

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DEL CIANURO TOTAL DE HOJAS
DE YUCA (*MANIHOT ESCULENTA*) Y
PROPUESTA DE MÉTODOS DE
ELIMINACIÓN EN DIFERENTES
VARIEDADES DE COLOMBIA 2023**

Iván Mauricio Mahecha Rojas

Ingeniero Químico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad De Medicina

Maestría En Toxicología

Bogotá, 2023

EVALUACIÓN DEL CIANURO TOTAL DE HOJAS DE YUCA (*MANIHOT ESCULENTA*) Y PROPUESTA DE MÉTODOS DE ELIMINACIÓN EN DIFERENTES VARIEDADES DE COLOMBIA 2023

Iván Mauricio Mahecha Rojas

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Toxicología

Director:

Ph.D. Camilo Ernesto López Carrascal

Codirectoras:

Ph.D. Johana Carolina Soto Sedano

Q.MsC. Diana Carolina Chaves Silva

Línea de Investigación:

Toxicología Analítica

Grupo de Investigación:

Toxicología Analítica

Manihot Biotec

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá, Colombia

2023

A mis padres

Cuanta más arena ha escapado del reloj de arena de nuestra vida, más claramente deberíamos ver a través de él.

Nicolás Maquiavelo

Declaración de obra original

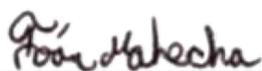
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Iván Mauricio Mahecha Rojas

Fecha 14/05/2024

Agradecimientos

A mis padres por su guía, apoyo incondicional, fortaleza y cariño.

A mis compañeros de la maestría Dorita, Juliet, Lucho y Ramsés por su compañía y amistad.

A la Maestría en Toxicología y a sus miembros del programa por haberme dado la oportunidad de estudiar el posgrado.

A la profesora Diana Carolina Chaves Silva por su amistad, consejo, acompañamiento y guía.

A Cristian Burgos por su apoyo y amistad.

A Laura Chivatá por su gran dedicación, consejo y solidaridad como gran persona así como investigadora.

A Johana Carolina Soto, Camilo López por recibirme y darme la oportunidad de realizar esta tesis en su grupo de investigación. Son grandes seres humanos y modelos a seguir. Estoy profundamente agradecido con ustedes.

A Edgar Castro y a Rubén por su ayuda en los laboratorios.

A Nicolás Torres y Santiago Marín por su amistad y ayuda.

A Roberto Carlos y su familia por ayudarnos en San Cayetano.

A Catalina, Emili, Wilson, Rubén, Juan Sebastián, Yadira, Jenny, Sebastián, Meike, Jorge y en general a todo el grupo de investigación Manihot Biotec e IGP por su compañía, amistad y conocimiento.

Espero que todos ustedes tengan éxito en lo que se propongan.

Resumen

La linamarina es un glucósido cianogénico presente en la yuca (*Manihot esculenta C*) cuya descomposición mediante reacciones de hidrólisis enzimática libera ácido cianhídrico como mecanismo de defensa de la planta. Se sabe que el consumo de las raíces tuberosas de la yuca en Colombia es abundante, así como su producción y versatilidad en cuanto a su cultivo. Sin embargo, a nivel nutricional este alimento solo aporta en su mayoría carbohidratos a diferencia de las hojas que tienen un gran aporte en proteínas y minerales, pero su contenido en linamarina es considerablemente mayor que el presente en las raíces.

En el marco de esta investigación, se llevó a cabo un análisis experimental mediante una metodología netamente descriptiva con el objetivo de investigar la concentración de ácido cianhídrico (HCN) en las hojas de yuca de diversas variedades. Se emplearon técnicas de análisis colorimétrico y espectrofotométrico (UV-VIS), adaptando y optimizando metodologías estandarizadas para la identificación y cuantificación de HCN donde se observaron valores en un rango comprendido entre 97 a 3936 mg HCN/kg de muestra seca (ppm). Adicionalmente, este estudio consideró la eliminación del HCN en la hoja con el propósito de fomentar y añadir valor a nivel agroalimentario a este importante material, por lo que se propusieron y efectuaron dos métodos capaces de ser reproducibles a nivel doméstico evidenciando una remoción del contenido de HCN entre el 60 y el 91% de las hojas.

Palabras clave: Ácido cianhídrico, Eliminación, Espectrofotometría UV-VIS, Hojas de yuca, Linamarina, *Manihot esculenta*, Toxicidad.

Abstract

Evaluation of total cyanide in cassava (*Manihot esculenta*) leaves and proposal of elimination methods in different Colombian varieties 2023

Linamarin is a cyanogenic glycoside present in cassava (*Manihot esculenta* C), whose enzymatic hydrolysis releases hydrogen cyanide as a defense mechanism in the plant. It is well-established that cassava tuber consumption is prevalent in Colombia due to its abundant production and versatility in cultivation. However, nutritionally, this food primarily contributes carbohydrates, in contrast to the leaves which offer substantial protein and mineral content. Notably, the linamarin content in leaves is considerably higher than that found in the roots.

Within the framework of this research, an experimental analysis was conducted using a purely descriptive methodology to explore the concentration of hydrogen cyanide (HCN) in cassava leaves of various varieties. Colorimetric and spectrophotometric (UV-VIS) analysis techniques were employed, adapting and optimizing standardized methodologies for the identification and quantification of HCN. Results revealed concentrations ranging from 97 to 3936 mg HCN/kg of dry basis (ppm). Additionally, this study considered the removal of HCN from the leaves with the aim of promoting and adding value at the agri-food level to this significant material. To achieve this, two reproducible methods were proposed and implemented at the domestic level, demonstrating a removal of HCN content ranging from 60% to 91% in the analyzed leaves.

Keywords: Cassava leaves, Elimination, Hydrocyanic acid, Linamarin, *Manihot esculenta*, Spectrophotometry UV-VIS, Toxicity.

Contenido

1. JUSTIFICACIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. EXPOSICIÓN DE CIANURO POR EL CONSUMO DE YUCA	7
2.2. DESARROLLO DEL PROYECTO	9
3. MARCO TEÓRICO	11
3.1. GENERALIDADES DE LA YUCA (<i>MANIHOT ESCULENTA</i>):	11
3.1.1. <i>Taxonomía y Botánica</i> :.....	11
3.1.2. <i>Producción en Colombia</i>	14
3.1.2.1. Composición nutricional	16
3.1.2.2. Principios antinutricionales	18
3.1.3. <i>Perspectivas antropológicas y culturales en comunidades indígenas</i>	20
3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS	21
3.2.1. <i>Funciones</i>	21
3.3. METABOLISMO EN LAS PLANTAS	22
3.3.1. <i>Biosíntesis</i>	22
3.3.2. <i>Bioactivación por hidrólisis enzimática</i>	24
3.3.3. <i>Localización</i>	25
3.3.4. <i>Detoxificación</i>	26
3.4. LINAMARINA.....	27
3.4.1. <i>Biosíntesis y bioactivación en la yuca</i>	28
3.4.2. <i>Efectos adversos en la salud humana</i>	31
3.5. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE CIANURO	32
3.5.1. <i>Microdifusión de Conway</i>	33
3.5.2. <i>Argentometría</i>	33
3.5.3. <i>Colorimetría-espectrofotometría</i>	34
3.6. MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE CIANURO EN HOJAS DE YUCA	34
4. OBJETIVOS	37

4.1.	GENERAL	37
4.2.	ESPECÍFICOS.....	37
5.	METODOLOGÍA.....	39
5.1.	ETAPA PRELIMINAR.....	40
5.2.	PREPARACIÓN DE LA ENZIMA:.....	40
5.3.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA:	42
5.4.	PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN:.....	45
5.5.	CUANTIFICACIÓN DE CIANURO EN HOJAS DE YUCA	46
5.6.	EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA LA REMOCIÓN DE CIANURO EN HOJAS DE YUCA	50
5.7.	DISEÑO ESTADÍSTICO	52
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	53
6.1.	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO:.....	53
6.1.1.	<i>Preparación de la enzima:</i>	53
6.1.2.	<i>Actividad enzimática:</i>	56
6.1.3.	<i>Desarrollo de la curva de calibración</i>	57
6.2.	CUANTIFICACIÓN DE CIANURO EN HOJAS DE YUCA	59
6.2.1.	<i>Recolección de muestras</i>	59
6.2.2.	<i>Procesamiento de las muestras (muestras biológicas)</i>	59
6.2.3.	<i>Procesamiento de las muestras (muestras técnicas)</i>	63
6.3.	REMOCIÓN DE CIANURO EN LAS HOJAS DE YUCA.....	66
7.	DISCUSIÓN	71
8.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
8.1.	CONCLUSIONES	79
8.2.	RECOMENDACIONES.....	80

Lista de figuras

Figura 3-1: Morfología de la yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	13
Figura 3-2: Morfología histológica general de la raíz tuberosa de M. esculenta.....	14
Figura 3-3: Producción anual de yuca en Colombia desde el 2007 al 2021.....	15
Figura 3-4: Producción de yuca a nivel departamental en Colombia para el año 2021.....	16
Figura 3-5: Funciones de los glucósidos cianogénicos en plantas vasculares.....	22
Figura 3-6: Biosíntesis de los glucósidos cianogénicos.....	23
Figura 3-7: Bioactivación de los glucósidos cianogénicos.....	25
Figura 3-8: Compartimentalización generalizada de los glucósidos cianogénicos en células vegetales.....	26
Figura 3-9: Rutas de detoxificación de cianuro libre en animales y plantas.....	27
Figura 3-10: Estructura molecular de la linamarina.....	28
Figura 3-11: Biosíntesis de la linamarina.....	29
Figura 3-12: Bioactivación de la linamarina.....	29
Figura 3-13: Anabolismo y catabolismo general de la linamarina en la yuca.....	30
Figura 5-1: Diagrama metodológico del proyecto- Etapa preliminar.....	40
Figura 5-2: Diagrama metodológico del proyecto- Preparación de enzima.....	41
Figura 5-3: Diagrama metodológico del proyecto- Actividad de la enzima.....	42
Figura 5-4: Diagrama metodológico del proyecto- Curva de calibración.....	45
Figura 5-5: Diagrama metodológico del proyecto- Cuantificación de cianuro.....	47
Figura 5-6: Diagrama metodológico para cuantificación de cianuro-Fundamentación.....	49
Figura 5-7: Diagrama metodológico para los tratamientos propuestos en la eliminación de HCN en las hojas de yuca.....	51
Figura 6-1: Pelletización de linamarasa en dos preparaciones de diferente concentración.....	55
Figura 6-2: Diagrama de caja y bigotes para concentraciones de HCN halladas para 28 variedades analizadas expresadas en $\text{mg}_{\text{HCN}}/\text{kg}$ (ppm) de muestra seca.....	60
Figura 6-3: Distribución del contenido de HCN en hojas de yuca para 28 variedades distintas. ...	62

Figura 6-4: Concentración de HCN remanente en las hojas de yuca de las variedades seleccionadas para los 4 tratamientos propuestos. 67

Lista de tablas

Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de la especie <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	12
Tabla 3-2: Composición nutricional básica de la harina de yuca.....	17
Tabla 3-3: Composición nutricional de las hojas de la yuca.	18
Tabla 5-1: Diseño experimental para la evaluación de la actividad enzimática.	43
Tabla 6-1: Resultados de absorbancia para la evaluación de la actividad enzimática	57
Tabla 6-2: Concentraciones de HCN en hojas de yuca para 28 variedades diferentes de Colombia.	61
Tabla 6-3: Concentraciones reportadas de HCN en hojas de yuca por diversos autores.....	62
Tabla 6-4: Concentraciones obtenidas de HCN para la revisión de muestras técnicas en hojas de yuca para 5 variedades diferentes.	64
Tabla 6-5: Análisis de la varianza del contenido de HCN entre individuos de la misma variedad para las 5 accesiones estudiadas.....	65
Tabla 6-6: Análisis de la varianza del contenido de HCN entre variedades para las 5 accesiones estudiadas	65
Tabla 6-7: Concentraciones obtenidas de HCN frente a los tratamientos de remoción estipulados para las hojas de yuca.....	66
Tabla 6-8: Análisis de varianza para múltiples factores del contenido de HCN entre tratamientos para las variedades punta de lanza y venezolana.	68
Tabla 6-9: Análisis de varianza para múltiples factores del contenido de HCN entre variedades para los tratamientos empleados para la eliminación de HCN en hojas de yuca.....	69

Lista de símbolos y abreviaturas

Unidad	Término	Medida
°C	Grados Celsius	Temperatura
atm	Presión atmosférica	Presión
cm	Centímetro	Longitud
g	Gramo	Masa
h	Hora	Tiempo
L	Litro	Volumen
mg	Miligramo	Masa
mg/kg	Miligramo/kilogramo	Concentración
min	Minuto	Tiempo
M	Molaridad	Concentración
mL	Mililitro	Volumen
mm	Milímetro	Longitud
nm	Nanogramo	Masa
ppm	Partes por millón	Concentración
µg	Microgramo	Masa
%	Porcentaje	Proporción
%p/v	Porcentaje peso/volumen	Concentración

Abreviatura	Término
<i>APHA</i>	Asociación de Salud Pública Americana
<i>ARfD</i>	Dosis de referencia aguda
<i>CL50</i>	Concentración letal media
<i>CN</i>	Cianuro (ion)
<i>DAD</i>	Detector de arreglo de diodos
<i>DANE</i>	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
<i>DL50</i>	Dosis letal media
<i>ENA</i>	Encuesta Nacional Agropecuaria
<i>FAO</i>	Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<i>GC</i>	Glucósidos cianogénicos
<i>HCN</i>	Ácido cianhídrico, cianuro de hidrógeno (gas)
<i>JECFA</i>	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
<i>KCN</i>	Cianuro de potasio
<i>LH</i>	Linamarina hidrolasa
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>pH</i>	Potencial de hidrógeno
<i>PMTDI</i>	Ingesta diaria tolerable máxima provisional
<i>ppm</i>	Partes por millón
<i>RCF</i>	Fuerza centrífuga relativa
<i>UV</i>	Ultravioleta
<i>UV-VIS</i>	Ultravioleta visible
λ	Longitud de onda

Glosario

Bioactivación: Es un proceso metabólico dado en los organismos basado en la conversión de un metabolito específico a un producto tóxico o nocivo.

Biosíntesis: Es un proceso químico múltiple dado en un organismo donde un compuesto simple específico es modificado y unido para formar moléculas de mayor complejidad.

Catabolismo: Es el proceso metabólico ocurrido en un organismo encargado de la degradación de nutrientes orgánicos transformándolos en productos finales simples como recurso energético para las células mediante procesos de reducción y oxidación.

Cianogénesis: La cianogénesis es la habilidad de las plantas y otros organismos para liberar ácido cianhídrico gracias a la descomposición de los compuestos cianogénicos presentes en el organismo mediante una reacción de hidrólisis enzimática.

Enzima: Molécula orgánica de naturaleza proteica cuya función es acelerar la velocidad de reacción actuando como catalizadores.

Fitófago: Se entiende como el grupo de insectos que puede atacar plantas o cultivos, en zonas boscosas o de jardines, causando molestias en el entorno humano.

Glucosa: Es un carbohidrato y el azúcar más simple importante para el metabolismo humano, también es una de las principales moléculas que sirven como fuentes de energía para plantas y animales.

Hidrólisis enzimática: Se entiende como hidrólisis que se produce mediante un grupo de enzimas con el nombre de hidrolasas, la cual presenta un efecto catalítico, produciendo una ruptura de enlaces químicos en una molécula formándose otras especies químicas.

Liasas: Son enzimas reductasas que catalizan la ruptura de enlaces carbono, azufre, y otros enlaces no peptídicos por un medio diferente al de la hidrólisis o una oxidación, para esta clasificación se requiere una participación de un solo sustrato el cual efectúa una reacción irreversible y se necesitan doble sustrato para una reacción reversibles.

Linamarasas: Son las enzimas partícipes del proceso de cianogénesis en referencia a la linamarina; generalmente se refieren a las glucosidasas y liasas también llamadas “emulsinas”.

Metabolismo: Es el conjunto de reacciones químicas y bioquímicas que tiene lugar en los procesos fisicoquímicos que ocurren en una célula o el organismo.

Residuos Agrícolas: Son residuos conformados por cáscaras, cortezas, material lignocelulósico y demás que pueden ser aprovechados como biomasas para la alimentación de animales, producción de energía o fabricación de fertilizantes.

β -Glucosidasa: Es una enzima ubicua producida por todos los dominios: Bacteria, Fungi, *Plantae* y Animalia. La enzima β -glucosidasa rompe los enlaces β -D-glucosídicos de gran variedad de compuestos, liberando glucosa como producto final.

Introducción

La evolución que lleva consigo la industria desde un punto de vista económico y social ha traído grandes avances, pero también demandas de carácter importante. La industria agrícola juega un papel relevante frente a la demanda de producción, control y calidad de alimentos, cuya relación al crecimiento demográfico a nivel global aumenta su necesidad de proveer alimentos a la población (Moo *et al.*, 2020).

Es así como existen varios tipos de compuestos bioactivos cuya finalidad puede ser beneficiosa o usada con fines malintencionados o tener efectos nocivos para la salud, por ejemplo: los glucósidos cianogénicos (amigdalina, linamarina y lotaustralina), proteínas inactivadoras de ribosomas (abrina, ricina), alcaloides (aconitina), alcaloides tropánicos (escopolamina, hiosciamina, atropina), entre otros (Cornara *et al.*, 2016).

De esta manera, los glucósidos cianogénicos (GC) son un grupo de metabolitos secundarios encontrados en más de 2650 especies vegetales, desde helechos y gimnospermas hasta angiospermas monocotiledóneas y eudicotiledóneas (Morant *et al.*, 2008), perteneciendo alrededor de 550 géneros y más de 130 familias (Dzombak *et al.*, 2005).

Estas moléculas se caracterizan por ser polares compuestas por una aglicona (cianohidrina) y un monosacárido o disacárido, dependiendo de la especie y su aminoácido precursor en el proceso de biosíntesis (Ganjewala *et al.*, 2010; Rodríguez & Suárez, 2021). En la última década se han encontrado más de 60 tipos diferentes, pero nuevas moléculas y nuevos tipos se siguen aislando y describiendo por la fitoquímica (Vetter, 2017).

Los glucósidos cianogénicos (GC) toman un papel importante en el mecanismo de defensa de las plantas contra predadores herbívoros, y hongos en un proceso bioquímico denominado *cianogénesis* (Gleadow & Møller, 2014), proceso que abarca la síntesis de la molécula, su bioactivación y detoxificación (Pičmanová *et al.*, 2015). En la etapa de bioactivación, los GC son degradados

enzimáticamente al presentarse una disrupción del tejido epidérmico en la planta, promoviendo la liberación de cianuro de hidrógeno en el medio (McMahon *et al.*, 2022). Sin embargo, los GC también tienen como función secundaria ser aprovechados como fuente de carbono y nitrógeno para la propia planta, así como involucrarse en la regulación del crecimiento al actuar de moduladores de señalización celular. (Morant *et al.*, 2008; Wink, 2010).

Desde el punto de vista toxicológico, la exposición a cianuro por fuentes naturales como lo son los alimentos a ciertos niveles de concentración produce intoxicación crónica en humanos y animales. En los últimos años ha aumentado el interés de emplear partes de algunas plantas con potencial nutricional pero que pueden contener otros compuestos tóxicos (Díaz & López, 2021).

Un caso particular lo constituye las hojas de la yuca, las cuales se caracterizan por tener un alto contenido nutricional, pero a su vez alto contenido de cianuro (Gómez & Valdivieso, 1985). Para poder alcanzar su potencial y llegar al consumo humano, se requiere preliminarmente conocer el contenido de cianuro en hojas de yuca de diferentes variedades colombianas. Esto implica disponer de un método analítico validado y estandarizado para así posteriormente determinar los contenidos de cianuro en diferentes variedades para determinar cuál de ellas contiene el menor contenido de cianuro (Latif *et al.*, 2019). Así mismo es importante determinar un tratamiento que contribuya a reducir o eliminar el cianuro pero que conserve las propiedades nutricionales. Esta información podrá incorporar las hojas de yuca en diferentes preparados alimenticios.

Por otro lado, la intoxicación por alimentos que contienen glucósidos cianogénicos es una problemática que ha llamado la atención en diversos campos de estudio, principalmente a las ciencias de la salud, la industria agrícola y ganadera. Estos compuestos, se descomponen por medio de reacciones enzimáticas, de tal modo que liberan cianuro de hidrógeno al medio; usualmente como mecanismo de defensa en las plantas.

Además, los casos más relevantes por intoxicación con GC en alimentos se presentan en la ingestión de yuca (*Manihot esculenta*) preparada inadecuadamente antes de su consumo principalmente en África, algunas regiones de Asia y América Latina (Rivadeneira-Domínguez *et al.*, 2019; Yeoh *et al.*, 1998). El consumo frecuente de alimentos que contienen glucósidos de carácter cianogénico conlleva a una intoxicación crónica por exceso de cianuro, o tiocianato producido como medida del metabolismo por transformar el cianuro de hidrógeno liberado por la degradación enzimática de las cianohidrinan remanentes en el organismo.

Se sabe que tradicionalmente, de la yuca se consume la raíz, la cual provee calorías, pero muy baja contribución nutricional. Por otro lado, las hojas de yuca contienen un alto valor nutricional y a su vez un alto contenido de cianuro. En yuca existe una amplia diversidad genética, en la cual podrían encontrarse variedades con bajo contenido de cianuro que podrían emplearse ya sea para consumo directo o para programas de mejoramiento (Díaz & López, 2021).

1. Justificación

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la yuca ocupa el quinto lugar en los alimentos que más se producen en nuestro país, después de la caña panelera, el plátano, la papa y el arroz. En Colombia se cultiva yuca en los 32 departamentos, principalmente en la Costa Atlántica, los Llanos y el Cauca (Minagricultura, 2021).

