término, serían los responsables del bajo valor nutritivo, por producir una disminución en la digestibilidad de la proteína al estado crudo.

Jaffé, W. G. y Vega, L. C. (1968) señalan también que las hemoaglutininas son las causantes de los efectos tóxicos producidos en ratas alimentadas con dietas a base de frejoles, suplementadas con metionina y que provocaban una pérdida de peso y la muerte

posterior. La actividad de antitripsina y de antiamilasa fue baja y no pareció estar directamente relacionada con el retardo del crecimiento observado. Se supone que las hemoaglutininas se adsorberían a nivel de las células de revestimiento e interferirían mecánicamente la absorción intestinal (Kakade, M. y Evans, J., 1966). Además, se ha observado que existe una relación entre dietas que contienen niveles altos de frejoles crudos y la disminución del nivel de glucosa sanguínea producida. Hintz, H., Hogue, D. E. y Lenhart, K. (1967) observaron este fenómeno de hipoglicemia y lo atribuyeron también a las hemoaglutininas. Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce la toxicosis no ha sido establecido aún. Wagh *et al.* (1963) habían descrito anteriormente hipertrofia pancreática en pollos a los cuales se les había suministrado dietas que incluían frejoles crudos.

En consecuencia, el consumo de las leguminosas crudas en la alimentación animal se vería limitado por la presencia de las sustancias tóxicas ya señaladas.

Se han hecho estudios, además, respecto de otras sustancias tóxicas que derivan de precursores no tóxicos, como es el caso de los cianoglucósidos (Crosby, D., 1969).

Se postula que estas sustancias sólo están presentes en el grano crudo y que se eliminan durante la preparación culinaria. Si la cocción es adecuada, se inactivarían los factores tóxicos antes mencionados y se volatilizaría el ácido cianhídrico (HCN) proveniente de cianoglucósidos. Lo importante, por consiguiente, es determinar la toxicidad potencial que existiría en el frejol, debido a la presencia de glucósidos cianogenéticos, los cuales al hidrolizarse liberan una parte glucosídica y un aglucón que desprende HCN.

Existen, por otra parte, antecedentes de trastornos intestinales, según lo señala Jacob,

¹Parte de la tesis de grado del autor principal para optar al título de Químico Farmacéutico.

Recepción originales: 10 de marzo de 1971.

²Químico Farmacéutico, Laboratorio Central de Bromatología, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Casilla 5427, Santiago, Chile.

³Bioquímico, Laboratorio Central de Bromatología, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Casilla 5427, Santiago, Chile.

E. (1967), que serían causados por estos glucósidos cianogénicos. Se constató que productos elaborados a base de harina de frejoles chilenos en procesos de tostado, provocan trastornos intestinales y se atribuyó a la acción tóxica del HCN proveniente de cianoglucósidos y que no es eliminado durante el proceso industrial.

En la familia de las leguminosas se observa que algunas especies forrajeras contienen grandes cantidades de HCN. Lo mismo sucede con algunas gramíneas. En las semillas de sorgo se encuentran alrededor de 280 ppm y en los tallos hasta 2.500 ppm (Crosby, D., 1969).

Según Crosby, D. (1969), la especie *Phaseolus lunatus* L. variedad Lima Beans, puede liberar hasta 3.000 ppm, concentración letal para cualquier organismo. Al parecer, en las variedades comestibles existen cantidades muy pequeñas gracias a los trabajos de selección genética.

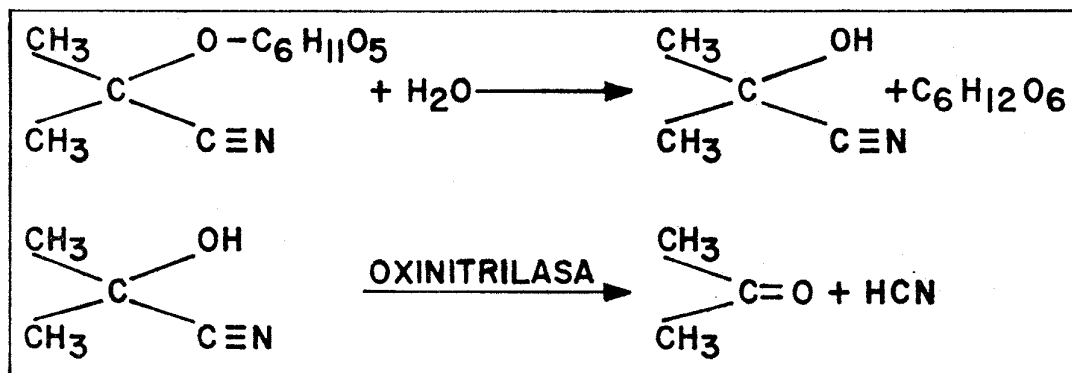
El carácter letal del ion cianuro se debe a que posee propiedades de complejante de iones metálicos y por lo tanto actúa como inhibidor de enzimas que tienen metales en