Así mismo, en Colombia se cultivan diferentes variedades de yuca. Sin embargo, la producción comercial se divide en dos grandes grupos: yuca dulce, usada primordialmente en consumo humano, y yuca industrial o amarga usada en harinas, empaques, entre otros. Esta clasificación obedece al contenido de cianuro en las raíces, siendo más bajo en las primeras y alto en las segundas.

La yuca ha constituido la base de la alimentación de las poblaciones indígenas nativas del continente, y en nuestro país la producción en departamentos como Vichada, Guaviare, Guainía y Amazonas se da predominantemente en cultivos de tras patio y subsistencia. En estas comunidades predomina el cultivo de la yuca amarga, en el cual a través de diferentes preparaciones tradicionales se elimina en un alto porcentaje ese contenido de cianuro.

También, la producción de la yuca en los últimos 5 años en Colombia ha aumentado de 1 842 111 toneladas a 2 443 312 lo cual lo hace interesante para que desde la investigación se aporte en mejorar su aprovechamiento (Parra, 2019).

Como se mencionó anteriormente, la yuca es un cultivo ampliamente aceptado en varias de las regiones de Colombia donde se ha identificado problemas de hambre y malnutrición. Si bien la raíz de yuca con su alto contenido de almidón provee una cantidad importante de las calorías necesarias para la población, su valor nutricional es muy bajo (Díaz & López, 2021). Paradójicamente, las hojas de la planta poseen altos valores nutricionales (proteína, minerales y vitaminas) (Gómez &

Valdivieso, 1985) , pero por su alto contenido de cianuro pueden ser tóxicos para los consumidores, no son consumidas y por tanto representan un producto de desecho.

Las hojas de esta euforbiácea son consumidas principalmente en la dieta de comunidades indígenas provenientes de Brasil y Nueva Zelanda de manera ocasional, pero su mayor consumo se centra en África y Asia donde es común la ingesta de este alimento como ingrediente para la preparación de diversos platos (Díaz & López, 2021). En países como Burundi, Malasia, Nigeria, Tanzania, Zimbabue, Mozambique y La República Centroafricana, las hojas de yuca se emplean como vegetal en la comida de manera similar a la espinaca por su textura y sabor, siendo el ingrediente principal de un plato denominado *Sakasaka* (Latif & Müller, 2015), por lo que se considera un ingrediente de agrado para la población, de manera que aproximadamente el 60% de los países de África que se sitúan en la región etiópica o afrotropical, así como parte del Sudeste Asiático (Filipinas, Malasia e Indonesia) aprovechan la raíz y las hojas de la yuca como un producto de grado alimenticio (Díaz & López, 2021).

Con este proyecto de investigación se pretende aportar información acerca del contenido de cianuro en las hojas de diferentes variedades de yuca en Colombia. Para ello se requiere inicialmente seleccionar un método analítico que permita cuantificar el cianuro en las hojas y establecer un método eficiente de reducción y/o eliminación de cianuro.

Con los resultados obtenidos, en un futuro cercano se podrán generar alternativas de eliminación de este tóxico y a su vez aprovechar el potencial que tienen las hojas de yuca como una alternativa nutricional y así, aportar a la solución del problema de hambre y malnutrición en diferentes comunidades.

2. Antecedentes

2.1. Exposición de cianuro por el consumo de yuca

Partiendo de la problemática nutricional que presenta el consumo de partes de la yuca en el mundo por su contenido en cianuro, principalmente por una alimentación basada en derivados de la raíz, es importante resaltar algunos aportes de la literatura científica que han podido identificar diferentes afectaciones a nivel toxicológico por la exposición de ácido cianhídrico desde una perspectiva alimentaria.

En 2004, Llorens muestra de manera clara la importancia socioeconómica de la yuca a nivel global y como la situación en las regiones más afectadas por las condiciones ambientales influyen la calidad y a su vez el consumo de esta planta como alimento, haciendo hincapié sobre la implementación de las hojas como alimento y el pobre contenido proteico de las raíces. De igual forma denota la preferencia de variedades con mayor toxicidad en relación por su sabor amargo, por la versatilidad de la manutención de los cultivos aprovechando la bioquímica implícita de la planta como mecanismo de defensa contra las plagas e inclusive como un posible conservante natural que proporciona el mismo alimento para prolongar su vida útil. Asociando la presencia de cianuro con el consumo frecuente de yuca por diferentes situaciones socioeconómicas y culturales, el autor denota las posibles causas de enfermedades de tipo neurodegenerativo y alteraciones en la glándula tiroidea frente a la crisis alimentaria que se da principalmente en África por cuestiones de fuertes sequías (Nzwalo & Cliff, 2011).

Desde el punto de vista toxicológico global del cianuro, Ramírez en el 2011 realizó una investigación bibliográfica acerca de la toxicocinética y toxicodinamia del cianuro especificando las diferentes afectaciones que pueden presentarse dependiendo de la vía de exposición para animales y en el ser humano. En esta revisión el autor menciona la intoxicación por consumo de yuca como una intoxicación de tipo crónico, donde se ha demostrado mediante ensayos de dosis-efecto en ratas empleando dosis no letales de cianuro de potasio durante 11 meses retardo en el crecimiento y

degeneración primaria en la mielina de la médula espinal, lo que podría explicar la aparición de enfermedades neuromotoras como la neuropatía atáxica tropical y el konzo. De la misma manera resalta que durante los primeros 4 meses de observación se disminuyeron los niveles de tiroxina en plasma, causando afectaciones en la glándula tiroides fomentando a la aparición de hipotiroidismo, bocio y problemas de crecimiento en niños. Es así como el autor presenta en sus conclusiones la relación nutricional que tiene el consumo de la raíz por su nulo contenido proteico destacando la ausencia de vitamina B12 (hidroxocobalamina), riboflavina y otro tipo de proteínas que pueden aportar a la desintoxicación natural de cianuro en el organismo cuya ausencia potencia el efecto neurotóxico del agente antinutricional.

En años más próximos Rivadeneyra *et al.* (2019) evalúa mediante ensayos dosis-efecto en ratas Wistar la exposición de la acetona cianohidrina administrada vía interperitoneal siendo este un factor determinante para evitar la hidrólisis de este compuesto intermediario de la linamarina a la formación de ácido cianhídrico. En el estudio, el autor evidenció la aparición de daño hepático por la vacuolización de hepatocitos y en los riñones por la alteración en los glomérulos y degeneración grave de los túbulos renales. De igual forma se evidenció afectaciones en la actividad locomotora denotando que la intoxicación crónica por la ingesta de yuca puede repercutir no solo a nivel de la tiroides o por su efecto neurodegenerativo.

Por otro lado, Díaz & López. (2021) dan a conocer desde un ámbito cultural el uso de las hojas de yuca en la alimentación principalmente en Asia y en África en relación con su alto contenido nutricional principalmente en proteínas, pero resaltando su alta toxicidad aún mayor que en la raíz de la planta. Sin embargo, denotan como la variabilidad genética de diferentes especímenes, así como el propio metabolismo de la planta y los tratamientos a la que se someten los productos para su consumo pueden darle un valor agregado a las hojas para mitigar el impacto que tiene la desnutrición por las crisis alimentarias a nivel mundial. De manera similar Gómez *et al.* (2022), Gundersen *et al.* (2022) y Juma *et al.* (2022), han realizado investigaciones con el fin de eliminar los cianógenos de la yuca ya sea mediante la inactivación de los genes que expresan las enzimas partícipes en la síntesis de la linamarina o por tratamientos fisicoquímicos que buscan mantener el mayor porcentaje de proteína posible para darle un valor agregado como materia prima y así llegar a realizar una industria biosostenible.

2.2. Desarrollo del proyecto

Para el desarrollo del proyecto se destacaron los siguientes autores quienes investigaron en el procesamiento y manipulación de muestras de origen biológico para, aislar cuantificar, comparar, evaluar y obtener concentraciones de HCN de un tejido foliar o radicular de la planta *Manihot esculenta* como matriz de análisis. Varios de estos autores tienen relación en el desarrollo metodológico estandarizado para la cuantificación de CN en hojas de yuca mediante espectrofotometría UV-VIS.

En primera instancia el procedimiento cuenta con una extracción de las enzimas encargadas de degradar la molécula cianógena o generadora de cianuro (linamarina), con el fin de asegurar que al momento de cuantificar el cianuro se presente la mayor concentración del analito. Existen varias teorías sobre si extraer y aplicar enzima adicional sobre la muestra, ya que en general, el propio tejido posee cantidad suficiente de enzima, pero se discute su veracidad dependiendo del tratamiento que se le dé a la muestra (Arrázola, 2002).

En 1978 y 1979, Cooke desarrolló un procedimiento sencillo para la extracción y purificación de la enzima a partir de tejido radicular y foliar de la planta en la investigación denominada “*Enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (Manihot esculenta crantz)*” donde se asegura la conservación de la enzima por un periodo prolongado de tiempo (Cooke, 1978, 1979).

Posteriormente Ikediobi *et al.* (1980) se basan en la idea de Cooke para la obtención de enzima purificada en su trabajo “*A rapid an inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava and cassava products*” para el análisis de contenido de cianuro total en productos que contienen en gran porcentaje harina de yuca. Para ello realizaron reproducciones de la metodología propuesta por Cooke incluyendo variaciones con el propósito de asegurar un método con suficiente grado de sensibilidad, reproducibilidad y precisión que no sea costoso para el análisis de cianuro en muestras de tejido para diferentes partes de la planta *Manihot esculenta*.

En 1988 Eksittikul & Chulavatnatol, realizan una investigación similar cuya diferencia se basa en el uso de la corteza de la raíz y el peciolo foliar como matriz para extraer la enzima mediante electroforesis con el fin de evaluar la actividad enzimática de las enzimas encargadas de la

degradación de linamarina revisando similitudes y diferencias entre otras especies que comparten la misma molécula, tales como el trébol blanco (*Trifolium repens*) o el árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*) frente al comportamiento enzimático intrínseco.

Para el análisis de cianuro, tanto para ensayos cualitativos como cuantitativos, Essers *et al.* 1993, se basaron en el desarrollo comparativo de la metodología planteada por Cooke desde la extracción de la enzima en la raíz y su adición a el método colorimétrico y espectrofotométrico para análisis de cianuro frente al “método de destilación por vapor” cuya idea se basa en la autólisis de la enzima intrínseca de la muestra para luego analizar cuantitativamente el cianuro por titulaciones argentométricas.

En el artículo “*Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products an introduction of a new chromogen*” se efectúa la estandarización de la metodología para la cuantificación de cianuro en tejido foliar y radicular de yuca, por lo que es clave su seguimiento en este proyecto (Essers *et al.*, 1993).

Con el fin de complementar la cuantificación se toma en cuenta el método estandarizado por la Asociación de Salud Pública Americana (APHA) para cuantificación de cianuro por colorimetría y espectrofotometría (4500-CN⁻E) en el libro “*Standard Methods of the examination of water and wastewater*” (Baird *et al.*, 2017), donde se detalla información para entender el funcionamiento de la reacción colorimétrica y como esta puede afectar en las medidas para cuantificación de cianuro.

En los años recientes, Ospina *et al.* (2021) caracterizaron diferentes compuestos presentes en las hojas de la yuca de diferentes genotipos en Latinoamérica, entre ellos el cianuro donde revisan principalmente la correlación que puede tener con carotenoides y aminoácidos presentes.

Como pilar para la revisión de la eliminación de cianuro proveniente de las hojas de la yuca se procedió a revisar el artículo “*Processing techniques to reduce toxicity and antinutrients of cassava for uses as a staple food*” (Montagnac *et al.*, 2009) debido al nivel de detalle tomado en cuenta al comparar diferentes métodos de eliminación o remoción de los cianógenos y sus derivados en productos elaborados a partir de la raíz u hojas de la yuca.

3. Marco Teórico

3.1. Generalidades de la yuca (*Manihot esculenta*):

La yuca es una planta perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, caracterizada por la secreción de material lechoso al igual que otras especies de la familia como el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*) o el ricino (*Ricinus communis*). El nombre científico de la yuca se le atribuye a Heinrich von Crantz en 1766, pero fue hasta 1938 que el nombre de esta planta se clasificó como (*Manihot esculenta* Crantz) hasta hoy en día (Aristizábal & Sánchez, 2007).

Su origen proviene de la región amazónica, en América del Sur y es la única especie del género *Manihot*, que fundamenta importancia a nivel económico y agroindustrial. En Colombia, la yuca (*Manihot esculenta*), es el quinto bien agrícola más producido, seguido por la caña de azúcar, el plátano, la papa y el arroz (Parra Olarte, 2019).

3.1.1. Taxonomía y Botánica:

La yuca, como se ha mencionado, pertenece al género *Manihot* a la familia dicotiledónea *Euphorbiaceae*, donde por lo menos se encuentran alrededor de 300 géneros y 8000 especies como se presenta en la Tabla 3-1 (Lebot, 2008). Popularmente se le conoce como cassava, casabe, mandioca, tapioca, yuca o al igual que su género, *Manihot* (Marcía *et al.*, 2022; Villada, 2010) .

Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de la especie *Manihot esculenta* Crantz.

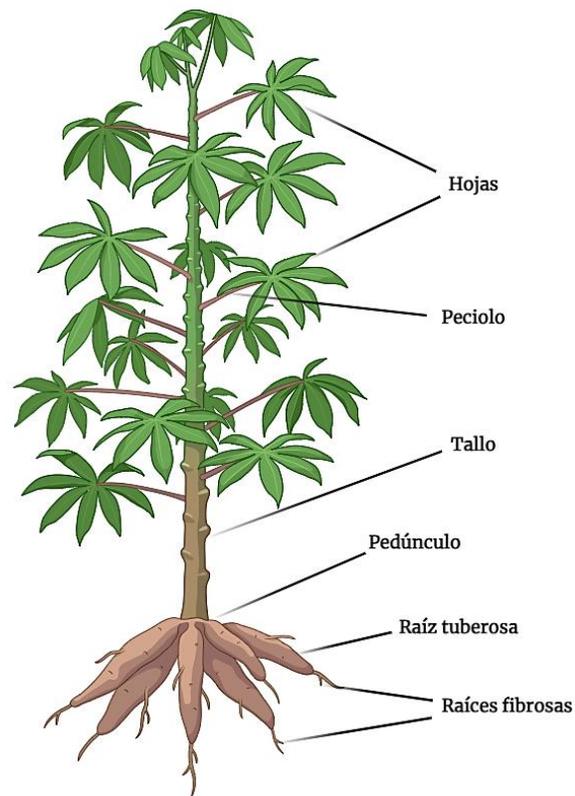
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Euphorbiales</i>
Familia	<i>Euphorbiaceae</i>
Subfamilia	<i>Crotonoideae</i>
Tribu	<i>Manihoteae</i>
Género	<i>Manihot</i>
Especie	<i>Manihot esculenta</i>

Fuente: Adaptado de (Hillocks & Thresh, 2002).

Morfológicamente se describe como una planta perenne monoica, es decir, que puede poseer flores masculinas y femeninas en un mismo tallo; es un arbusto con variaciones de altura entre 1 a 5m, pero no suele sobrepasar los 3m de altura (Ceballos & Ospina, 2003). Se caracteriza por la presencia de tallos semileñosos y por poseer ramas en el segmento medio y superior del tallo; las hojas suelen tener una coloración variable entre rojo, verde, púrpura cuya distribución puede ser uniforme o manchada (Aguilar *et al.*, 2017).

Su sistema radicular, tal como se presenta en la Figura 3-1, se conforma por raíces fibrosas y tuberosas, morfológicamente no existe diferencia en ellas, pero las raíces tuberosas aumentan su crecimiento radial debido al almacenamiento de almidón que eventualmente se acumula (Ceballos & Ospina, 2003).

En general, las raíces fibrosas cumplen el papel de absorber los nutrientes necesarios para la planta, mientras que las raíces tuberosas como se ha mencionado almacenan carbohidratos; estas raíces tuberosas son la parte más aprovechable de la planta a nivel agroalimentario y pueden pesar entre 1 a 8kg por unidad, llegando a alcanzar 1 metro de longitud. La coloración del parénquima interior o pulpa suele ser blanco o amarillo (Aguilar *et al.*, 2017).

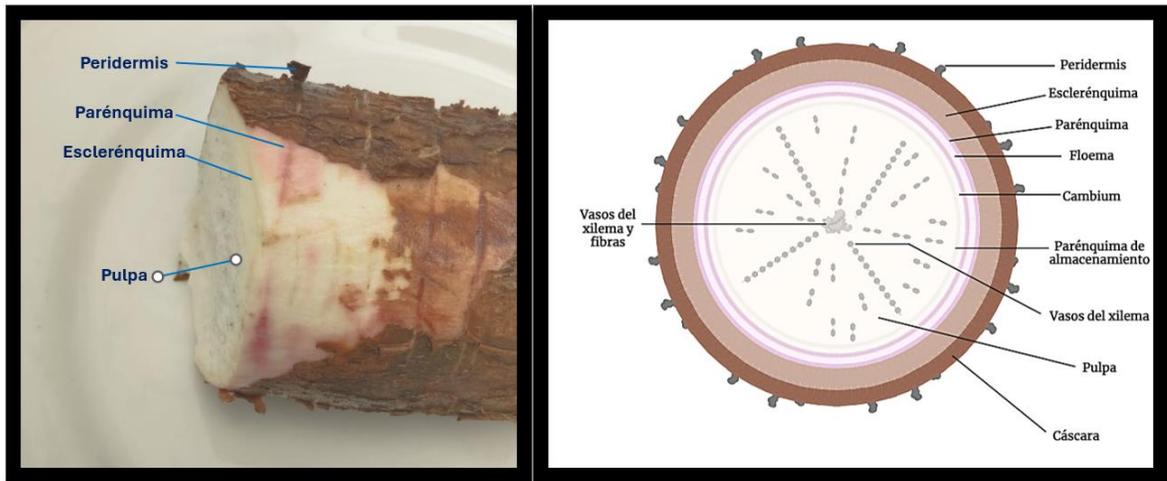
Figura 3-1: Morfología de la yuca (*Manihot esculenta*).

Fuente: Elaborado con BioRender.com. Adaptado de (Ceballos & Ospina, 2003).

Nota: Ilustración de los componentes morfológicos principales de la planta *Manihot esculenta* diferenciando las raíces del tallo y las hojas.

La raíz tuberosa, o a la “yuca”, como normalmente se denomina, se constituye histológicamente por tres tejidos representativos, esto puede observarse en la Figura 3-2. El periderma o cáscara, el parénquima cortical (corteza) y el parénquima interior o "pulpa" donde reside gran porcentaje de carbohidratos y agua principalmente (Villada, 2010) (Hinostroza *et al.*, 2014).

Figura 3-2: Morfología histológica general de la raíz tuberosa de *M. esculenta*.



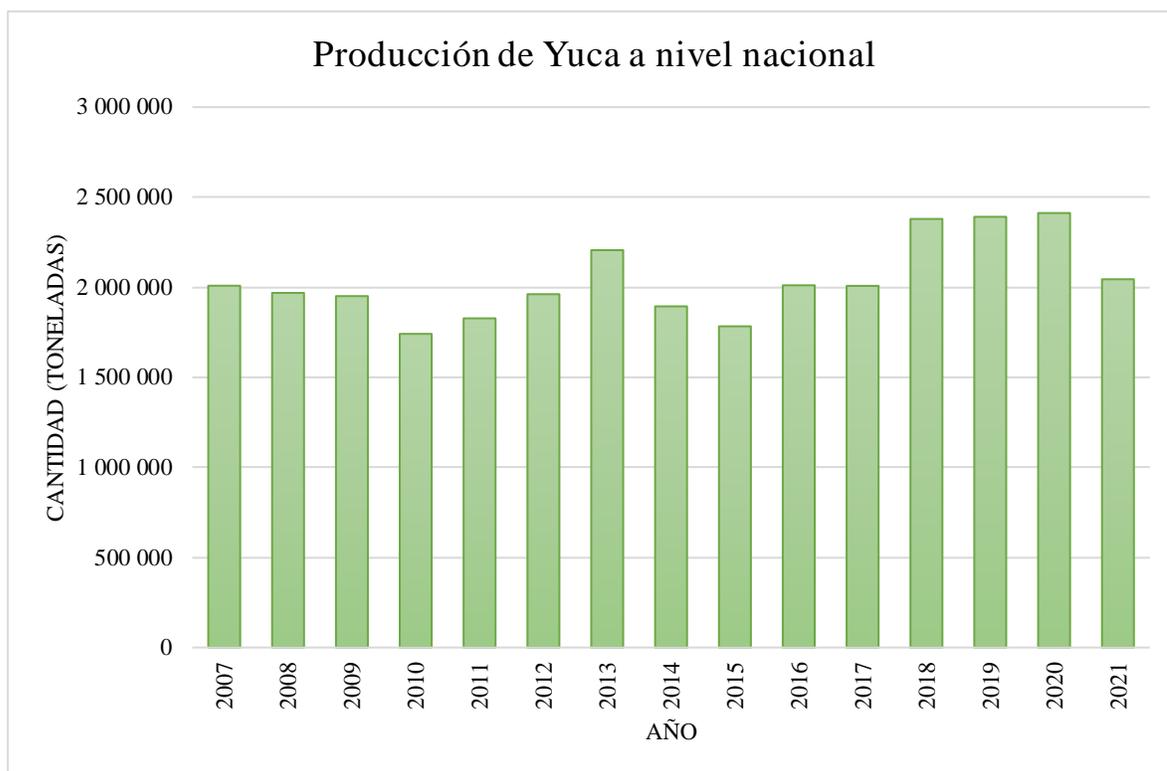
Fuente: Elaborado con BioRender.com. Adaptado de Ceballos & Ospina (2003).

Nota: Fotografía de la raíz tuberosa de una yuca evidenciando diferentes tejidos (izquierda), ilustración del corte transversal de una raíz tuberosa (derecha).

En cuanto a las hojas de la planta, el tamaño puede variar según las condiciones edafológicas y climáticas para cada variedad. No obstante, las hojas suelen ser más grandes entre los primeros 3 a 4 meses de vida que en su desarrollo posterior. Su coloración es dependiente de la variedad, pero a medida que crece puede cambiar; las hojas maduras tienden a ser moradas, o variar en tonos verdes oscuros y claros (Ceballos & Ospina, 2003).

3.1.2. Producción en Colombia

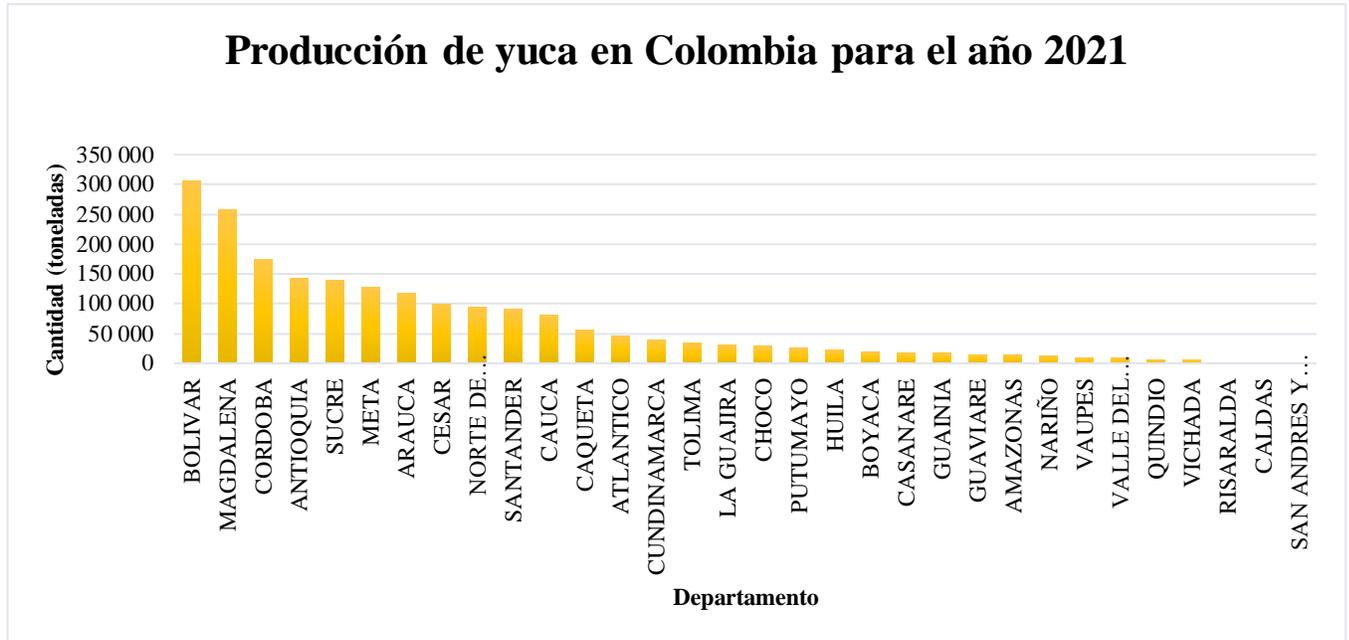
En Colombia la yuca es cultivada en 32 departamentos, pero sus productores más importantes se sitúan en la Costa Atlántica, los Llanos Orientales y el Cauca (Parra, 2019). Según datos del Ministerio de Agricultura, desde el año 2007 al 2021 en promedio se genera una producción anual de 2 039 107 toneladas de yuca en el país. A continuación, se ve reflejado en la Figura 3-3.

Figura 3-3: Producción anual de yuca en Colombia desde el 2007 al 2021.

Fuente: Tomado del Ministerio de Agricultura Nacional de Colombia 2021

Nota: Comportamiento anual de la producción de yuca a nivel nacional para el periodo comprendido entre el 2007 al 2021.

Como se observa en la Figura 3-4, a nivel departamental para el año 2021, el departamento de Bolívar fue el productor de yuca con mayor aporte (14.9%) seguido del Magdalena (12.6%), Córdoba (8.6%) y Antioquia (7.0%); otros departamentos aportan valores dentro del rango del 6.8% al 0.1% de producción sin considerar el departamento de Caldas y San Andrés y Providencia cuya producción fue menor a las 300 toneladas (Minagricultura, 2021).

Figura 3-4: Producción de yuca a nivel departamental en Colombia para el año 2021.

Fuente: Tomado del Ministerio de Agricultura Nacional de Colombia 2021

Nota: Comportamiento de la producción de yuca clasificado en los departamentos productores de Colombia.

La yuca al ser un alimento abundante en el país constituye la base de alimentación en poblaciones indígenas nativas, predominando en departamentos como Vichada, Guaviare, Guainía y Amazonas donde es un alimento tradicionalmente cultivado en chagras familiares (Minagricultura, 2021).

Adicionalmente, se han clasificado en dos tipos principales en el ámbito de producción masiva y comercial diferenciándolas por su calidad y coloración, la yuca dulce cuya asignación es para consumo humano, y la yuca amarga o industrial destinada a la producción de harina, almidón, plásticos y productos para alimentación animal (Minagricultura, 2021).

3.1.2.1. Composición nutricional

El principal interés como valor agregado en la producción y cultivo de la yuca se centra en sus raíces. Como se ha mencionado, la raíz es el principal órgano de almacenamiento de energía, cuya aplicación a nivel económico y nutricional se centra en la alimentación humana y animal, además de la extracción de almidón como el producto derivado más importante de las raíces (Ceballos & Ospina, 2003).

A continuación, se observa en la Tabla 3-2 la composición química de la harina en paralelo a la inclusión de la cáscara o sin esta.

Tabla 3-2: Composición nutricional básica de la harina de yuca.

Componentes	Contenidos (%)	
	Raíz con cáscara	Raíz sin cáscara
Materia seca	100.00	100.00
Carbohidratos disponibles	83.80	92.40
Proteína cruda	3.05	1.58
Extracto etéreo	1.04	0.88
Ceniza	2.45	2.00
Fibra detergente neutra	6.01	3.40
Fibra detergente ácida	4.85	1.95
Hemicelulosa	1.16	1.45

Fuente: Adaptado de Rodas (2000).

Nota: Contenido nutricional general de harina de yuca elaborada a partir de la raíz tuberosa.

Recientemente, se han realizado investigaciones que se centran en la utilización de las hojas como una fuente nutricional importante, ya que tienen gran contenido proteico además de presentar una cantidad importante de ciertos minerales. En la Tabla 3-3 se puede observar a detalle la composición nutricional de las hojas de la yuca.

Tabla 3-3: Composición nutricional de las hojas de la yuca.

Componentes		Contenido	
		Hojas	Extracto foliar
Hierro	mg/kg	174.49	369.03
Zinc	mg/kg	84.08	110.65
Nitrógeno	g/kg	55.12	65.31
Proteína soluble	g/kg	65.26	34.23
Triptófano	%	0.198	0.142
All-trans-β-caroteno	mg/kg	363.73	622.26
Materia seca	%	31.18	31.07

Fuente: Adaptado de Sayda Milena Pico *et al.* (2011).

Nota: Contenido nutricional resumido de los principales minerales, contenido proteico y otras sustancias como antioxidantes encontrados en las hojas de la yuca

Normalmente la población humana consume las raíces de yuca como fuente principal de carbohidratos por su alto contenido en almidón, siendo un alimento netamente energético representativo en la dieta por dicho fin, pero a nivel proteico las raíces no aportan un valor proteico relevante, por ello, las hojas sustentan una buena fuente de alimentación siendo el principal componente de la planta en cuanto a proteínas aportadas y aminoácidos esenciales (Díaz & López, 2021).

3.1.2.2. Principios antinutricionales

El grupo de antinutrientes más conocidos en la yuca son los cianógenos, que se acumulan principalmente en las raíces y las hojas. Estos cianógenos, la linamarina y la lotaustralina son moléculas conocidas por liberar ácido cianhídrico mediante degradación enzimática (Rodas, 2000). La producción de estas moléculas, principalmente de linamarina, puede abarcar el 95 al 99% de cianógenos en la planta y se encuentra en concentraciones altas en la cáscara de la raíz (Ogbonna *et al.*, 2021). Usualmente la clasificación de yuca dulce o yuca amarga se da por la concentración que una raíz pueda contener cianógeno caracterizándose por presentar un sabor más amargo en

concentraciones elevadas de cianuro. Se estima que en Colombia una raíz puede contener desde 20 mg hasta 1000 mg de ácido cianhídrico por kilogramo de raíz, aunque no necesariamente su sabor sea un indicativo preciso en relación con la concentración de cianuro que pueda contener este alimento. (Ceballos & Ospina, 2003; Rodas, 2000).

Es común encontrar un alto contenido de HCN en variedades de mayor circulación que las variedades que tienen menor toxicidad a nivel mundial, por ello se ha buscado implementar un mejoramiento genético para así reducir el potencial cianogénico que tiene tan caracterizado la yuca (M. A. Ospina *et al.*, 2021). Ospina (2018) a nivel nacional identificó que las variedades genotípicamente más propensas a desarrollar un mayor contenido de cianuro en raíces y hojas se presentan en la región amazónica del país y parte del Caribe, mientras que en la región central de Colombia se evidenciaron genotipos con una concentración baja del tóxico.

A pesar de que las hojas son potencialmente beneficiosas como alimento rico en nutrientes, el ácido cianhídrico representa un problema para su consumo, al igual que en la raíz, las hojas pueden presentar concentraciones importantes de HCN y una actividad enzimática mayor que puede favorecer a la síntesis total de los cianógenos. Se estima que las hojas pueden contener de 5 a 20 veces más cianuro proveniente de la linamarina (glucósido cianogénico) que en la raíz siendo así de mayor concentración en hojas jóvenes que en hojas maduras (Díaz & López, 2021).

Otros antinutrientes encontrados en las hojas son los oxalatos, los fitatos y los taninos formados por sus respectivos ácidos orgánicos (ácido oxálico, fítico y tánico), compuestos característicos por intervenir en la correcta absorción de nutrientes en un organismo (Latif & Müller, 2015; Montagnac *et al.*, 2009).

En cuanto a los oxalatos, su formación depende netamente de la biodisponibilidad de calcio y magnesio, por lo que conlleva la disminución de la absorción de estos nutrientes y la creación de sales muy insolubles (oxalato de calcio o magnesio) en forma de cristales. Los oxalatos de calcio pueden formar cálculos renales y ser potencialmente dañinos para estos órganos (Montagnac *et al.*, 2009). Respecto a su contenido en las hojas no se le considera un potencial problema puesto a que el contenido de oxalato en proporción a la absorción de calcio es menor al límite crítico de la absorción de calcio en el organismo (Latif & Müller, 2015).

Los fitatos tienen una afinidad especial con el zinc, el hierro y otros metales divalentes de importancia nutricional. Estos antinutrientes también pueden enlazarse con proteínas además de los

minerales ya mencionados, impidiendo que estos nutrientes se absorban (Montagnac *et al.*, 2009). De manera similar, los taninos son polifenoles que pueden intervenir con la correcta absorción de minerales y proteínas. En la yuca, tanto en la raíz como en las hojas se encuentran estas sustancias; en estas últimas, se encuentran la cianidina y la delphinidina, dos antocianinas cuyo principio antinutricional se enfoca en la disminución del contenido proteico biodisponible de la propia hoja una vez ingerida (Latif & Müller, 2015).

3.1.3.Perspectivas antropológicas y culturales en comunidades indígenas

Como es sabido, los orígenes de la planta como tal provienen del Amazonas, pero arqueológicamente existen evidencias sobre la presencia de cultivos en la costa peruana precolombina, así como en las regiones tropicales de Colombia y Venezuela donde se estima la difusión del cultivo de yuca desde la región amazónica por los Arawac (grupo étnico indígena cuya extensión abarca desde Centroamérica hasta Suramérica) (Casanto, 2001).

Es así como el cultivo de la planta se extiende por toda Latinoamérica. En Colombia, históricamente se ha cultivado con fuerza en la costa y la Región Andina a pesar de ser un alimento de menos importancia que el maíz y la papa. Caso contrario a lo que sucede en la región amazónica, donde su ingesta es de mayor frecuencia y el cultivar esta planta forma parte del patrimonio de los pueblos indígenas de la Amazonia (Arias *et al.*, 2005; Casanto, 2001).

Las comunidades indígenas de la Amazonia, al interactuar y sacar provecho de la yuca, han perfeccionado tecnologías para la conservación de este alimento, donde solo en esta región han obtenido un alto número de variedades llegando a tenerse más de 5000 variedades de *Manihot esculenta* de las cuales destacan varias propiedades morfológicas como el tamaño de toda la planta o el color de sus hojas, pero principalmente en el contenido de cianógenos donde se clasifican en yucas dulces y yucas amargas (Arias *et al.*, 2005).

Al presentarse variedades potencialmente venenosas, los pueblos indígenas aprovecharon sus propiedades para el control de enfermedades y plagas en otras variedades, ya que la yuca amarga suele tener mejor productividad cuando se cultiva y cosecha (Arias *et al.*, 2005). Este es el caso de la *manipueira* cuyo significado precisa como agua o leche de yuca el cual es un líquido lechoso obtenido al exprimir la raíz de la yuca después de haberse rallado. Es muy popular en la cocina y

medicina, principalmente para tratar inflamaciones, cefaleas y malestares estomacales. Sin embargo, se le ha reconocido como un fertilizante y plaguicida natural por su alto contenido en cianuro (Da Ponte, 2006).

3.2. Características de los glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos son un extenso grupo de metabolitos secundarios de origen vegetal. Químicamente se definen como compuestos derivados de α -hidroxinitrilos, conformados por una aglicona y un glúcido que le da estabilidad a la molécula (Bromer *et al.*, 1970; Poulton, 1990; Vetter, 2017; Wink, 2010). Estructuralmente el azúcar encontrado casi siempre se trata de una D- β -glucosa, unido por un enlace o- β -glucosídico a la aglicona que define la totalidad de la molécula. Sin embargo, existen casos donde la naturaleza del azúcar varía (Arrázola *et al.*, 2013; Conn, 1980; Gleadow *et al.*, 2011). Los GC son reconocidos como fitoanticipinas, sustancias químicas de origen vegetal con propiedades antimicrobianas (Zagrobelny *et al.*, 2004; Zuk *et al.*, 2020) y fitotoxinas solubles en agua, cuyo rol consiste en la liberación de cianuro de hidrógeno mediante degradación enzimática de la molécula (GC) hacia el medio exterior como mecanismo de defensa, regulación en la comunicación celular y el propio crecimiento de la planta utilizando las moléculas cianogénicas como fuente de nitrógeno reducido y glucosa para etapas de desarrollo específico. (Harenčár *et al.*, 2021).

3.2.1. Funciones

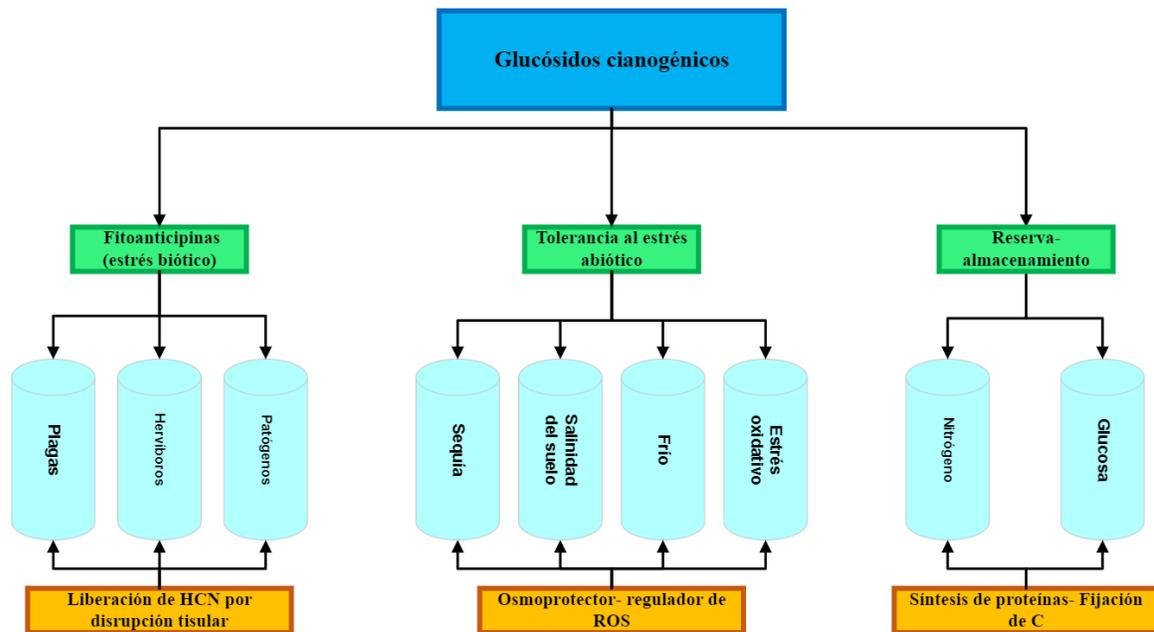
En general, como se ha explicado, los GC actúan principalmente como fitoanticipinas frente a situaciones de estrés generado por el daño tisular causado por herbívoros, afectaciones por hongos y otro tipo de patógenos o plagas (Sun *et al.*, 2018). Sin embargo, por su naturaleza como glúcido también tiene funciones importantes como osmoprotector en condiciones de estrés hídrico, evitando pérdidas importantes de agua para la planta. De igual forma se desempeñan como antioxidantes al recolectar el oxígeno reactivo previniendo un posible daño celular.

A pesar de tratarse de metabolitos secundarios, los GC pueden ser sintetizados en otras moléculas o ser utilizados como fuente de nutrientes que participan en el crecimiento de la planta; Los cianógenos pueden ser degradados *in situ* por la planta a través de reacciones hidrolíticas de manera similar como se da en cuestiones de defensa. El cianuro de hidrógeno producido, glucosa y demás compuestos como aldehídos o cetonas son almacenados, transformados o degradados para la

producción de proteínas como la asparagina, amoníaco o nitrógeno (McMahon *et al.*, 2022). Por otro lado los, GC pueden ser utilizados nuevamente como fuente de nitrógeno para regular la fijación de carbono en el proceso fotosintético de la planta (Schmidt *et al.*, 2018).

A continuación, en la Figura 3-5 se puede denotar las diferentes funciones que tienen los GC en respuesta a diferentes condiciones de estrés.

Figura 3-5: Funciones de los glucósidos cianogénicos en plantas vasculares.



Fuente: Adaptado y modificado de Sun *et al.* (2018).

Nota: Clasificación de las funciones que tienen los GC en relación con el metabolismo propio de las plantas vasculares, así como su regulación provocada por factores de estrés de tipo biótico y abiótico.

3.3. Metabolismo en las plantas

Subsecuentemente se describe a detalle las fases por las que las plantas sintetizan, liberan y reutilizan los glucósidos cianogénicos, así como su localización en el tejido vegetal; estas fases se conocen como el proceso completo de cianogénesis: biosíntesis, bioactivación y detoxificación de la planta hacia la fitotoxina liberada o no.

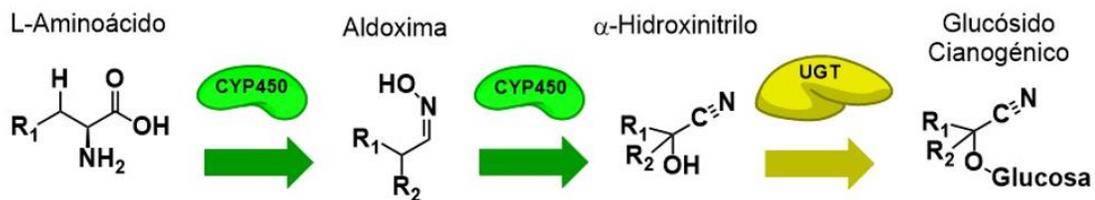
3.3.1. Biosíntesis

Todos los GC que se han identificado en la última década provienen de aminoácidos de tipo aromático o alifático (L-valina , L -isoleucina, L -Leucina, L -fenilalanina y L -tirosina) (Wink, 2010)

y de algunos aminoácidos de naturaleza no proteica tal como la 2-(2'-ciclopentenil)-glicina y (2S,1'S,2'S)-2-2(2'-hidroxi-3'-ciclopentenil)-glicina (Gleadow & Møller, 2014). Como se ha mencionado antes, la formación de los GC consta de un azúcar, generalmente un monosacárido o un disacárido junto con un hidroxinitrilo aromático o alifático (aglicona), dependiendo del aminoácido precursor partícipe y de las enzimas que interceden en la reacción (del Cueto *et al.*, 2018).

El proceso anabólico de biosíntesis se puede clasificar en tres etapas; en las primeras dos etapas, el aminoácido precursor se ve catalizado por enzimas citocromo P450 (CYP450) mientras que en la última etapa participa una UDPG-glucotransferasa (UGT) (Thodberg *et al.*, 2020). En las dos primeras etapas ocurre una N-hidroxilación del aminoácido, mediante descarboxilación y deshidratación del aminoácido transformándolo en una aldoxima. En la segunda etapa, la enzima CYP450 favorece a la conversión de la aldoxima en un α -hidroxinitrilo a través de una deshidratación inicial que forma un nitrilo llevado a hidroxilación del carbono alfa, que permitirá la generación de una cianohidrina; finalmente la síntesis de los GC concluye con la glicosilación de la cianohidrina catalizada por la enzima UGT (Kotopka & Smolke, 2019; Zagrobelny *et al.*, 2004; Zagrobelny & Møller, 2011). En la Figura 3-6 se puede detallar este proceso.