su estructura. Es un importante inhibidor de la cadena respiratoria porque inhibe la citocromoxidasa (citocromo a_3) lo que implica el bloqueo de la respiración celular (Harrow, B. y Manzur, A., 1968). Se ha encontrado que una dosis de 200 mg de HCN es letal para un adulto.

Siendo Chile gran productor de frejoles, se estimó conveniente, por lo expuesto anteriormente, realizar un estudio preliminar del contenido de HCN en diferentes variedades de frejoles a fin de determinar su contenido en principio tóxico y fomentar el cultivo de aquéllas que presenten menor contenido de éste, para la industrialización y producción de conservas de este alimento. De esta manera podría incrementarse el empleo de la proteína del frejol en la alimentación humana.

Glucósidos cianogénicos. En los frejoles se ha encontrado linamarina y lotaustralina, existiendo en mayor proporción el primero de éstos (Nartey, F. S., 1968).

Según Conn, E. (1969), estos cianoglucósidos son susceptibles de sufrir una hidrólisis enzimática.



Esta hidrólisis se realizaría en dos etapas. Primero actúa una glucosidasa que rompe el enlace beta, originando una cianohidrina, la cual se disocia para formar aldehído o cetona y HCN (Bahl, O. P. y Agrawal, K., 1968) (Butler, G., Bailey, R. y Kennedy, L. D., 1965) (Conn, E., 1969) (Clapp, R., Bisset, F. y Coburn, R. A., 1966).

Existe evidencia experimental que indica a algunos aminoácidos esenciales como precursores de estos compuestos. La biosíntesis ha sido confirmada con la incorporación de átomos marcados (Abrol, Y., Conn, E. y Stoker, T. R., 1966) (Butler, G., 1965) (Butler, G. y Conn, E., 1964) (Conn, E., 1969).

MATERIALES Y METODOS

Se determinó la cantidad de HCN liberado en la hidrólisis de cianoglucósidos, en veinte variedades de frejoles. Se realizó, además, el análisis porcentual de las mismas.

Las muestras analizadas corresponden a las siguientes variedades:

Apolo, Araucanos, Arroz, Burros Argentinos, Coscorrón, Cristal Blanco, Frutilla, Pajaritos, Red Kidney, Robust, Saginaw, Seaway, Suave, Tártaro, Titán, Tórtolas, Villarrica, Zeus y Línea 206-2892.

Este material fue proporcionado por el Programa Leguminosas del Instituto de Investi-

gaciones Agropecuarias, actualmente: Proyecto Leguminosas, Papas, Hortalizas, y cosechado en febrero-marzo de 1970 en la Estación Experimental La Platina, Santiago.

Se analizaron variedades que actualmente tienen mayor aceptabilidad, otras nuevas que se pretende introducir en la agricultura nacional para consumo humano y algunas líneas de experimentación en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

La valoración del HCN se realizó por dos métodos:

a) *Método colorimétrico*, basado en la reducción del picato de sodio por acción del ion cianuro, con formación de un producto coloreado que presenta máxima absorción a una longitud de onda de 520 m μ . La concentración de HCN se calcula a partir de una curva tipo (Fisher, F. B. y Brown, J., 1952).

b) *Método propuesto por la Association of Official Agricultural Chemists* (1960) (AOAC), que consiste en la precipitación del HCN al estado de AgCN con una solución de AgNO₃ 0,1N. y la retrotitulación de una alícuota con KSCN, 0,01N.