Figura 3-6: Biosíntesis de los glucósidos cianogénicos.



Fuente: Elaborado mediante ChemDraw® Professional. Adaptado y modificado de Vetter (2017).

Nota: Reacción de síntesis general para la formación de un GC partiendo desde un aminoácido precursor.

En la biosíntesis de la amigdalina y la prunasina, glucósidos cianogénicos cuyo precursor es la fenilalanina, el aminoácido será N-hidroxilado y transformado en prunasina por los citocromos CYP79, CYP71 y una UGT. La amigdalina es sintetizada por la participación de una segunda UGT en la biosíntesis de la fenilalanina (del Cueto *et al.*, 2018). Por otro lado, la síntesis de la durrina, CG característico del sorgo, es obtenido por la síntesis de la tirosina mediante la enzima CYP79A1, CYP71E1 y la UGT85B1. Otros GC derivados de la tirosina como la trigloquinina y la taxifilina, se sintetizan de manera similar a excepción de la segunda fase donde participan las CYP79E1 y la CYP79E2 (Bjarnholt & Møller, 2008).

3.3.2. Bioactivación por hidrólisis enzimática

La bioactivación de los GC corresponde al proceso catabólico que se activa cuando un tejido específico de la planta se ve físicamente afectado, lo que conlleva a la exposición de estas moléculas a unas enzimas degradativas designadas como “emulsinas” (Arrázola *et al.*, 2012; Bromer *et al.*, 1970), encargadas de descomponer mediante hidrólisis enzimática los GC hasta el punto de producir ácido cianhídrico y un compuesto orgánico, usualmente un aldehído o una cetona (Zagrobelny *et al.*, 2018); dichas enzimas, las β -glucosidasas y las α -hidroxinitriloliasas, tienen un papel fundamental en los procesos catabólicos de las plantas (Ganjewala *et al.*, 2010).

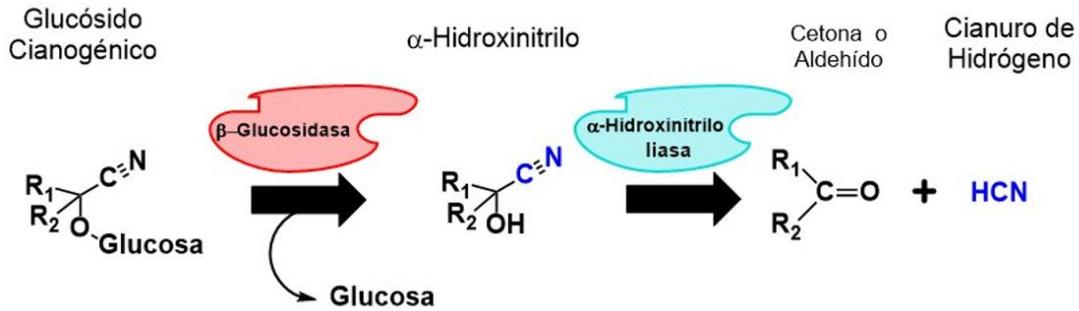
El término cianogénesis (a pesar de referirse al proceso metabólico completo) viene de la liberación de cianuro de hidrógeno a partir de una molécula que de por sí, no presenta un grado de toxicidad alguno; no obstante, las concentraciones que emite por bioactivación sí son perjudiciales para un organismo cuyo metabolismo respiratorio sea aerobio. La reacción de hidrólisis enzimática de los GC depende principalmente del pH en el que se encuentre, a condiciones normales, la cianogénesis ocurre en un pH ligeramente ácido (5.5-6) (Vetter, 2017).

El proceso catabólico se divide en dos fases o reacciones, como se muestra en la Figura 3-7, en la primera fase interviene la enzima β -glucosidasa con el fin de romper el enlace glucosídico que une la cianohidrina con el glúcido, esta acción provoca que la aglicona pierda estabilidad y sea más susceptible a descomponerse. Una vez el glúcido sea separado de la cianohidrina, la enzima α -hidroxinitriloliasa, o liasa de α -hidroxinitrilo separa el ácido cianhídrico de la cianohidrina, convirtiendo dicha molécula en una cetona o un aldehído (Halter *et al.*, 2013; Kongsawadworakul *et al.*, 2009). Cabe resaltar que a diferencia del proceso de biosíntesis, las enzimas que participan en el catabolismo o en la cianogénesis suelen ser las mismas según el género, la familia y la especie (Zagrobelny *et al.*, 2008).

Según sea la molécula que se bioactive, las emulsinas llevan el nombre proveniente del GC específico. En el caso de la amigdalina, cuya degradación enzimática conlleva a la generación de una molécula de prunasina y una glucosa mediante una β -D-glucosidasa (amigdalasa), donde la prunasina será separada de su molécula de glucosa para formar benzaldehído y ácido cianhídrico (HCN) de la cianohidrina correspondiente (mandelonitrilo). Así como la linamarina GC reconocido por encontrarse en la linaza, o la yuca (*Manihot esculenta Crantz*), se descompone en glucosa y acetona cianohidrina por acción de la β -D-glucosidasa (linamarasa), donde finalmente la liasa

permitirá la formación de una molécula de acetona y HCN (Chaouali *et al.*, 2013; Conn *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 2020).

Figura 3-7: Bioactivación de los glucósidos cianogénicos.



Fuente: Elaborado mediante ChemDraw® Professional. Adaptado y modificado de Vetter (2017).

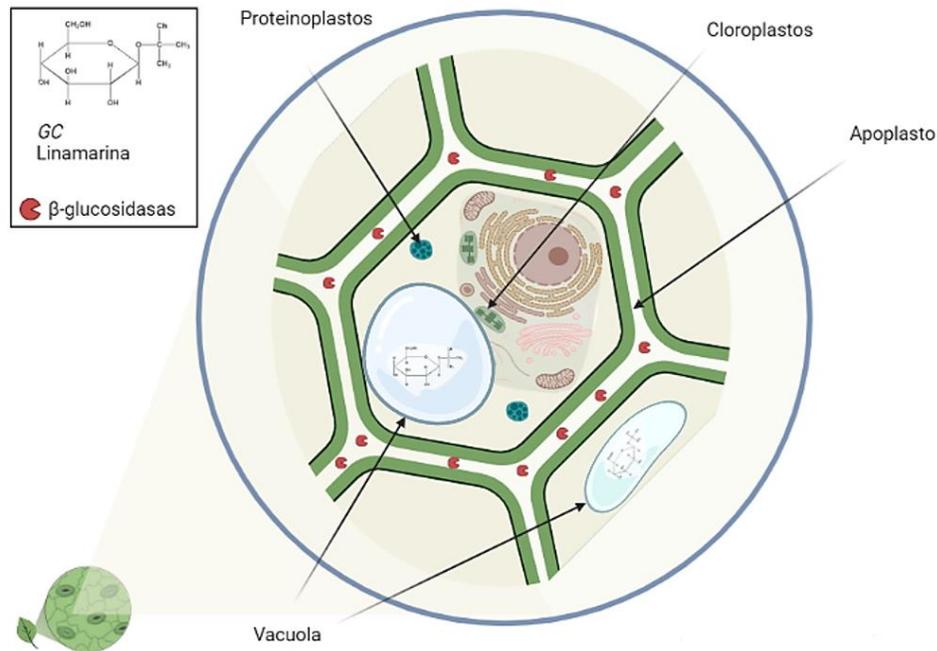
Nota: Reacción de hidrólisis enzimática general para la degradación de un GC en una cetona o aldehído y cianuro de hidrógeno también conocida como cianogénesis.

3.3.3. Localización

Los GC se forman en el citoplasma celular y son almacenados en la vacuola central. Sin embargo, las enzimas encargadas de la bioactivación se encuentran en tejidos adyacentes cercanos a los tejidos epidérmicos donde la planta tiene mayor exposición a daños por perforación, o disrupción de tejidos por interacciones con insectos o algunos microorganismos que busquen como fuente alimenticia dicho tejido (Wink, 2010).

La compartimentalización de las enzimas iniciadoras (β -glucosidasas) puede variar según si la planta es monocotiledónea o eudicotiledónea. En las plantas eudicotiledóneas las glucosidasas son proteínas almacenadas de manera intracelular en los cuerpos proteicos y de forma extracelular en el apoplasto, conocido por ser el espacio extracelular donde circula el agua y los nutrientes. Por otro lado, en las plantas monocotiledóneas, las glucosidasas no son glicosiladas y son almacenadas en los plástidos celulares (Morant *et al.*, 2008). En la Figura 3-8 se ve ilustrada de manera sencilla esta estructura.

Figura 3-8: Compartimentalización generalizada de los glucósidos cianogénicos en células vegetales.



Fuente: Elaborado con BioRender.com. Adaptado y modificado de Morant *et al.* (2008).

Nota: Localización de los GC y de las enzimas encargadas de efectuar la hidrólisis enzimática para su posterior degradación en cianuro, destacando la compartimentalización en las vacuolas centrales de las células de una planta vascular.

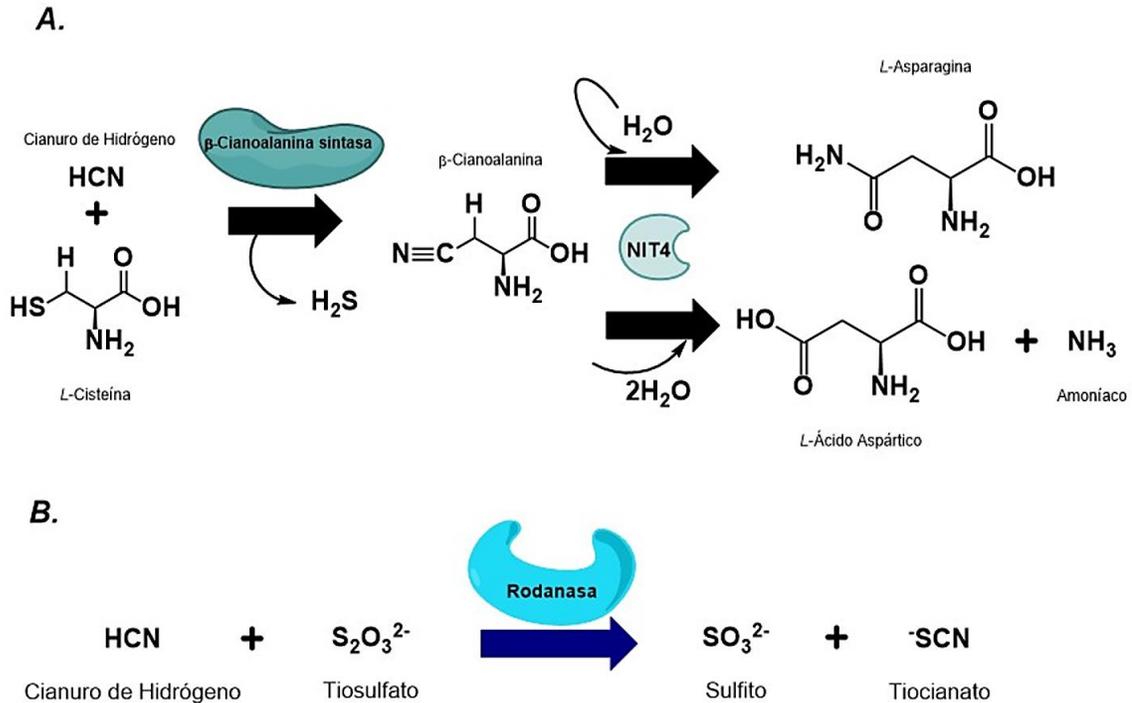
3.3.4. Detoxificación

El proceso de detoxificación forma parte de la ruta metabólica natural de la planta gracias a la intervención de nitrilasas, que permiten a la planta el tomar nitrógeno residual de los productos liberados en la bioactivación como fuente de nitrógeno (del Cueto *et al.*, 2018).

La detoxificación consiste en dos rutas por separado. Como se puede observar en la Figura 3-9, la primera ruta se basa en la formación de β -cianoalanina desde la cisteína y el HCN, donde interviene la enzima β -cianoalanina sintasa; posteriormente, la β -cianoalanina es transformada en asparagina (Ganjewala kkk., 2010), ácido aspártico y amoníaco donde estos dos últimos compuestos se ven procesados por la acción de las nitrilasas (nitrilo hidratatas e hidrolasas) (Bjarnholt & Møller, 2008). La segunda ruta implica el metabolismo típico de detoxificación en vertebrados, convirtiendo el HCN por medio de la tiosulfato cianuro sulfotransferasa (rodanasa) en tiocianato, pero no se le

adjudica como una ruta de detoxificación común en las plantas (Ganjewala *et al.*, 2010; Zuk *et al.*, 2020)

Figura 3-9: Rutas de detoxificación de cianuro libre en animales y plantas.



Fuente: Elaborado mediante ChemDraw® Professional. Adaptado y modificado de Vetter (2017).
Nota: Reacciones metabólicas de detoxificación natural del HCN. Reacción **A** Ruta metabólica principal en plantas. Reacción **B** Ruta metabólica principal en animales (empleada de manera alternativa en plantas).

3.4. Linamarina

La linamarina es un glucósido cianogénico derivado de agliconas alifáticas saturadas, característica por ser la molécula representativa de la clasificación estructural que poseen los glucósidos cianogénicos. Fue aislada por primera vez por Jorissen y Hairs en 1891 (Bromer *et al.*, 1970) del lino (*Linum usitatissimum*) en condiciones cristalinas, quienes la describieron por “*Cristalizar en grupos de agujas incoloras que funden a 134°C, teniendo un sabor amargo y refrescante capaz de disolverse en agua*”(Dunstan *et al.*, 1906). Probablemente, la etimología del nombre proviene del

latín *Linum amarum* (lino o linaza amarga) dada a partir de la descripción dada por sus descubridores (Senning, 2007).

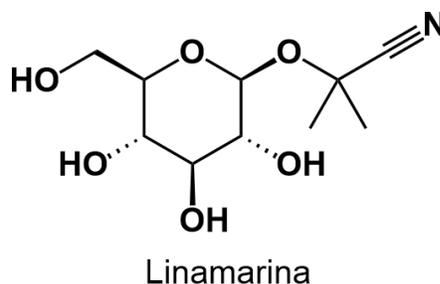
La linamarina tal vez sea una de las sustancias cianogénicas de origen vegetal más abundante en los alimentos, tales como la linaza (*Linum usitatissimum*), la yuca (*Manihot esculenta*) y algunas legumbres como el frijol (*Phaseous vulgaris*) o las habas (*Vicia faba*) (Dzombak *et al.*, 2005). También se le conoce como manihotoxina (refiriéndose a su origen en la planta *Manihot esculenta*) o faseolunatina (por encontrarse en el frijol *Phaseolus lunatus*) (Bromer *et al.*, 1970); sin embargo, estructuralmente es llamado α -hidroxisobutironitrilo β -D-glucopiranosido (Figura 3-10).

CAS-No: 554-35-8

Fórmula molecular: $C_{10}H_{17}NO_6$

Peso molecular: 247.25g/mol

Figura 3-10: Estructura molecular de la linamarina.



Fuente: Elaborado mediante ChemDraw® Professional.

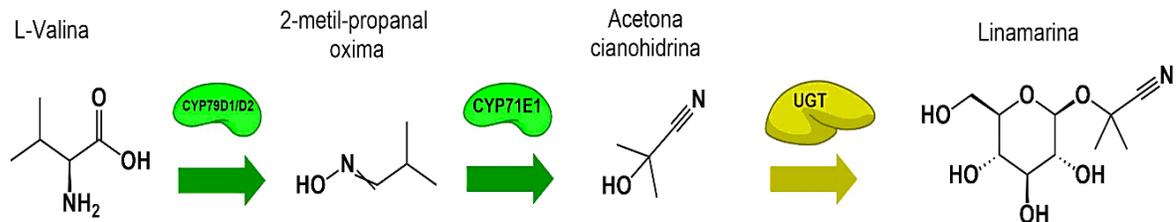
3.4.1. Biosíntesis y bioactivación en la yuca

La síntesis de la linamarina en la yuca inicia con la transformación de la valina (aminoácido precursor) en N-hidroxisovalina y posteriormente en 2-metil propanal oxima mediante hidroxilación y deshidratación catalizadas por las enzimas CYP79D1 y CYP79D2 (McMahon *et al.*, 2022).

Es común encontrar más de un tipo de GC en una especie. Se sabe que en la yuca hay dos tipos de glucósidos cianogénicos. La linamarina y la lotaustralina; sin embargo, la linamarina tiene predominancia debido a que estas dos enzimas mencionadas tienen mayor afinidad a la valina como sustrato, que a la isoleucina (aminoácido precursor de la lotaustralina) por lo que explica la generación tan diferente de linamarina en proporción a la generación de la lotaustralina en esta planta (McMahon *et al.*, 2022).

Luego de la primera transformación, la oxima resultante es convertida en acetona cianohidrina gracias a la enzima CYP71E7 donde finalmente se ve glicosilada por las enzimas UDP-glucosiltransferasas UGT85K4 y UGT85K5 sintetizando la linamarina -Figura 3-11- (Sun *et al.*, 2018).

Figura 3-11: Biosíntesis de la linamarina.

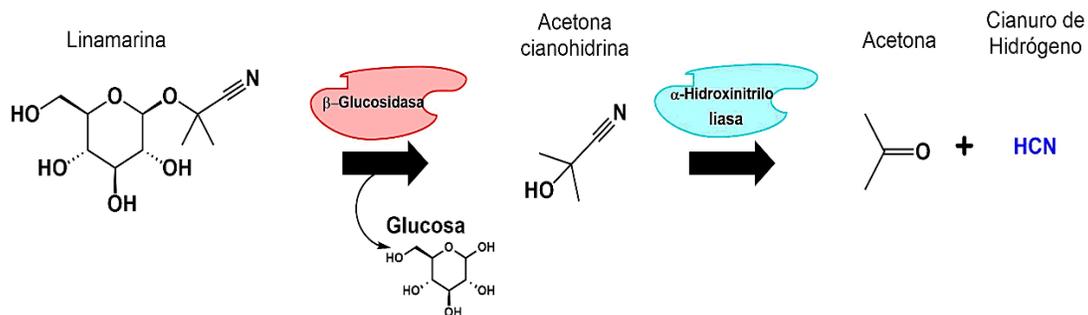


Fuente: Elaborado mediante ChemDraw® Professional. Adaptado y modificado de Vetter (2017).

Nota: Reacción de síntesis de la linamarina empleando como aminoácido precursor la L-Valina.

Finalmente, la linamarina que es producida principalmente en las hojas jóvenes y posiblemente en el meristema apical del tallo de la planta, es almacenada en las vacuolas o distribuida a través del tallo hacia las raíces donde el metabolito puede llegar a almacenarse o asimilarse por hidrólisis (Figura 3-12) o por las rutas metabólicas de detoxificación como fuentes nutricionales o compuestos partícipes en la síntesis de proteínas (Mcmahon *et al.*, 2022).

Figura 3-12: Bioactivación de la linamarina.



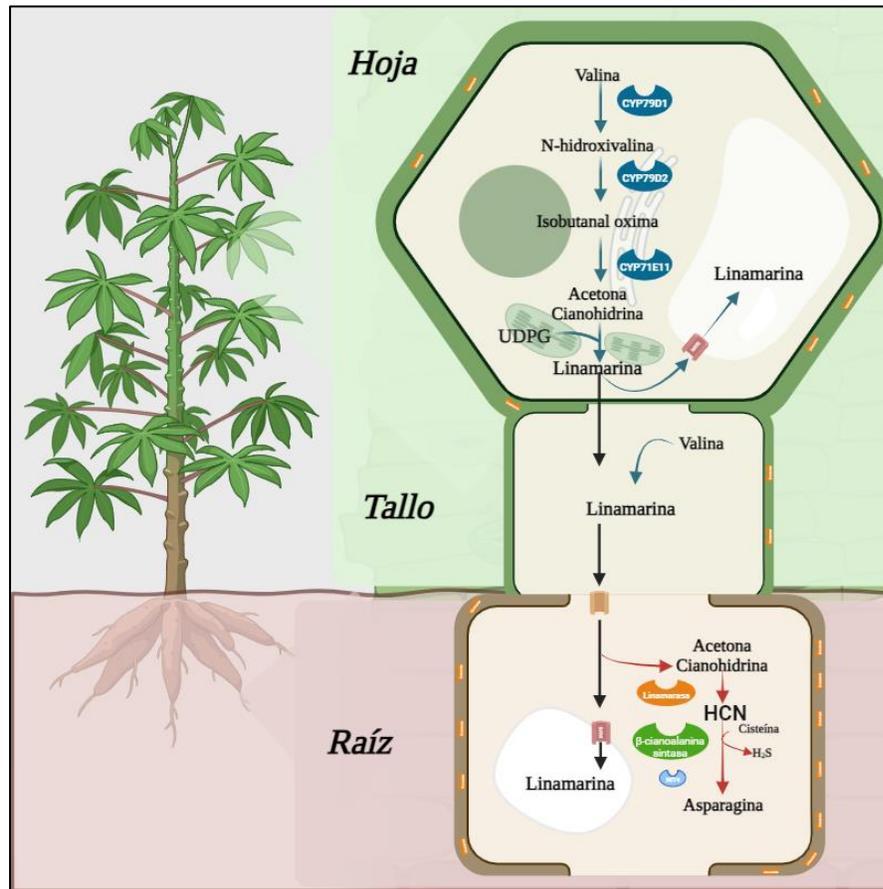
Fuente: Elaborado mediante ChemDraw® Professional. Adaptado y modificado de Vetter (2017).

Nota: Reacción de hidrólisis enzimática de la linamarina en una acetona y cianuro de hidrógeno.

Cabe resaltar, que la actividad enzimática de la linamarasa es mayor en las hojas donde se estima que es hasta 200 veces mayor la actividad enzimática que en la raíz, así como el potencial

cianogénico (contenido de cianuro capaz de liberarse) puede ser entre 5 a 20 veces mayor a comparación de la raíz (Latif & Müller, 2015). En la Figura 3-13 se denota el procedimiento de síntesis y degradación natural de la linamarina en la planta de manera simplificada.

Figura 3-13: Anabolismo y catabolismo general de la linamarina en la yuca.



Fuente: Elaborado con BioRender.com. Adaptado y modificado de McMahon *et al.* (2022)

Nota: En la ilustración se describe de manera simplificada la biosíntesis de la linamarina formada principalmente en las hojas jóvenes y parte del tallo, donde se almacena parcialmente en las hojas y se distribuye al tallo y a las raíces donde es metabolizada o almacenada.

3.4.2.Efectos adversos en la salud humana

La ingestión de GC por consumo de alimentos en humanos suele ser la principal causa de intoxicación de este tipo de moléculas, las semillas de frutas, hojas aromáticas empleadas como condimentos y colorantes e inclusive el alimento como tal. La intoxicación aguda del cianuro producido por GC se debe a la absorción, donde se verá efectuado el proceso de bioactivación de la molécula al entrar en contacto con el agua de las mucosas y la masticación, acción que rompe los tejidos permitiendo la interacción de las enzimas con los GC y liberando finalmente el HCN. El cianuro de hidrógeno generalmente no se absorbe antes de llegar al tracto gastrointestinal (Ramírez, 2011).

La absorción del cianuro depende de la fase en que se encuentra la sustancia, se presenta una mayor difusibilidad en fase gaseosa, pero también es importante tener en cuenta que la liposolubilidad, la constante de disociación y la concentración en el sitio de absorción son factores que modifican la velocidad de absorción; en el caso de ingestión por CG puede llegar a presentarse 12 horas después de la asimilación del agente (Quiroga, 2009).

El cianuro se distribuye una vez es absorbido a todo el organismo mediante la sangre de manera uniforme, sin embargo, además de la sangre, los niveles de concentración suelen ser más altos en el cerebro, hígado y pulmones (Quiroga, 2009). El cianuro naturalmente se ve metabolizado por su transformación a tiocianato mediante la enzima rodanasa o la 3-mercaptopiruvatosulfuro-transferasa, cuya vía principal de eliminación (en mamíferos) se ve reflejada por tiocianato como metabolito en la vía urinaria (Ramírez, 2011).

El efecto que puede tener el cianuro en el organismo puede variar según la dosis ingerida. La toxicidad aguda de los CG depende de la liberación de iones cianuro o ácido cianhídrico que presentará una subsecuente absorción. La toxicidad aguda se caracteriza por presentar síntomas de arritmia, ataxia, convulsiones, descenso en la tasa respiratoria e incluso la muerte (Schrenk *et al.*, 2019).

La intoxicación aguda ocurre cuando los niveles de cianuro exceden los límites de la detoxificación que el individuo puede soportar, principalmente en el intestino grueso y algunas zonas respiratorias (Nyirenda, 2020) donde la concentración de tiosulfato no es suficiente para la conversión de tiocianato por parte de las rodanasas. Gracias a esto, el CN⁻ causa un efecto adverso a nivel celular al bloquear el transporte de oxígeno en el complejo IV de la cadena transportadora de electrones por la inhibición de la enzima citocromo c-oxidasa (complejo IV), llevando a un estado de hipoxia y anoxia celular al organismo al cambiar su metabolismo respiratorio de aerobio a anaerobio (Deng *et al.*, 2021). A pesar de que el cianuro tiene una afectación tóxica en la respiración celular, se le

atribuye como órgano diana al sistema nervioso central y al sistema cardiovascular debido a su gran demanda energética para su correcto funcionamiento (Ramírez, 2011).

En ocasiones, han existido casos de intoxicación “subcrónica” por el consumo frecuente de alimentos no tratados, principalmente en variedades de yuca amarga bajo condiciones de desnutrición (Zhong *et al.*, 2021). El exceso de tiocianato producido desde la bioactivación de la linamarina por una dieta cuya frecuencia de ingestión de yuca, casabe o mandioca, produce una inhibición de la proteína transportadora de yodo hacia la glándula tiroides, incitando a la generación de hipotiroidismo, bocio y cretinismo (Rijssen *et al.*, 2013); es así como la aparición de frecuentes cantidades de tiocianato también puede llevar a manifestar enfermedades que afectan al sistema nervioso.

De este modo, la intoxicación ocasionada por el consumo de yuca con alto contenido en linamarina se da por un bajo contenido de proteínas y nutrientes en la dieta, principalmente en azufre debido a que puede presentarse una enfermedad neurológica caracterizada por la parálisis irreversible de las extremidades inferiores denominada *konzo* (Ogbonna *et al.*, 2021). Por otra parte, también se puede manifestar otra enfermedad crónica nerviosa denominada neuropatía atáxica tropical caracterizada por ser una enfermedad de desarrollo progresivo con la aparición de síntomas tales como mielopatía, polineuropatía, parestesias, pérdida sensorial de la columna, atrofia óptica bilateral y sordera sensitivoneural bilateral.” (Llorens, 2004; Rivadeneyra-Domínguez *et al.*, 2019).

3.5. Métodos de cuantificación de cianuro

La cuantificación de cianuro proveniente de fuentes naturales como glucósidos cianogénicos puede determinarse de manera directa o indirecta. La manera directa se refiere a la extracción del glucósido en sí, del cual se puede medir la cantidad de cianuro que posee dicho glucósido. Al emplearse este método se busca mantener intacta la molécula para su posterior análisis, por lo que usualmente se procura emplear técnicas cromatográficas que permiten la cuantificación de la molécula deseada mediante un detector. Una de las mejores técnicas para la cuantificación de cianuro es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Por otro lado, existen métodos que se basan en la degradación del GC y buscan aislar el cianuro para su posterior cuantificación; a continuación, se muestran técnicas que permiten la recolección de cianuro de una muestra donde usualmente se cuantifica a través de técnicas espectrofotométricas o gravimetría.

3.5.1. Microdifusión de Conway

El método de microdifusión de Conway es utilizado para aislar sustancias volátiles y determinar su concentración de manera cuantitativa. Este método utiliza dos compartimentos herméticos, uno para la sustancia volátil y otro para la sustancia de fijación, con una corriente de gas que fluye desde el área de liberación hacia el área de fijación. Después de que los gases se ponen en contacto, se aísla la muestra para un análisis cuantitativo por método de titulación o técnicas espectrofotométricas. Es importante considerar factores ambientales, tiempo, dimensiones de los viales, reactivos a usar y agitación para realizar un análisis adecuado con esta técnica. La microdifusión de Conway se ha utilizado recientemente para determinar la concentración de alcohol en la sangre y la orina, así como en análisis criminalísticos, también se ha utilizado para determinar la concentración de nitrógeno, dióxido de carbono y cianuro. Es uno de los métodos más económicos para análisis químicos cuantitativos y cualitativos (Brimer *et al.*, 1998).

En este caso el analito deseado es el cianuro, quien es captado cuando se volatiliza mediante una base como el hidróxido de sodio o potasio como agente fijador, formando una solución acuosa que permitirá realizar análisis reconocidos específicamente con cianuro, como titulaciones argentométricas o una técnica colorimétrica seguida de espectrofotometría (Arrázola, 2002).

3.5.2. Argentometría

La argentometría es una técnica analítica que se utiliza para cuantificar la concentración de una sustancia que reacciona con iones de plata. En el caso específico de la cuantificación de cianuro, la argentometría se utiliza para determinar la cantidad de cianuro presente en una muestra mediante la reacción del cianuro con iones de plata para formar un complejo insoluble de cianuro de plata. La cantidad de cianuro presente en la muestra se puede calcular a partir de la cantidad de iones de plata consumidos en la reacción. La argentometría es un método útil para la cuantificación de cianuro, ya que la formación del complejo de cianuro de plata es específica para el cianuro y no se ve afectada por la presencia de otros compuestos.

El método de Liebig-Denigès (LD) es una versión mejorada del método original propuesto por Justus Liebig en 1851. El método se basa en una titulación que utiliza nitrato de plata e ioduro de potasio en medio amoniacal. El cianuro de la muestra reacciona con el nitrato de plata para formar el ion dicianoargentato. Una vez que las proporciones estequiométricas del ion plata se completan, el

exceso de iones plata forma una sal muy insoluble llamada dicianoargentato (I) de plata. El método modificado por Denigès permite una correcta formación del dicianoargentato de plata al realizar el proceso en un medio amoniacal evitando la precipitación de cianuro de plata y la formación prematura del dicianoargentato de plata. El amoníaco se comporta como un “tampón amoniacal” que impide la síntesis temprana del dicianoargentato de plata y favorece su correcta síntesis (Mahecha & Gavilán, 2021). La adición de amoníaco en solución transforma el medio acuoso original a medio amoniacal (Gliorio, 2020). Finalmente, el precipitado obtenido es analizado por gravimetría que consiste en el análisis de las diferencias másicas registradas antes y después de la reacción efectuada con el nitrato de plata.

3.5.3. Colorimetría-espectrofotometría

La colorimetría es una técnica analítica que se utiliza para medir la concentración de una sustancia en una muestra mediante la medida de la absorción de luz por la muestra. En el caso de la detección de cianuro, se utiliza la colorimetría para medir la cantidad de cianuro en una muestra mediante la formación de un complejo de color con una sustancia química específica mediante técnicas espectrofotométrica (Bradbury *et al.*, 1994).

En particular, para la detección de cianuro se utiliza cloramina T como agente reactivo, llevando a cabo la formación de cloruro de cianógeno; este compuesto reacciona en presencia de una molécula de piridina formando glutaconaldehído para después formar un complejo al adicionar ácido barbitúrico. Esta reacción permite obtener una coloración al aplicar el reactivo piridina-ácido barbitúrico en un rango de pH entre 6-8 (Baird *et al.*, 2017).

3.6. Métodos de eliminación de cianuro en hojas de yuca

Los tratamientos y métodos que implican la eliminación de los productos relacionados al consumo de yuca en diferentes presentaciones se pueden clasificar en dos campos; el primero de ellos se centra en la eliminación de cianógenos para la fabricación de productos a nivel industrial de los cuales se implementa como materia prima las plantas de yuca que se consideran amargas. Por otro lado, se tienen en cuenta tratamientos que se enfocan en la eliminación de cianuro para productos alimenticios de tipo artesanal o doméstico.

Estos procedimientos de tipo industrial se enfocan en la detoxificación de HCN interviniendo en la extracción del almidón empleando principalmente trituración del material, lavado y remojo en agua para la producción de harina (Ceballos & Ospina, 2003).

Actualmente existen alternativas al tratamiento de detoxificación industrial de HCN para la producción de harina y sus efluentes (aguas residuales). Para estos tratamientos se aplican tecnologías de adsorción, precipitación para la formación de complejos ferrocianurados; extracción con aire a contracorriente o procesos biotecnológicos empleando biorreactores con microorganismos aptos para la degradación de HCN (Dzombak *et al.*, 2005; Torkaman *et al.*, 2021).

En general, el principio fundamental para la eliminación de los cianógenos para las raíces y las hojas de yuca se basa en la actividad enzimática que corresponde a la degradación de la linamarina en cianuro y a posteriori la propia naturaleza volátil del HCN (Ceballos & Ospina, 2003; Montagnac *et al.*, 2009). Por ello los tratamientos que implican el uso de energía calórica y disminución del tamaño de partícula para activar la cianogénesis de la linamarina son imperantes frente a métodos con mayor complejidad.

A nivel doméstico la combinación de diferentes operaciones unitarias con los factores mencionados lleva a la reducción o inclusive la eliminación del contenido de cianuro que llegase a tener un producto (Montagnac *et al.*, 2009). Adicionalmente, el tratamiento de las hojas puede presentar diferentes resultados que el mismo tratamiento aplicado a la raíz.

Los tratamientos térmicos de por sí no son efectivos para eliminar los cianógenos debido a que afectan la estabilidad de las enzimas o pueden inactivarlas; la vaporización, el horneado y el secado tienen gran ineficacia ante la naturaleza de la liberación del cianuro (Montagnac *et al.*, 2009). El hervido ha demostrado reducir hasta un 50% del contenido de HCN siendo este el más eficaz de los tratamientos térmicos (Anjani *et al.*, 2021; Montagnac *et al.*, 2009). El secado por exposición puede tomarse como una opción complementaria, pero es dependiente de la temperatura y el tiempo operacional (Gómez & Valdivieso, 1985).

Otros métodos más complejos tales como la fermentación, la destilación al vapor, y en el caso de las raíces la extracción del almidón favorece a casi la total eliminación de los cianógenos en el producto. La fermentación a través de bacterias lácticas es un proceso muy utilizado en África y en combinación con métodos de remojo y rallado presenta poca retención de cianógenos (Montagnac

et al., 2009); la desventaja de la fermentación es el tiempo requerido y el cuidado de la manipulación biológica puesto que puede llevar a otros tipos de intoxicación y la afectación del contenido proteico (Gundersen *et al.*, 2022). Por otro lado, la destilación es dependiente principalmente del volumen de destilado, y suele ser de mayor complejidad que tratamientos térmicos que ofrecen buenos rendimientos si son combinados.

En el caso de las hojas, los métodos que involucran trituración, molienda u otro tipo de operaciones que disminuyan el tamaño de partícula acompañadas de hervido o secado al sol presentan eliminaciones del contenido de cianuro del producto bastante óptimas (Bradbury & Denton, 2014). La trituración y hervido teniendo como tiempo operacional 10-15 minutos es capaz de remover el 97% del tóxico (acetona cianohidrina y HCN), sin perder el valor nutricional (Montagnac *et al.*, 2009).

Cabe considerar que el tratamiento por ultrasonido presenta buenos resultados para la eliminación de cianógenos en muy poco tiempo (Latif *et al.*, 2019) , pero en relación costo beneficio y su posible dificultad de adquisición hacen descartable el método para el concepto deseado.

Finalmente, el uso de bicarbonato de sodio en soluciones menores al 1% demuestran una reducción de cianógenos en complemento con otros métodos, esto debido a su naturaleza abrasiva y por su capacidad de neutralizar el pH del medio (Latif *et al.*, 2019).

4. Objetivos

4.1. General

Evaluar el cianuro total en hojas de yuca para diferentes variedades de Colombia y proponer métodos de eliminación.

4.2. Específicos

- Seleccionar las condiciones óptimas de detección y cuantificación de cianuro en hojas de yuca.
- Evaluar el contenido de cianuro total extraído de la hoja de yuca de las variedades de Colombia con el método optimizado.
- Evaluar dos métodos para la disminución o eliminación de cianuro de hojas de yuca.

5. Metodología

Este estudio determinó la concentración de HCN en hojas de yuca de 28 variedades diferentes de Colombia que se recolectaron en una finca ubicada en La Vega Cundinamarca y en el corregimiento de San Cayetano Bolívar para un total de 51 muestras. La cuantificación de cianuro se realizó a través de un método colorimétrico empleando como equipo de detección un espectrofotómetro UV-VIS en el laboratorio de biología molecular del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

El desarrollo de este proyecto se llevó cabo en cuatro etapas siguiendo la metodología planteada por los autores mostrados en la sección de antecedentes:

Etapa 1: Muestras de estudio-recopilación de muestras de hojas de yuca (1-6g) de 28 variedades originarias de diferentes regiones de Colombia: Región Amazónica 16 variedades, región Caribe 6 variedades, región Andina 4 variedades, región Pacífica 1 variedad y Orinoquia 1 variedad, teniendo en cuenta que las plantas a recolectar se encontraban en un nivel de desarrollo entre los 6 a 7 meses ya que en este tiempo la planta posee mayor cantidad de cianógenos.

Etapa 2: Selección del método analítico: se realizó la optimización de un método colorimétrico para la detección de cianuro por espectrofotometría UV-VIS. La colorimetría permite visualizar el cianuro presente en las muestras para poder llevarse a cabo la cuantificación usando un espectrofotómetro.

Etapa 3: Determinación de la concentración de HCN en las muestras de hojas de yuca recolectadas con el método optimizado.

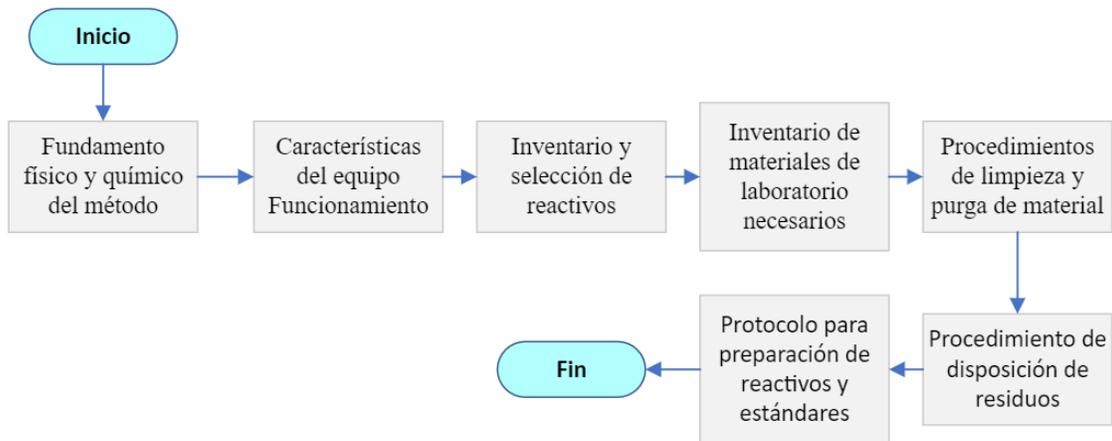
Etapa 4: Evaluación de dos métodos de reducción o eliminación de cianuro en las muestras de hojas de yuca recolectadas.

Etapa 5: Análisis exploratorio estadístico, de la información recolectada de cada muestra

5.1. Etapa preliminar

En esta etapa el objetivo es evaluar si el método seleccionado es factible técnica y económicamente, teniendo en cuenta aspectos como la disponibilidad de reactivos, equipos y recursos, la accesibilidad al laboratorio y la capacidad para obtener todos los materiales necesarios. La ejecución preliminar del método permitió ajustarlo a las condiciones del laboratorio y se consideraron los parámetros mostrados en la Figura 5-1 en esta etapa preliminar.

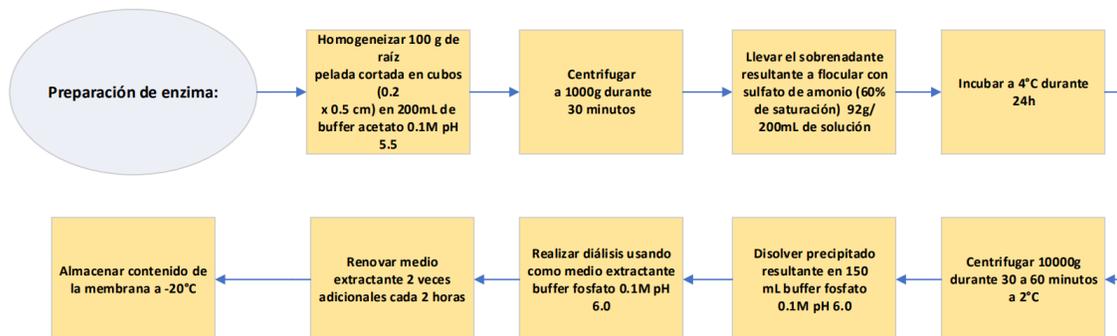
Figura 5-1: Diagrama metodológico del proyecto- Etapa preliminar.



Fuente: Elaboración del autor.

5.2. Preparación de la enzima:

En primera instancia se realizó una extracción y purificación de la β -D-Glucosidasa e Hidroxinitriloliasa encargadas de iniciar la hidrólisis de la linamarina en una muestra objetivo. Para ello se seleccionó tejido parenquimatoso de una raíz de yuca fresca siguiendo la metodología estandarizada (Cooke, 1978; Essers *et al.*, 1993). Se emplearon 25g de tejido en dimensiones aproximadamente de 0.2x0.5cm de tamaño para llevar a homogeneizarse posteriormente en 200mL de buffer acetato en solución acuosa 0.1M con un pH de 5.5. En la Figura 5-2 se puede analizar la metodología ya optimizada a detalle para la preparación de la enzima “linamarasa” o LH.

Figura 5-2: Diagrama metodológico del proyecto- Preparación de enzima.

Fuente: Adaptado de Cooke (1979) y Essers *et al.* (1993).

Una vez homogénea, la muestra se centrifugó a 20°C durante 30 minutos y 10000g de fuerza centrífuga relativa (RCF) separando así el contenido sólido sobrante de la raíz. Posteriormente se dejó floculando el sobrenadante restante con ayuda de sulfato de amonio durante 16h a 4°C.

Cuando se cumplió el tiempo de floculación, se llevó a cabo una centrifugación final para separar el precipitado “pellet” donde se encuentra la linamarasa del sobrenadante. Dicho proceso consistió en llevar las muestras en tubos Falcon de 50mL durante 1h a 10000g de rotación a una temperatura de 4°C.

Al evidenciarse el poco precipitado resultante se procedió a examinar posibles ajustes para mejorar la cantidad de pellet y así optimizar el procedimiento (ver sección de resultados y análisis) donde finalmente se empleó 100g de tejido en 200mL de buffer acetato (50%p/v) siguiendo el procedimiento estándar para adquirir suficiente precipitado.