Ambos métodos involucran la destilación del HCN por arrastre de vapor de agua. Para ello la muestra se debe acidificar previamente y, después de una maceración de alrededor de 14 horas, se somete a la destilación durante 10 minutos.

Se ensayaron dos métodos con el objeto de obtener datos más reproducibles en el análisis de pequeñas cantidades de HCN en frejoles. Se emplearon dos tipos de variedades, una que presentaba alto contenido de HCN (*Phaseolus lunatus* L., variedad Lima Beans) y otra de bajo valor de HCN (*Phaseolus vulgaris* L., var. Red Kidney). Se realizaron diez análisis por variedad y los valores obtenidos, así como el coeficiente de variación (CV) se presentan en el Cuadro 1.

Luego de comparar ambos métodos y de calcular los coeficientes de variación, se adoptó el método descrito por la AOAC por considerar que, bajo condiciones estandarizadas, da valores más reproducibles y, además, no interfieren agentes reductores que pudieran estar presentes en la muestra.

A este método se le introdujeron las siguientes modificaciones:

1. El destilado se recibe a baja temperatura (0 - 5°C), y
 2. Después de destilar durante 40 minutos, el líquido se calentó a reflujo por espacio de 15 minutos para obtener una mejor precipitación.
- El análisis porcentual, según métodos ana-

Cuadro 1 — Contenido de ácido cianhídrico en *Phaseolus lunatus* L. y *Phaseolus vulgaris* L., por dos métodos.

	MÉTODO COLORIMETRICO		MÉTODO VALORACION ACIDA	
	\bar{x} ppm	c. v. %	\bar{x} ppm	c. v. %
<i>P. lunatus</i> L., variedad Lima beans	288,4	21,47	241,1	14,42
<i>P. vulgaris</i> L., variedad Red Kidney	18,7	16,30	17,4	9,18

Cuadro 2 — Humedad y contenido de HCN de diferentes variedades de frejoles (*Phaseolus vulgaris* L.), y diferencias significativas para contenido de HCN.

VARIEDAD	HUMEDAD ppm DE HCN		RANGO DE DUNCAN PARA HCN (0,05)*
	g/100 g	mg/1000 g	
1. Titán	89,6	50,9	a
2. Buirros	90,8	50,8	a
3. Coscorrón	89,9	42,5	a
4. Tártaro	90,4	41,3	ab
5. Seaway	90,4	40,5	ab
6. Tórtolas	91,7	40,3	ab
7. Robust	90,9	39,4	ab
8. Villarrica	90,9	37,1	abc
9. Saginaw	90,6	31,6	abcd
10. Zeus	88,9	25,4	bcde
11. Suave	88,0	21,6	bcde
12. Burros Argentinos	90,9	21,2	bcde
13. Red Kidney	87,7	17,4	cde
14. Pajaritos	91,4	14,9	de
15. Cristal Blanco	89,5	14,3	de
16. Araucanos	89,7	14,2	de
17. Línea 206-2892	88,0	13,2	de
18. Arroz	90,9	9,3	e
19. Apolo	90,4	5,9	e
20. Frutilla	90,2	5,6	e

*Los valores unidos por una misma letra son estadísticamente iguales entre sí.

líticos de AOAC (1960), comprendió las siguientes determinaciones:

1. Humedad
2. Cenizas
3. Proteínas
4. Extracto etéreo
5. Fibra cruda
6. Extracto no nitrogenado

Análisis estadístico

Con el propósito de establecer las diferencias en contenido de HCN de las veinte variedades empleadas, se empleó el diseño de bloques al azar y luego de un análisis de varianza se aplicó la prueba de Rango de Duncan para determinar las diferencias entre los promedios.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del análisis estadístico establecen que existen diferencias significativas al 5% entre variedades en relación al contenido de HCN.

En el Cuadro 2 se presentan los valores de

HCN expresados en ppm. El rango de concentración va desde 5,6 ppm de HCN para la variedad de menor contenido, a 50,9 ppm, para la de mayor contenido. La gran variabilidad de los valores se atribuiría, por una parte, como lo señala Conn, E. (1969), a la presencia de dos genes que determinarían las propiedades cianoforéticas y también a la influencia que ejercen las condiciones ecológicas y climáticas.

Al analizar las variedades se encontró que todas ellas presentaban bajo contenido de HCN; cabría destacar entonces que Butler *et al.* (1965) postularon que la relación menor en la cantidad de HCN liberado con respecto a la proporción de glucosa liberada del glucósido, podría explicarse por la presencia de una enzima que descompondría el HCN en el momento mismo de la hidrólisis.

Al comparar los resultados de las determinaciones hechas con los métodos colorimétricos y de la valoración ácida, se observaron promedios superiores de HCN obtenidos por el primer método (Cuadro 1). La interferencia que se produciría al existir cualquier otro

Cuadro 3 — Composición química proximal de diversas variedades de frejoles (*Phaseolus vulgaris* L.) (g/100 g de materia seca).

VARIETADES	NITROGENO	PROTEINAS	FIBRA CRUDA	EXTRACTO ETERE0	CENIZAS	EXTRACTO NO NITROGENADO
1. Apolo	3,85	24,06	4,43	2,04	3,14	66,33
2. Araucanos	3,70	23,12	4,48	1,44	5,06	65,90
3. Arroz	4,13	25,81	5,28	1,91	4,29	62,71
4. Burros	3,87	24,19	5,47	0,97	3,91	65,46
5. Burros Argentinos	3,36	21,00	4,75	2,72	3,85	67,68
6. Coscorrón	3,33	20,81	5,39	1,57	4,05	68,18
7. Cristal Blanco	4,10	25,62	4,75	2,71	4,51	62,41
8. Frutilla	3,72	23,25	4,70	1,94	4,15	65,96
9. Pajaritos	3,59	22,44	5,55	1,91	3,74	66,39
10. Red Kidney	3,93	24,56	5,01	1,01	3,99	65,43
11. Robust	3,64	22,75	4,95	1,76	4,56	65,98
12. Saginaw	3,31	20,81	5,01	1,67	4,32	68,19
13. Seaway	3,97	24,81	5,12	1,71	4,05	64,31
14. Suave	4,15	25,94	5,09	2,38	4,46	62,13
15. Tártaro	4,26	26,62	4,40	1,00	4,32	63,66
16. Titán	4,09	25,56	4,75	1,22	3,90	64,57
17. Tórtolas	3,54	22,12	5,48	1,48	3,99	66,93
18. Villarrica	3,29	20,56	4,51	1,54	3,86	69,53
19. Zeus	3,83	23,94	5,07	1,76	3,80	65,43
20. 206-2892	3,22	20,12	5,02	1,86	4,28	68,72
Rangos	3,22	20,12	4,40	0,97	3,14	62,13
	4,26	26,62	5,55	2,72	5,06	69,53

reductor orgánico volátil, capaz de reducir al picrato de sodio, podría explicar las diferencias entre ambos procedimientos.

Se observó, además, que las condiciones de hidrólisis, tiempo de maceración y de destilación inciden directamente en la reproducibilidad de los resultados.

Las experiencias indicaron que a un menor tiempo de maceración, la hidrólisis es incompleta.

En el Cuadro 3 se encuentran expresados los valores del análisis porcentual de cada variedad sobre materia seca.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado en las diferentes variedades de fréjoles se concluye:

— El contenido de HCN de todas las varie-

dades analizadas es inferior a la dosis tóxica que cita la literatura (200 mg son letales para un adulto) y, en consecuencia, no implicaría ningún riesgo de toxicidad debida a sustancias cianogénicas.

— De los dos métodos ensayados, el método señalado por la AOAC y adoptado con algunas modificaciones, tiene un coeficiente de variación menor.

— Del análisis estadístico se deduce que existen diferencias significativas al 5% entre algunas variedades.

— Es conveniente destacar que estos compuestos representan factores importantes en el metabolismo de las plantas y su función específica aún no está bien esclarecida; por lo tanto, convendría realizar un estudio de ellos a través de los procesos de crecimiento y también en relación al tipo de almacenamiento de los granos.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido de ácido cianhídrico en veinte diferentes variedades de fréjoles (*Phaseolus vulgaris* L.) y líneas experimentales del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental La Platina, Santiago.