Posteriormente, el pellet se separó rápidamente del sobrenadante por razones de solubilidad al cambio de temperatura de 4°C a 19°C (temperatura ambiente) durante el transvase. Para aprovechar la máxima cantidad de enzima, se adicionaron 12.5mL de buffer fosfato con un pH de 6.58 en los tubos Falcon para disolver completamente la enzima y trasvasar completamente.

Con el fin de purificar la enzima, se realizó un proceso de diálisis a partir de una membrana semipermeable de celulosa vertiendo un total de 60mL de solución objetivo (solución con la enzima).

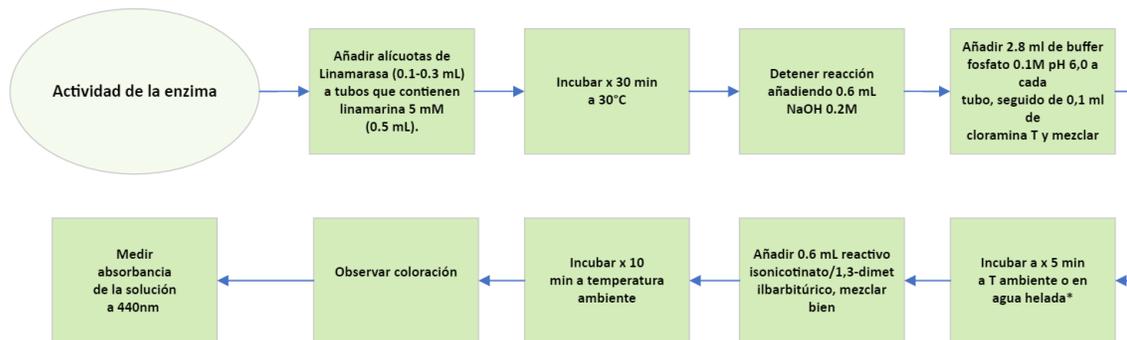
La diálisis se realizó durante 6 horas en total sumergiendo la membrana en la misma solución de buffer fosfato preparada para disolver la linamarasa en los tubos Falcon.

Mediante difusión, las impurezas fueron removidas desde el interior de la membrana al medio exterior asegurándose de realizar cambios de la solución buffer cada 2 horas permitiendo la remoción de moléculas no deseadas, principalmente linamarina, acetona cianohidrina y HCN originarios del tejido parenquimatoso empleado al principio.

5.3. Evaluación de la actividad enzimática:

Teniendo la linamarasa purificada, se realizó la preparación colorimétrica de soluciones simuladas mediante el uso de linamarina 97% pura Sigma Aldrich, con el fin de evidenciar la interacción de la linamarasa con la linamarina añadida siguiendo el procedimiento mostrado en la Figura 5-3.

Figura 5-3: Diagrama metodológico del proyecto- Actividad de la enzima.



Fuente: Adaptado de Cooke (1979) y Essers *et al.* (1993).

Para la ejecución de esta fase, se organizaron 3 ensayos por triplicado cuya diferenciación se basó en aumentar el volumen de enzima gradualmente de 0.1mL de forma ascendente; a su vez, se plantearon dos controles negativos, o blancos de la enzima y la linamarina cuya descomposición conlleva al analito (HCN). En la Tabla 5-1 se puede observar la estructura del experimento.

Tabla 5-1: Diseño experimental para la evaluación de la actividad enzimática.

Ensayo	Volumen linamarasa (mL)			Volumen Linamarina (mL)
	1	2	3	
E-	0.1	0.1	0.1	-
L-	-	-	-	0.5
E+L1	0.1	0.1	0.1	
E+L2	0.2	0.2	0.2	
E+L3	0.3	0.3	0.3	

Donde:

E-= Control negativo de enzima

L-= Control negativo de sustrato (linamarina)

E+L1= Reacción enzima sustrato 1

E+L2= Reacción enzima sustrato 2

E+L3= Reacción enzima sustrato 3

Fuente: Elaboración del autor.

Teniendo planteada la organización de los ensayos, se procedió a preparar los reactivos usados en la técnica colorimétrica (Ver Anexo F sección 2). Consecutivamente se preparó una disolución 0.5 mM de linamarina empleando 7mg de linamarina al 97% en 30 mL de buffer fosfato 0.1 M con un pH de 6.0.

En tubos Falcon de 15mL de capacidad, se adicionaron 0.5mL de linamarina en disolución a excepción de los tubos predeterminados para el control negativo de enzima (E-), posteriormente se agregaron 0.1, 0.2 y 0.3 mL de enzima purificada según se asignó para cada ensayo incluyendo al control negativo de linamarina.

Al entrar en contacto la disolución de linamarina con la enzima se inició la reacción de hidrólisis, por lo que de forma inmediata los tubos se taparon y se incubaron en baño termostático a 30°C durante 30 minutos para facilitar la degradación del cianógeno en ácido cianhídrico.

Completado el tiempo de incubación se añadieron 0.6 mL de hidróxido de sodio 0.2 M a cada tubo para fijar el cianuro generado y detener la hidrólisis enzimática al aumentar abruptamente el pH. Este procedimiento debe dejarse en reposo previo a una agitación manual a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Tras la fijación del cianuro, se agregaron 2.8 mL de buffer fosfato a un pH de 6.0 y 0.1 mL de cloramina T en solución para la totalidad de las muestras. Al igual que la fase anterior se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos después de una agitación manual. Finalmente se adicionaron 0.6 mL de reactivo color Y (compuesto cromogénico) en todas las muestras, donde se agitó y se dejó reposando 10 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo la medición espectrofotométrica.

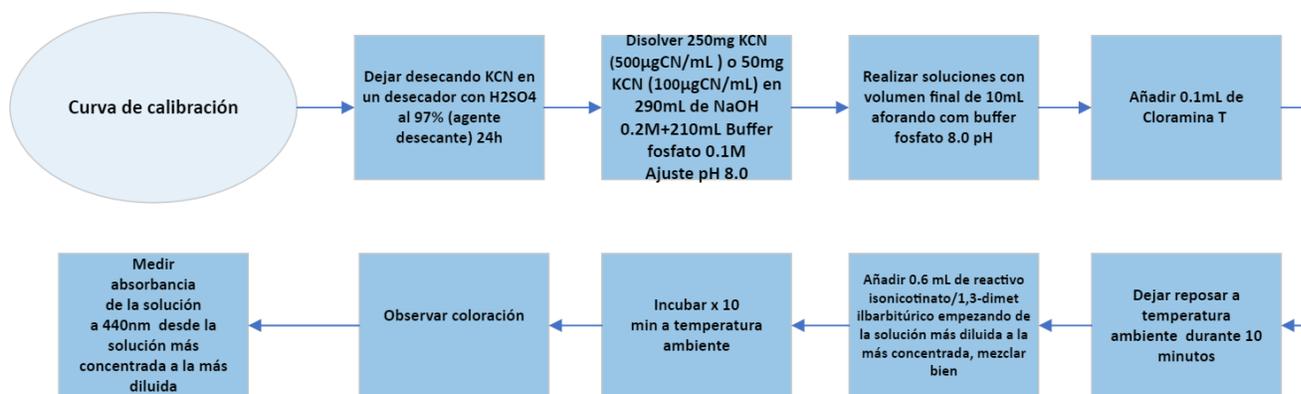
Como primera medida de análisis se observó el cambio de coloración de las muestras durante el transcurso inicial de la reacción colorimétrica presenciando una coloración azul-violácea donde gradualmente se opacó, claramente sin tener en cuenta el control negativo de la enzima.

En un espectrofotómetro (UV-VIS) Modelo 1200 se midió el nivel de absorbancia de las muestras ajustando el equipo a una longitud de onda (λ) de 440 nm como medida adicional para verificar el comportamiento de las muestras según la variación del volumen de la enzima hacia el sustrato que en este caso es la linamarina.

5.4. Preparación de la curva de calibración:

El desarrollo de la curva de calibración se centró en ajustar el comportamiento de la reacción colorimétrica buscando minimizar el error en cuanto a la medición espectrofotométrica. Partiendo de la metodología estándar se llevó a cabo el desarrollo de dos curvas de calibración cuyos intervalos fueron de 0-100 y 100-500 $\mu\text{gHCN}/\text{mL}$. En la Figura 5-4 se detalla la metodología para la construcción de la curva de calibración.

Figura 5-4: Diagrama metodológico del proyecto- Curva de calibración.



Fuente: Adaptado de Essers *et al.* (1993).

Inicialmente se prepararon dos soluciones madres mediante el uso de cianuro de potasio (KCN) previamente desecado con ácido sulfúrico al 98% en una campana de extracción durante 24 horas (revisar Anexo F sección 3); este proceso se debe realizar debido a el comportamiento higroscópico que tiene el KCN y puede llegar a interferir en el análisis espectrofotométrico.

A partir de una solución de buffer fosfato 0.1M y una solución de hidróxido de sodio 0.2 M, se realizó una disolución de KCN para la preparación de las respectivas soluciones madres (100 y 500 $\mu\text{gCN}/\text{mL}$) teniendo en cuenta un volumen total para cada solución de 500 mL. A cada solución se le realizó un ajuste de pH usando una solución de ácido clorhídrico (HCl) 2M con ayuda de un medidor de pH con electrodo de vidrio hasta lograr un valor de 8.0.

Teniendo preparadas las muestras se procedió a establecer 5 puntos de calibración todos originarios de la solución madre mediante diluciones con solución buffer fosfato 0.1M de pH 8.0

El procedimiento de lectura de absorbancia y colorimetría se realizaron teniendo en cuenta el tiempo de reacción, puesto que el compuesto cromogénico varía su absorbancia con rapidez. En primer lugar, se agrega 0.1 mL de cloramina-T previamente preparada iniciando por la solución de mayor concentración hasta el blanco; usualmente para la lectura de absorbancia debe realizarse este proceso de manera inversa, pero debido a la disminución de la absorbancia en muy poco tiempo se estableció de esta manera. Las muestras se dejaron en reposo durante 10 minutos. Después, del mismo modo se agregaron 0.6 mL de reactivo a cada muestra siendo este el inicio de la reacción donde se mostró una coloración ligeramente violeta y durante el transcurso de 30 minutos se tornó cada muestra a un rojo anaranjado intenso hasta una coloración azul-violeta.

Para la medida de la absorbancia se ajustó previamente el espectrofotómetro de igual forma que en el procedimiento que se realizó para la revisión de la actividad enzimática, pero con el fundamento de iniciar desde la solución de mayor concentración hasta el blanco. Este procedimiento se realizó por triplicado para comprobar la exactitud de los datos tomados para cada curva de calibración según los puntos establecidos (ver Anexo I).

5.5. Cuantificación de cianuro en hojas de yuca

Para la cuantificación de cianuro en las hojas, se debe tener en cuenta que las hojas jóvenes de la planta son las que mayor cantidad de linamarina producen, por lo que fundamentalmente se deben tomar hojas cuya planta tenga un nivel de desarrollo entre 5 a 7 meses de vida. Por ello, inicialmente se recolectaron muestras de 28 variedades diferentes de yuca para al final obtener 51 muestras con repetición según la disponibilidad presentada por cada variedad en el lugar de recolección. La selección de las variedades se priorizó hacia las variedades que posiblemente llegasen a contener mayor cantidad de cianuro según su lugar de procedencia teniendo en cuenta los antecedentes principalmente a Ospina *et al*, (2021) siendo así más imperativas las accesiones provenientes de la región Amazónica y del Caribe.

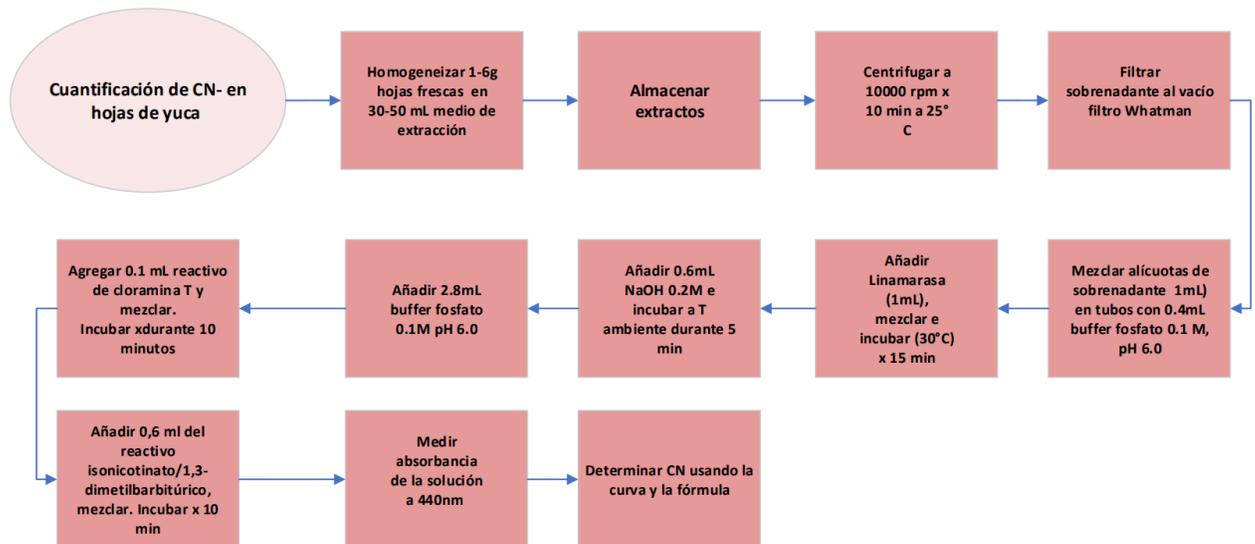
Posteriormente se tomaron 3 individuos de 5 variedades disponibles según su nivel de desarrollo en la finca de La Vega. Para cada individuo, se realizó el procedimiento por triplicado para un total de

45 muestras con el fin de encontrar la posible variación de los niveles de cianuro que se presentaba entre individuos de una misma variedad.

Al momento de recolectar las muestras se tomaron entre 1 a 6 g de material por muestra, cuyo almacenamiento en fresco se mantuvo entre 2 a 4°C hasta su procesamiento durante un tiempo menor a 12 horas.

La preparación de las muestras inició con la clasificación de las muestras según su variedad y réplica, donde se dividió en dos partes el peso total para llevar a cabo un proceso de secado con el fin de obtener el peso seco y realizar la homogenización de las hojas para preparar los extractos a analizar. En la Figura 5-5 se puede observar de manera ilustrativa el método para la cuantificación de cianuro en las hojas de yuca.

Figura 5-5: Diagrama metodológico del proyecto- Cuantificación de cianuro.



Fuente: Adaptado de Baird *et al.* (2017) y Essers *et al.* (1993).

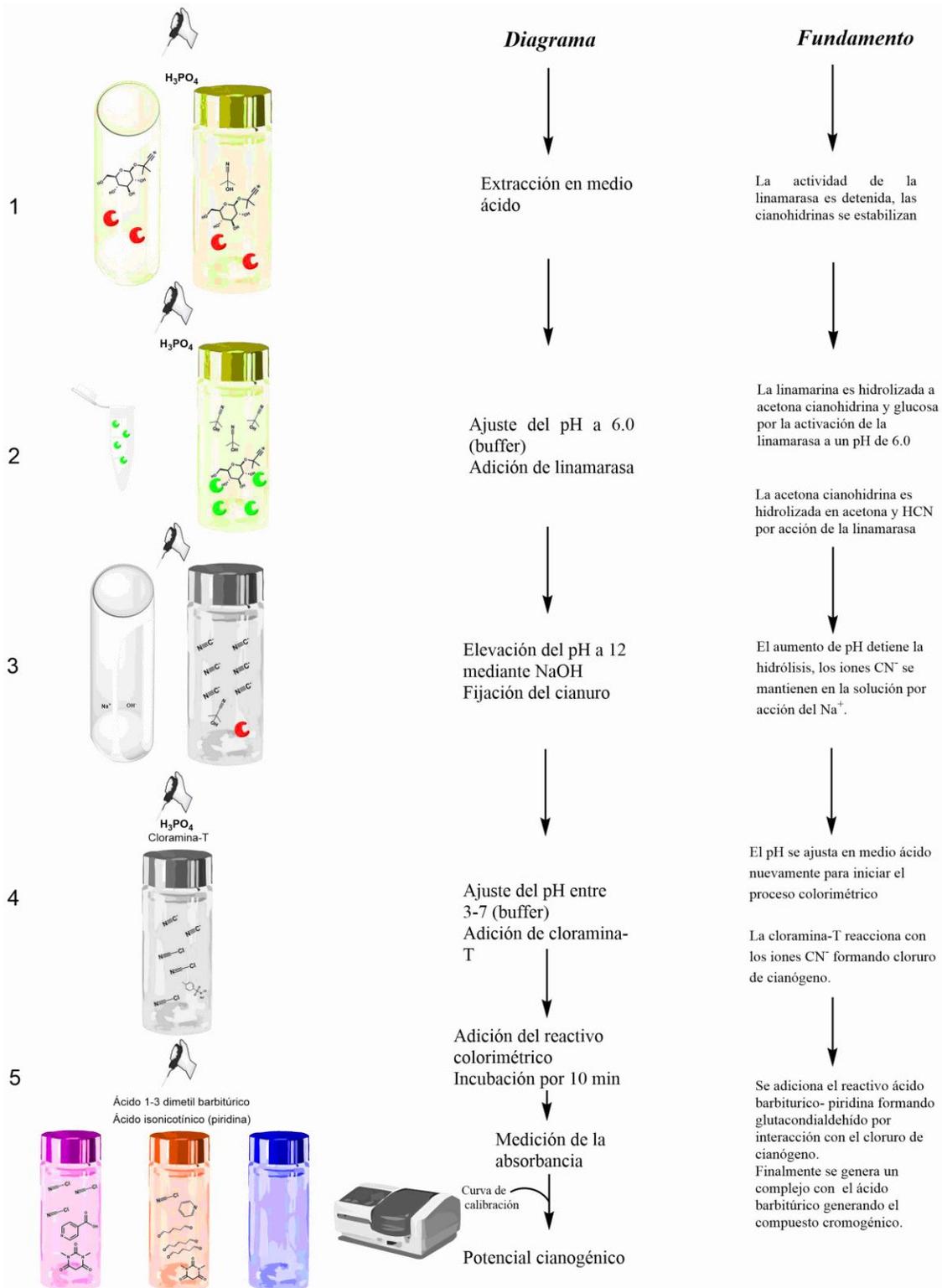
Según lo planteado, para la preparación del extracto se depositaron las muestras trituradas manualmente para facilitar la ejecución de la metodología. A partir de una solución de etanol al 96% y ácido fosfórico al 85% que permite una mejor conservación de las muestras (medio de extracción) se homogeneizaron las muestras con la ayuda de un procesador depositando los extractos resultantes

en tubos Falcon de 50mL donde fueron almacenados a -18°C hasta su respectiva manipulación. El procedimiento detallado se encuentra en el Anexo F sección 4.

Durante la preparación de los extractos, el resto del material fresco clasificado previamente se almacenó en sobres de papel y fueron situados en un horno para secado durante 24 h a 90°C . Una vez secadas las muestras, se procedió nuevamente a medir los pesos resultantes mediante una balanza analítica. Partiendo de los extractos refrigerados, se dejaron descongelar a temperatura ambiente para realizar una separación del material vegetal residual que se encontraba en las soluciones. Empleando filtración al vacío para la totalidad de las muestras, nuevamente se llevaron a congelamiento a -18°C para luego iniciar con la etapa de cuantificación de cianuro.

Teniendo los extractos preparados para la etapa de cuantificación, se empleó el uso de viales de vidrio herméticamente sellados para así evitar que la linamarina, y la acetona cianohidrina ya hidrolizadas, es decir el HCN formado, se volatilice y se pierda parte de su contenido.

De igual forma los extractos se dejaron en descongelamiento de manera secuencial para evitar pérdidas del analito, al afectar las variables que implican la activación de las enzimas implícitas en la hidrólisis (ver Figura 5-6). Siguiendo el procedimiento de Essers se cuantificaron las muestras mediante colorimetría y espectrofotometría usando una longitud de onda de 440 nm.

Figura 5-6: Diagrama metodológico para cuantificación de cianuro-Fundamentación.

Fuente: Adaptado de Baird *et al.* (2017) y Essers *et al.* (1993).

Nota: En la ilustración se observa el comportamiento de la reacción colorimétrica y de la hidrólisis de la linamarina como preparación de la cuantificación de HCN en el espectrofotómetro.

5.6. Evaluación de tratamientos para la remoción de cianuro en hojas de yuca

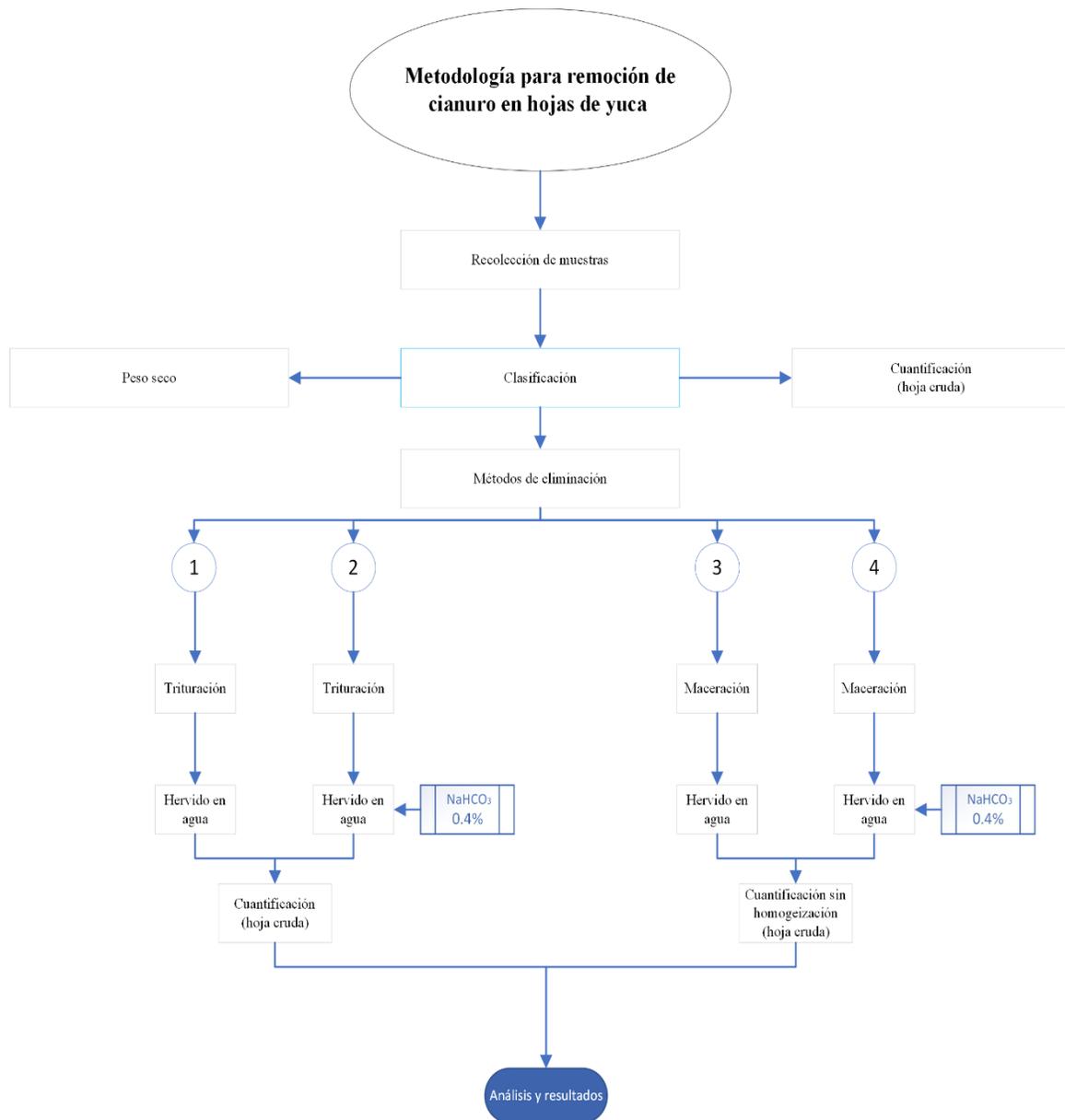
El diseño metodológico para la remoción de cianuro en hojas de yuca se centró en un procesamiento básico y sencillo debido al enfoque doméstico al que se quiere llegar. Por ello se presentan métodos de corta duración, pero con gran efectividad según la literatura consultada.

Partiendo del principio de la liberación de HCN por la cianogénesis, es decir por la interacción de las enzimas con la linamarina y la naturaleza volátil del cianuro una vez hidrolizado, se seleccionaron una combinación de operaciones donde el tamaño de partícula de la hoja se ve reducido con el fin de promover con facilidad la descomposición de linamarina a HCN y posteriormente someter la muestra a un calentamiento asegurando que el agente tóxico se separe (Montagnac *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se seleccionó como criterio de control el uso de bicarbonato de sodio en solución (0.4%) debido a su acción reguladora del pH y por su efecto reductor en la adhesión intracelular, promoviendo la separación celular facilitando la descomposición de la linamarina (Latif *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta estos conceptos se procedió a realizar 2 métodos de la siguiente manera (Figura 5-7).

Figura 5-7: Diagrama metodológico para los tratamientos propuestos en la eliminación de HCN en las hojas de yuca.



Fuente: Elaboración del autor con base en la información publicada por Montagnac *et al.* (2009).

Nota: Los dos métodos seleccionados se diferencian por la operación de trituración o maceración manual y la adición de bicarbonato de sodio de manera comparativa teniendo un total de 4 tratamientos.

En primer lugar, el procedimiento parte de la recolección de muestras sin ninguna modificación, la cuantificación estándar que se ha mostrado se empleó como muestra de control para comparar las muestras que se sometieron a un proceso de remoción; para este caso se realizó un pool (grupo) de diferentes hojas tomadas de tres individuos independientes, pero de la misma variedad en cuatro tratamientos.

En los tratamientos 1 y 2 se emplea como variable de control la adición de bicarbonato de sodio al 0.4%, donde se aplica trituración manual de la muestra para llevar a cabo un calentamiento por hervido durante 10 minutos. Posteriormente las muestras son tratadas para la cuantificación de HCN de manera estándar.

Por otro lado, en los tratamientos 3 y 4, las muestras son sometidas a una maceración con mortero para asegurar la hidrólisis, luego se aplica el mismo control de adición según el tratamiento respectivo. Una vez que se han procesado las muestras son llevadas directamente al medio de extracción ya que no se requiere una homogeneización adicional. Después, se aplica el proceso de cuantificación estándar.

Finalmente, para la realización de este experimento se emplearon dos variedades distintas (Venezolana y Punta de lanza) tomadas de una finca en San Cayetano, Bolívar teniendo en cuenta la disponibilidad de los especímenes en la zona.

5.7. Diseño estadístico

La totalidad de los estudios realizados en esta investigación fueron de tipo experimental al realizarse una manipulación de los sujetos de estudio, en cuyo caso se explica previamente en la metodología planteada.

El diseño estadístico efectuado fue completamente aleatorizado empleando un análisis de varianza de un factor para la revisión de las muestras técnicas con el fin de determinar la diferencia de medias independientemente por individuo y por variedad. De igual forma, se realizó un análisis de varianza de dos factores para evaluar la diferencia de medias para cada tratamiento. Para los diseños experimentales se adjudicó un valor $P < 0.05$ en la realización de todos los análisis mencionados. Los datos fueron tratados mediante el software R y tabulados empleando Microsoft Office Excel 2021.

Finalmente, el experimento inicial de cuantificación de cianuro en las hojas (muestras biológicas) se mantuvo en un análisis estadístico de tipo descriptivo debido a las limitaciones encontradas en la recolecta de muestras.

6. Resultados y análisis

6.1. Optimización del método:

Para la cuantificación de cianuro en hojas de yuca se tomaron como referencias principales los trabajos mencionados en el capítulo de antecedentes adaptando los métodos principalmente a las características que presentaron las muestras recolectadas como ajuste para la optimización de la obtención de los resultados. A continuación, se detallan los ajustes que se efectuaron en cada fase.

6.1.1. Preparación de la enzima:

La adecuación para el preparado de enzima adicional que se usó en la práctica evidenció dificultad a la hora de extraer mediante centrifugación la linamarasa, por ello se realizaron diferentes experimentos al modificar detalles en las variables que potencialmente pudieron tener un efecto considerable en dicha separación.

En primera instancia se desarrolló el procedimiento para la preparación y pelletización de la enzima según la literatura consultada a partir de 25 g de tejido parenquimatoso seccionado en dimensiones de 0.2 x 0.5 cm de tamaño aproximadamente. Después de dejar flocular en frío el extracto, se llevó a cabo la centrifugación correspondiente a 10000 RCF de rotación durante 1h a 4°C cuyos resultados evidenciaron cantidad insuficiente de pellet para las etapas posteriores.

Debido a este percance se replanteó como primera medida una posible interacción entre el floculante y los reactivos usados en la preparación del buffer. Por lo que se reemplazó el uso de NaOH con amoníaco (NH_3) para el ajuste de pH al medio ligeramente ácido. Para comprobar si realmente existía afectación por el agente floculante se ejerció un experimento comparativo cualitativo mediante la metodología estándar y el método con el buffer preparado con solución amoniacal. En ambos

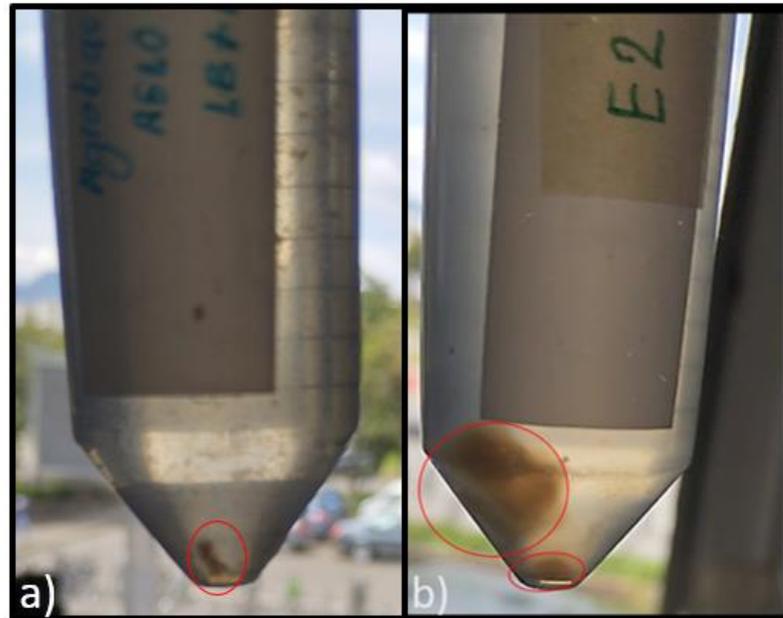
escenarios no se evidenció un cambio alguno, por lo que se descartó la influencia en la preparación de la solución buffer.

En vista de encontrar la posible afectación para la poca obtención de material enzimático, se procedió a modificar la concentración del agente floculante y los tiempos de centrifugación. Adicionalmente, se llevaron a cabo soluciones superiores a la concentración estándar (60%) hasta el punto de saturación del extracto, así como el tiempo de centrifugado, se llegó a duplicar para la observación de un posible efecto positivo. Nuevamente en ambos escenarios no se evidenció aumento del precipitado deseado.

Por otro lado, se hicieron variaciones en el material vegetal a usar, siendo este el factor con mayor posibilidad en presentar variaciones por cuestión de las diferencias que se encuentran intrínsecas al tratarse de material de origen biológico. Tomando como referencia base las metodologías mencionadas en los antecedentes (Cooke, 1979; Essers et al., 1993; Ikediobi et al., 1980) se desarrolló un experimento comparativo entre dos preparaciones cuya variación se denotaba en la cantidad de tejido parenquimatoso a usar en un mismo volumen de buffer para el extracto (200mL) al evidenciar diferencias en esta variable según los investigadores mencionados.

La preparación 1 constaba de 50 g de tejido en 200 mL de buffer acetato (25%p/v), es decir el doble de concentración usada según la metodología estándar, mientras que la preparación 2 fue elaborada con 100 g de tejido en 200 mL de buffer acetato (50%p/v). Finalmente, ambas preparaciones fueron sometidas normalmente según la metodología planteada inicialmente. En la Figura 6-1 se ilustran los resultados obtenidos frente a la separación para cada preparación.

Figura 6-1: Pelletización de linamarasa en dos preparaciones de diferente concentración.



Fuente: Elaboración del autor.

Nota: a) Muestra al 25% p/v, b) Muestra al 50% p/v.

Para ambos extractos se evidenció un resultado positivo frente a los cambios realizados; en el caso de la preparación 1, se observó un precipitado cuya cantidad de enzima es apenas perceptible, mientras que en la preparación 2, se observó un contenido mucho mayor a la preparación 1.

Como medida adicional se revisaron procedimientos aplicando variaciones en la temperatura de centrifugación, así como el tiempo necesario para lograr el objetivo, ya que se emplea una alta cantidad de tiempo para precipitar la enzima. Por ello se buscó optimizar el proceso de centrifugación teniendo como fundamento el descenso crioscópico del extracto; es decir, que a menor temperatura en la que se encuentre la solución, mayor facilidad tendrá el soluto (en este caso la enzima) de separarse o de pasar a fase sólida (Belcher, 1969). De igual forma se consultó en la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) las propiedades de la linamarasa para verificar el rango óptimo para la manipulación de esta enzima sin dañar o desnaturalizarla. Se evidenció que la enzima no se ve afectada en temperaturas relativamente bajas en este tipo de medio de extracción (*KEGG DOSA Os04t0474900-01*, s/f) (0-10°C sin activación enzimática), lo que facilitó la modificación de la temperatura en el tiempo de centrifugación.

Una vez consultada la información se procedió a experimentar disminuir la temperatura de centrifugación a 2°C a diferentes tiempos menores a 1 hora, por lo que se llegó a demostrar la obtención de precipitado apto entre 20 a 30 minutos de tiempo para centrifugar el extracto usando 100 g de material vegetal.

El proceso de purificación de la enzima no mostró complicaciones en el rendimiento, adicionalmente se obtuvieron 60 mL de linamarasa, considerándose cantidad suficiente para etapas posteriores de cuantificación.

6.1.2. Actividad enzimática:

Como se explicó en el desarrollo metodológico, la actividad enzimática se efectuó a partir de tres ensayos por triplicado para comprobar que la enzima está hidrolizando la linamarina adicionada y se lleve a cabo la generación de HCN. El proceso de colorimetría mostró cualitativamente un cambio de la coloración de los tres ensayos de forma gradual tal y como se esperaba. El ensayo E+L3, cuyo volumen de linamarasa fue de 0.3mL, denotó una coloración más opaca frente a los ensayos E+L2 y E+L1 de manera secuencial evidenciando que la linamarasa opera de manera normal en condiciones cuyo medio es ligeramente ácido (ver Anexo F sección 2). Como medida de corroboración, los ensayos fueron examinados en el espectrofotómetro para tomar sus respectivas absorbancias teniendo en cuenta una longitud de onda λ de 440nm.

Efectivamente se observaron que las medidas de absorbancia emitidas por las soluciones coincidían con el fenómeno gradual de concentración entre soluciones, pero entre repeticiones se observó diferencias entre los valores (Tabla 6-1). Se estima que la diferencia numérica entre las repeticiones se debe a la diferencia de tiempo en la que se efectuaron las medidas de absorbancia por la rapidez en la que el compuesto cromogénico se forma en un medio ligeramente ácido (pH de 6-7) así como su disociación, lo que genera un aumento o pérdida de la coloración en la solución. Adicionalmente, la velocidad de la reacción es clave en las diferencias de los valores tomados.

Tabla 6-1: Resultados de absorbancia para la evaluación de la actividad enzimática

Ensayo	Absorbancia		
	$\lambda:440\text{nm}$		
	1	2	3
E+L1	0.117	0.249	0.271
E+L2	0.242	0.281	0.309
E+L3	0.300	0.524	0.595

Donde:**E+L1**= Reacción enzima sustrato 1**E+L2**= Reacción enzima sustrato 2**E+L3**= Reacción enzima sustrato 3**Fuente:** Elaboración del autor.**Nota:** L1 (0.1 mL), L2 (0.2 mL) y L3 (0.3 mL) de linamarasa añadida.

Entre los ensayos, se puede notar como la absorbancia es mayor según se va aumentando las repeticiones. No obstante, el objetivo de esta etapa era la verificación de la influencia que tiene la enzima en presencia de linamarina con el fin de evidenciar su uso para asistir y favorecer a la hidrólisis en muestras de tejido foliar que son el objetivo de este proyecto.

En vista de los fenómenos que pueden afectar las mediciones en las etapas siguientes donde ya se definen ensayos de tipo cuantitativo, se tuvo en cuenta la naturaleza de la reacción colorimétrica adicionalmente de la propia hidrólisis enzimática.

6.1.3. Desarrollo de la curva de calibración

El desarrollo de las curvas de calibración que se usaron como soporte metodológico para la cuantificación de cianuro implicaron experimentación repetida para entender el fenómeno y la influencia de factores que afectaban un cambio drástico en el comportamiento que tenían los puntos referidos para cada curva y a su vez el patrón mismo que tendría dicha curva.

Uno de estos factores que contribuyen a la medición es el tiempo de reposo, en el que se da la reacción cromogénica, es decir, cuando el cloruro de cianógeno formado por la cloramina y el ácido

cianhídrico presente en la solución reacciona con el reactivo de color-Y (Essers et al., 1993) o también llamado reactivo de color ácido barbitúrico-piridina (Baird et al., 2017).

El tiempo de reacción óptimo a un pH ligeramente ácido, o aún más específico entre el rango de 6 a 7, la reacción que da el color donde el cloruro se acompleja con el reactivo de color, tiene un tiempo de duración máxima entre los 7 y diez minutos, lo que implica un tiempo de reacción corto para análisis rápidos, pero preferiblemente útil con un número de muestras pequeño. Por otro lado, si el pH controlado se mantiene en 8.0, la reacción demorará entre 25 a 30 minutos en completarse, facilitando el análisis de los puntos de calibración para la construcción de la curva. No obstante, la descomposición del complejo es bastante acelerada, por lo que es imperativo realizar las mediciones en periodos cortos de tiempo.

Como se describe en la metodología, se realizaron dos curvas de diferentes rangos de medición. La primera curva (Curva 1) se elaboró a partir de $100 \mu\text{g}_{\text{HCN}}/\text{mL}$ o 100 ppm de HCN usando cianuro de potasio (KCN). Los puntos de calibración de las curvas fueron medidos de mayor concentración a menor concentración debido a la naturaleza de la reacción colorimétrica; adicionalmente se llevaron a cabo en total 3 repeticiones para asegurar la fiabilidad de los datos. Estas repeticiones fueron realizadas de manera secuencial para disminuir la variación en el valor de los datos por la razón ya expuesta.

La curva 2, se diseñó de la misma manera que la curva 1, pero con la diferencia de analizar concentraciones que se encontraran en un rango óptimo entre 500 a 100 ppm de ácido cianhídrico.

En la realización de estas curvas de calibración, un factor que llamó bastante la atención fue la fácil disminución de la absorbancia; por ello se consultó nuevamente la metodología y literatura adicional para verificar el comportamiento de estas estructuras lineales.

Una vez revisados estas fuentes de información, se identificaron similitudes con los resultados obtenidos, se observó que para el análisis de cianuro empleando KCN como fuente de CN^- (Essers et al., 1993) se muestran pendientes con la misma tendencia, así como en procedimientos que buscan cuantificar cianuro de otro tipo de glucósidos cianogénicos diferentes a la linamarina (Appenteng et al., 2021).

Es posible que este fenómeno sea causado por la naturaleza de la reacción química al formarse el complejo cianurado y su propia descomposición. La absorbancia disminuye drásticamente una vez alcanza su absorbancia máxima pero no se determina específicamente la causa de este comportamiento. Las curvas de calibración se presentan en el apartado Anexo I.

6.2. Cuantificación de cianuro en hojas de yuca

Para la etapa de cuantificación, inicialmente se revisaron las variedades disponibles para la recolección de muestras. Las muestras fueron recolectadas en una Finca ubicada en las afueras de La Vega Cundinamarca en la vereda Ucrania, donde se disponen los cultivos de yuca provenientes de diferentes zonas de Colombia. Adicionalmente se recolectaron 4 variedades ubicadas en la región de los Montes de María, cerca al corregimiento de San Cayetano Bolívar.

6.2.1. Recolección de muestras

Se procedió a realizar la recolección de hojas frescas para 28 variedades diferentes de yuca teniendo como criterio su disponibilidad y nivel de desarrollo. Las variedades seleccionadas tenían sus hojas en un nivel de desarrollo alrededor de 5 a 7 meses de vida, factor óptimo para el análisis de cianuro en el tejido foliar.

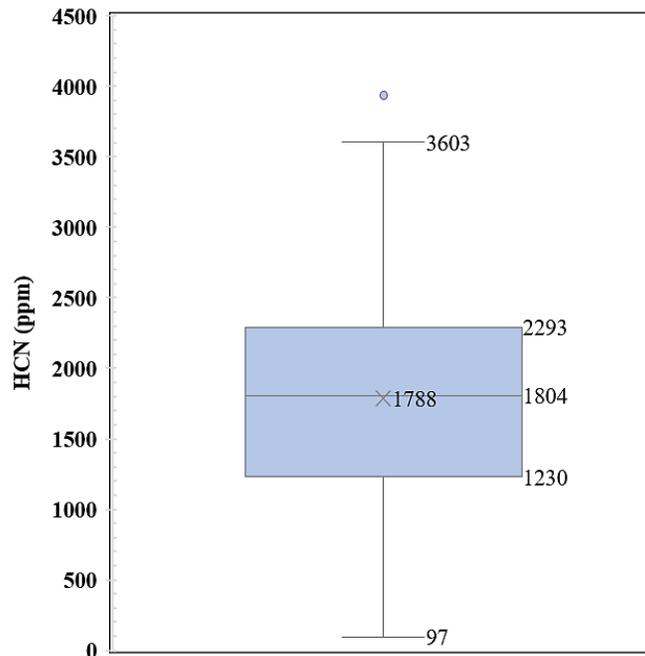
Idealmente se esperaba recolectar muestras de hojas para un total de 3 individuos de la misma variedad, pero en el momento de la recolección algunos especímenes no se optaron viables para un gramaje mínimo de este material. Finalmente se obtuvieron 51 muestras en total.

6.2.2. Procesamiento de las muestras (muestras biológicas)

Como se explicó en la metodología, las muestras se separaron en la misma cantidad másica para llevar a cabo un secado y una extracción. Las muestras que se llevaron a secar fueron sometidas a una medición inicial del peso (peso fresco) y posterior al tratamiento (peso seco), ver Anexo F sección 4. Paralelamente, se procesaron las muestras para elaborar los extractos tal y como se muestra en el capítulo de metodología.

Para las 28 variedades se encontraron valores desde 97 hasta 3936 ppm estableciendo una mediana de 1804 ppm y una media de 1788 ppm para el conjunto de datos (ver Figura 6-2).