La valoración del ácido cianhídrico se realizó de acuerdo al método de valoración en medio ácido, propuesto por la AOAC, con algunas modificaciones.

Los valores obtenidos de ácido cianhídrico, representan la cantidad de este ácido liberado en la hidrólisis de ciertos compuestos que existen en las semillas, y se expresaron en partes por millón (mg de HCN/1.000 g de sustancia seca).

El análisis estadístico demostró que existen variedades con un contenido de ácido cianhídrico significativamente más alto, pero que en todo caso estos porcentajes no presentarían riesgo alguno de toxicidad en el grano seco para consumo humano.

SUMMARY

The present experiment was conducted to determine the hydrogen cyanide content in twenty different varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), and experimental lines under investigation at the Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental La Platina, Santiago.

The amount of hydrogen cyanide was evaluated according to the AOAC methods and some modifications were added.

The values of hydrogen cyanide obtained correspond to the amount of this acid released in the hydrolysis of certain compounds present in bean seeds, and were expressed in parts per million (mg of HCN/1,000 g of dry matter).

The results obtained indicated that some varieties had statistically significant higher content of hydrogen cyanide than others, but the low magnitude of the values found for the dry-bean varieties tested in the present study would classify them as non toxic for human consumption.

LITERATURA CITADA

ABROL Y., CONN, E. and STOKER, T. R. 1966. Studies of the identification, biosynthesis and meta-

bolism of a cyanogenic glucoside in *N. domestica*. *Phytochem.* 5: 1021-1027.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1960. Official methods of analysis. 9th Edition. Ed. Board.
- AYKROYD, W. R. 1964. Legumes in human nutrition. Nutrition studies N° 19. FAO, Rome. 152 p.
- BAHL, O. P. and AGRAWAL, K. 1968. Glicosidasas of *Phaseolus vulgaris*. Jour. Biolog. Chem. 243: 98-111.
- BUTLER G., and CONN, E. 1964. Biosynthesis of cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin. Jour. Biolog. Chem. 239: 1674-1681.
- . 1965. The distribution of the cyanoglucosides linamarin and lotaustralin in higher plants. Phytochem. 4: 127-131.
- , BAILEY, R. and KENNEDY, L. D. 1965. Studies on the glucosidase linamarase. Phytochem. 4: 369-381.
- CONN, E. 1969. Cyanogenic glucosides. Jour. Agric. and Food Chem. 17: 519-526.
- CLAPP, R., BISSET, F. and COBURN, R. A. 1966. Cyanogenesis in Manioc linamarin and lotaustralin. Phytochem. 5: 1323-1326.
- CROSBY, D. 1969. Natural toxics background in the food of man and his animals. Jour. Agric. and Food Chem. 17: 532-538.
- FISHER, F. B. and BROWN, J. 1952. Colorimetric determination of cyanide in stack gas and waste water. Jour. Anal. Chem. 24: 1440-1444.
- HARROW, B. and MANZUR, A. 1968. Textbook of Biochemistry. W. B. Sanders Company, Philadelphia, London, 9th. ed. 648 p.
- HINTZ, H., HOGUE, D. E. and LENMART, K. 1967. Toxicity of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in the rat. Jour. Nutrition. 93: 77-86.
- JACOB, E. 1967. Contenido de ácido cianhídrico en porotos (*Phaseolus vulgaris*) crudos y precocidos de las variedades de mayor consumo en Chile. Nutrición, Bromatología y Toxicología. 6: 75-77.
- JAFFE, W. G. and VEGA, L. C. 1968. Heat labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). Jour. Nutrition. 94: 203-210.
- KAKADE, M. and EVANS, J. 1966. Growth inhibition of rats fed raw navy beans (*Phaseolus vulgaris*). Jour. Nutrition. 90: 191-198.
- NARTEY, F. S. 1968. Studies in Cassava, *Manihot utilissima* Pohl. Cyanogenesis, biosynthesis of linamarin and lotaustralin in etiolated seedlings. Phytochem. 7: 1307-1312.
- WAGH, P., KLAUSTERMEIER, P., WAIBEL, P. E. and LIENER, I. E. 1963. Nutritive value of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) for chicks. Jour. Nutrition. 80: 191-195.