Figura 6-2: Diagrama de caja y bigotes para concentraciones de HCN halladas para 28 variedades analizadas expresadas en $\text{mg}_{\text{HCN}}/\text{kg}$ (ppm) de muestra seca.



Fuente: Elaboración del autor.

Nota: El diagrama de caja y bigotes revela un rango intercuartílico (RI) que abarca desde el cuartil 1 (Q1) con una concentración de 1230 ppm hasta el cuartil 3 (Q3) con 2293 ppm de HCN. Este rango, que comprende el 50% central de los datos, ofrece una medida de la dispersión de las concentraciones observadas. Además, se observan dos valores atípicos en ambos extremos del diagrama, con concentraciones notables cercanas a 4000 ppm en el extremo superior y por debajo de 100 ppm en el extremo inferior. Estos valores atípicos, aunque simplemente identificados descriptivamente, indican la presencia de concentraciones particulares que se apartan de la tendencia general del conjunto de datos.

Los valores más altos registrados se dan en las variedades TU01, V27, T22, y V20 donde la mayoría de estos especímenes se suelen encontrar en la región Amazónica del país; por otro lado, las variedades Sucreña, T09 y CA10 siendo predominante el origen de las variedades con menor concentración hacia el norte del país. Cabe aclarar que estas variedades, aunque no superan las 500 ppm de HCN frente al común de los valores obtenidos (Ver Tabla 6-2), tienen una concentración importante de este compuesto, por lo que si las hojas se desean implementar o darles una aplicación nutricional deben ser tratadas para tal fin.

La cuantificación de las muestras, y las fórmulas usadas se pueden evidenciar en el Anexo F sección 4 en el apartado de Cálculos.

Tabla 6-2: Concentraciones de HCN en hojas de yuca para 28 variedades diferentes de Colombia.

Procedencia	Variedad	mg _{HCN} /kg muestra
Tumaco-Nariño	TU1	3936.1
Villa Azul-Caquetá	V27	3602.9
San José del Guaviare-Guaviare	T22	2961.9
Villa Azul-Caquetá	V20	2759.4
Santana-Boyacá	S07	2625.6
Villa Azul-Caquetá	V43	2387.3
Villa Azul-Caquetá	V61	2368.6
San José del Guaviare-Guaviare	T08	2268.1
Villa Azul-Caquetá	V03	2189.8
Villa Azul-Caquetá	V58	2155.8
Tuchín-Córdoba	24	2120.4
Villa Azul-Caquetá	V06	2019.3
Tame-Arauca	JA02	1933.0
Villa Azul-Caquetá	V44	1824.4
San José del Guaviare-Guaviare	T05	1784.4
Chigorodó-Antioquia	CA11	1760.1
Zapatoca-Santander	S02	1639.1
San José del Guaviare-Guaviare	T41	1615.5
San Martín de Loba-Bolívar	S05	1507.5
San José del Guaviare-Guaviare	T35	1251.6
San Cayetano-Bolívar	Paquita	1242.2
San José del Guaviare-Guaviare	T13	1191.8
Villa Azul-Caquetá	V68	1054.9
San Cayetano-Bolívar	Chirosa	535.1
San José del Guaviare-Guaviare	T09	515.7
San Cayetano-Bolívar	Venezolana	492.9
San Cayetano-Bolívar	Sucreña	219.7
Chigorodó-Antioquia	CA10	97.1
Media		1787.8

Nota: La tabla se clasifica por el lugar de procedencia específico de las variedades analizadas y el departamento correspondiente a dicho lugar. Para todas las variedades excepto las provenientes de San Cayetano quienes fueron procesadas directamente del lugar, las hojas fueron recolectadas de las variedades cultivadas de La Vega, Cundinamarca.

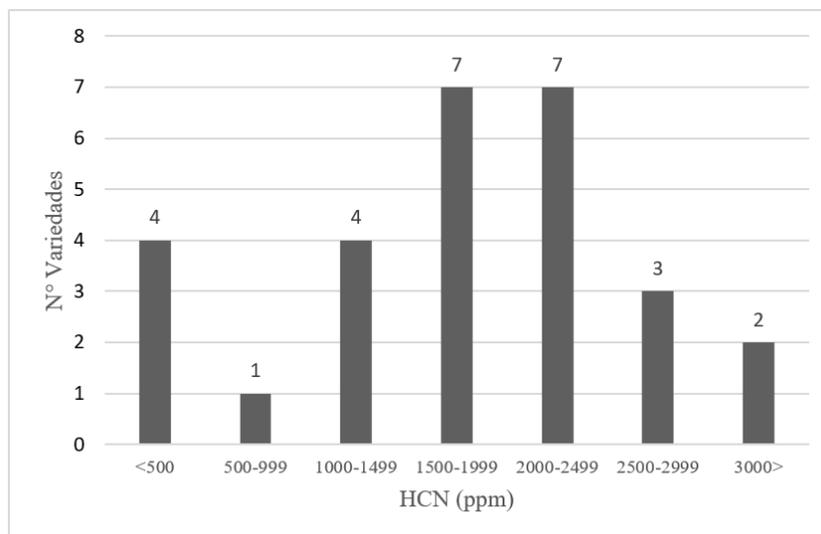
En términos específicos para el grupo de variedades seleccionado, se puede evidenciar una variación del contenido de HCN entre dichas variedades. En varios casos, autores han reportado valores en donde se detallan este tipo de diferencias a pesar de considerar una variedad amarga o dulce; En este caso, al tratarse de variedades amargas y dulces, los datos coinciden con rangos de valores de estudios similares donde se evidencia valores significativamente altos. En la Tabla 6-3 se pueden observar algunos de estos valores (Chaiareekitwat et al., 2022; Gómez & Valdivieso, 1985; Hue et al., 2012; Juma et al., 2022; M. A. Ospina et al., 2021; Umuhozariho et al., 2014).

Tabla 6-3: Concentraciones reportadas de HCN en hojas de yuca por diversos autores.

Concentración de HCN reportado (ppm)	Referencia
1500-2000	Gómez & Valdivieso, 1985
1056-3689	Hue <i>et al.</i> , 2012
352-2179	M. <i>et al.</i> , 2014
346-7484	Ospina <i>et al.</i> , 2021
386-2330	Chaiareekitwat <i>et al.</i> , 2022
200-1300	Juma <i>et al.</i> , 2022

Nota: Valores recopilados de varios autores que reportaron valores similares respecto a la concentración de HCN en hojas de yuca representados en ppm (mg HCN/kg muestra).

El HCN cuantificado para las diferentes variedades (97-3936 ppm) coincide con los rangos reportados en diferentes publicaciones. A pesar de tener diferencias geográficas se evidencia que existe una gran similitud en la presencia de este analito en las hojas, donde comparado con la raíz, las hojas llegan a presentar cantidades tóxicas de cianuro. En la Figura 6-3 se puede observar la clasificación de las variedades por intervalos.

Figura 6-3: Distribución del contenido de HCN en hojas de yuca para 28 variedades distintas.

Nota: En la gráfica se representan de manera comparativa el número de variedades clasificadas por intervalos de concentración de HCN en ppm de las 28 variedades analizadas.

En la figura puede notarse como el 50% de los datos en relación con el total del número de variedades oscilan entre un rango de 1500 a 2500 ppm de HCN y ligeramente se da una asimetría negativa por la variación frente a los datos atípicos que presentaron muy poco contenido frente a variedades que se mantienen por encima de las 2500 ppm.

Por otro lado, en la cuantificación de las repeticiones para cada variedad con más de un individuo, se identificó una gran variación entre los datos, por lo que estadísticamente no permitió un análisis más exhaustivo. Por ello, se realizó otra toma de muestras con el fin de revisar la posible causa de esta diferencia en el contenido de HCN entre individuos de la misma variedad.

6.2.3. Procesamiento de las muestras (muestras técnicas)

Para este experimento, se llevó a cabo la recolección de hojas para 5 variedades cuya disponibilidad de 3 individuos por variedad es conocida. En este desarrollo, no se consideró la toma de hojas con un nivel de desarrollo específico con el propósito de tener mayor material para desarrollar un producto homogéneo, es decir, un pool como matriz de análisis para la cuantificación de cianuro. Adicionalmente se consideró que las concentraciones que se esperaban obtener en este ensayo a comparación del ensayo previo tendrían menor concentración por el hecho de no sesgar el nivel de desarrollo en la captación de hojas jóvenes.

El diseño se clasificó por 3 repeticiones por individuo, organizadas por los literales a b y c respectivamente para 3 individuos resultando en un total de 45 muestras. En la Tabla 6-4 se muestran los resultados para las muestras técnicas estipuladas.

Tabla 6-4: Concentraciones obtenidas de HCN para la revisión de muestras técnicas en hojas de yuca para 5 variedades diferentes.

Variedad	Individuo	Réplica HCN(ppm) (µg/g)			D.estándar	Media	CV
		a	b	c			
V47	R1	228.9	541.3	358.9	156.9302739	376.4	41.7%
	R2	261.1	430.2	241.1	103.9001256	310.8	33.4%
	R3	841.6	552.3	705.7	144.7712032	699.8	20.7%
JA02	R1	811.3	1568.5	1130.7	380.1130819	1170.2	32.5%
	R2	1188.5	1362.0	1527.2	169.3415179	1359.2	12.5%
	R3	544.3	519.5	552.5	17.19402608	538.8	3.2%
V20	R1	1984.2	1838.9	1078.5	486.3958944	1633.9	29.8%
	R2	345.4	269.8	268.9	43.91140387	294.7	14.9%
	R3	212.0	209.6	219.6	5.227732675	213.7	2.4%
CA10	R1	521.8	521.8	464.5	33.08448641	502.7	6.6%
	R2	635.1	726.0	716.9	50.02965404	692.7	7.2%
	R3	858.1	1289.1	1071.4	215.5046308	1072.9	20.1%
CA11	R1	1481.3	2245.8	1660.1	399.8672166	1795.7	22.3%
	R2	891.2	1339.1	1130.9	224.1547845	1120.4	20.0%
	R3	610.4	739.5	576.4	86.02682604	642.1	13.4%

Nota: Las réplicas técnicas (a, b, c) se realizaron para 3 individuos (R1,R2 y R3) de la misma variedad. Para este caso las variedades (V47, JA02, V20, CA10 y CA11) quienes encontraban disponibilidad de la recolección de material suficiente en el momento.

En esta estimación, se observaron valores relativamente altos en la variabilidad de los resultados a pesar de mantener una uniformidad mayor en el tratamiento y conformación de las muestras. En varios casos, se detalló una variación pequeña entre los datos, por lo que se puede inferir que posiblemente hay una diferencia significativa. Se cree que la variación de los datos en términos globales puede ser apoyada por la reacción colorimétrica, la naturaleza volátil del HCN donde se pudieron haber presentado pérdidas en las fases de incubación o por la heterogeneidad de las muestras. Es importante mencionar que el contenido de cianuro es dependiente de las condiciones ambientales y por tanto pequeñas diferencias en el suelo o condiciones climáticas entre individuos de la misma variedad también pueden explicar la variación importante en la presencia de cianuro. Nuevamente estos conceptos llevan a la revisión de las posibles causas de variación en el contenido de HCN a nivel fisiológico de la planta y en su análisis a nivel experimental. A continuación, se observan los resultados de los análisis de varianza efectuados para la profundización de la

variabilidad a investigar entre los individuos de las variedades así como la variabilidad entre dichas variedades (Tabla 6-5 y Tabla 6-6).

Tabla 6-5: Análisis de la varianza del contenido de HCN entre individuos de la misma variedad para las 5 accesiones estudiadas

Variedad	Grados de libertad		Suma de cuadrados		Media de cuadrados		F	Significancia
	Individuo	Residuales	Individuo	Residuales	Individuo	Residuales		
V47	2	6	260 221	112 935	130 111	18 823	6.912	0.0277
JA02	2	6	1 107 578	346 973	553 789	57 829	9.576	0.0136
V20	2	6	3 816 702	477 115	1 908 351	79 519	24	0.0014
CA10	2	6	505 729	100 085	252 865	16 681	15.16	0.0045
CA11	2	6	2 015 716	435 105	1 007 858	72 518	13.9	0.0056

Nota: Para las variedades mostradas se realizó un análisis de varianza independiente por cada una, empleando los individuos R1, R2 y R3 así como sus réplicas.

Los resultados obtenidos muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas teniendo en cuenta un $p < 0.05$ respecto al contenido de HCN entre los distintos individuos de las mismas variedades para las 5 accesiones frente a sus valores medios.

Tabla 6-6: Análisis de la varianza del contenido de HCN entre variedades para las 5 accesiones estudiadas

Variedad	Media	D.estándar	n
V47	462.33	208.25	3
JA02	1022.73	429.62	3
V20	714.10	797.60	3
CA10	756.10	290.34	3
CA11	1186.07	579.60	3

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Significancia
Variedad	4	953 962	238 491	0.928	0.485
Residual	10	2 568 672	256 867		

Nota: El análisis de varianza empleado se desarrolló usando la media de los individuos por cada variedad obtenida de las réplicas (a, b y c) respectivamente.

A diferencia de la revisión de la posible variabilidad de HCN entre los individuos de una misma variedad, los datos resultantes para el análisis del contenido de HCN entre las 5 variedades tomadas, no se observa diferencias estadísticamente significativas $p > 0.05$ respecto al valor medio de HCN registrado.

Como observación posterior respecto al análisis descriptivo efectuado frente a los resultados en el análisis inferencial se puede evidenciar que la variación proviene principalmente de la concentración registrada entre individuos de una misma variedad puesto a que la diferencia de los valores medios de las variedades seleccionadas para el diseño experimental es no significativa.

6.3. Remoción de cianuro en las hojas de yuca

Los 4 tratamientos aplicados para la remoción de cianuro de dos variedades provenientes de San Cayetano evidenciaron los resultados mostrados en la Tabla 6-5.

Tabla 6-7: Concentraciones obtenidas de HCN frente a los tratamientos de remoción estipulados para las hojas de yuca.

Variedad	HCN(ppm)				
	Sin Tratamiento	Trituración	Trituración + Bicarbonato	Maceración	Maceración + Bicarbonato
<i>Venezolana</i>	2293.0	552.8	587.6	390.4	216.4
<i>Punta de lanza</i>	2030.0	1133.2	691.4	196.2	169.4
%HCN removido					
Variedad	Sin Tratamiento	Trituración	Trituración + Bicarbonato	Maceración	Maceración + Bicarbonato
<i>Venezolana</i>	0%	75.9%	74.4%	83.0%	90.6%
<i>Punta de lanza</i>	0%	44.2%	65.9%	90.3%	91.7%
Media	0%	60.0%	70.2%	86.7%	91.1%
%Retención de HCN en hojas procesadas					
Variedad	Sin Tratamiento	Trituración	Trituración + Bicarbonato	Maceración	Maceración + Bicarbonato
<i>Venezolana</i>	100%	24.1%	25.6%	17.0%	9.4%
<i>Punta de lanza</i>	100%	55.8%	34.1%	9.7%	8.3%
Media	100%	40.0%	29.8%	13.3%	8.9%

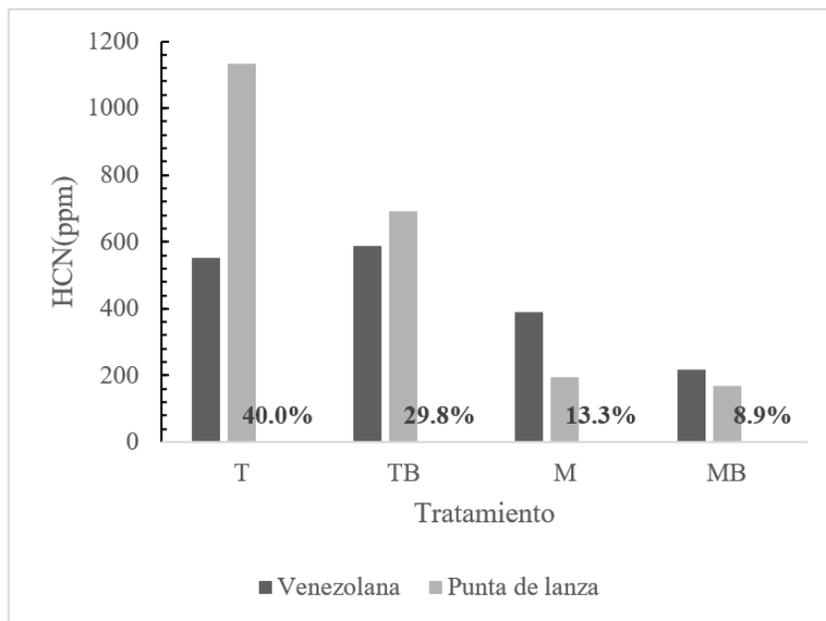
Nota: Se muestra la concentración obtenida de HCN en ppm para las hojas de las dos variedades (Venezolana y Punta de lanza) de manera comparativa, así como el porcentaje de HCN removido y a su vez el porcentaje remanente del analito para los 4 tratamientos teniendo como control muestras sin tratamiento.

Inicialmente, se optó por realizar una curva de calibración con un rango adaptable para las medidas de las muestras tratadas, por lo que se desarrolló entre un rango de 50 a 0 ppm a condiciones estándar en un medio ligeramente ácido pH (6.0) empleando una longitud de onda de 440 nm. Adicionalmente

se realizaron un total de 3 repeticiones de igual forma que las curvas para rangos de 100 y 500 ppm (ver Anexo I).

Como primera observación, las muestras sometidas a los 4 tratamientos manifiestan una disminución radical de la concentración de HCN en comparación a la muestra de control (sin tratamiento) para las dos variedades tomadas. En cuanto a la evaluación de la eficiencia del método, tomando como valor operacional de hervido 10 minutos en temperatura de ebullición (99.9°C) y un volumen de 250 mL de agua como condiciones generales para los 4 tratamientos de los dos métodos planteados, se observó una mejor remoción del HCN para los tratamientos en los que se aplicó maceración en vez de trituración. Ver Figura 6-4.

Figura 6-4: Concentración de HCN remanente en las hojas de yuca de las variedades seleccionadas para los 4 tratamientos propuestos.



Nota: En el gráfico se ilustra comparativamente la concentración final de HCN en ppm para los cuatro tratamientos efectuados, donde para cada uno se representa el porcentaje de retención de HCN en promedio tomando como referencia las dos variedades (Venezolana y Punta de lanza).

Para los tratamientos en los que se utilizó la trituración manual, se destaca una mejor eficiencia en el tratamiento en el que se empleó la solución de bicarbonato, donde se evidencia alrededor de un 10% de mejoría frente a la trituración predeterminada para la remoción del contenido de cianuro en las hojas.

Entre los tratamientos de maceración, se observó una gran remoción de HCN en las muestras llegando a obtenerse entre un 87% y un 91% de eliminación del tóxico. En comparación con los tratamientos sometidos a trituración, los de las maceraciones no muestran gran diferencia entre resultados frente a la implementación de bicarbonato en el hervido (4.4%). Esto puede deberse a que el tamaño de partícula de las muestras sometidas a la maceración es más pequeño y por ello la reacción enzimática se da con mayor facilidad, por lo que la acción del bicarbonato en la separación del tejido celular es menor, caso contrario a los tratamientos donde se aplica trituración. A continuación en la Tabla 6-8, se presentan los resultados del análisis de varianza como medida inferencial para la revisión de los tratamientos con el fin de corroborar si existen diferencias significativas entre los valores medios de los tratamientos empleando el uso de las dos variedades utilizadas en el experimento.

Tabla 6-8: Análisis de varianza para múltiples factores del contenido de HCN entre tratamientos para las variedades punta de lanza y venezolana.

	Tratamiento	Media	D.estándar
	ST	2161.51	185.96
	T	843.00	410.40
	TB	639.50	73.40
	M	293.30	137.32
	MB	192.90	33.23

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Significancia
Tratamientos	4	5006498	27.405	0.001348
Residuales	5	228360		

Nota: Los tratamientos se interpretan como (**ST**) sin tratamiento, (**T**) trituración, (**TB**) trituración y bicarbonato de sodio, (**M**) maceración, y (**MB**) maceración y bicarbonato de sodio donde, la concentración de HCN se registra en mg HCN/kg de muestra.

Los resultados evidencian la existencia de diferencias estadísticamente significativas teniendo en cuenta un $p < 0.05$ respecto al contenido de HCN registrado por cada tratamiento siendo afines al análisis descriptivo dado anteriormente. Se puede evidenciar de igual forma que los tratamientos que implican la maceración, ya sea con bicarbonato o simple demuestran tener mayor efectividad para la remoción de HCN frente a los tratamientos que emplean trituración. Por otro lado, se realizó un análisis de varianza (Tabla 6-9) para observar posibles diferencias en las medias de los valores resultantes entre las variedades usadas para los 4 tratamientos utilizados.

Tabla 6-9: Análisis de varianza para múltiples factores del contenido de HCN entre variedades para los tratamientos empleados para la eliminación de HCN en hojas de yuca.

Variedad	Media	D.estándar
P. de lanza	844.04	772.71
Venezolana	808.06	843.10

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Significancia
Variedad	1	3235	0.005	0.946
Residuales	8	5231602		

Nota: La concentración de HCN se registra en mg HCN/kg de muestra.

A diferencia que el análisis anterior, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas al obtener un valor $p > 0.05$ entre las medias de los tratamientos ejecutados en la práctica al comparar las variedades empleadas.

7. Discusión

En la investigación realizada se evaluó la concentración de HCN contenido en las hojas de yuca para 24 variedades cultivadas en una finca ubicada en La Vega Cundinamarca donde su procedencia se centra en la Amazonia y el Caribe, y 4 variedades recolectadas de manera directa en San Cayetano Bolívar. La mayoría de las variedades deben su procedencia de estas regiones por la importancia que maneja el país frente a su producción, comercialización, cultura, inclusive a nivel agroalimentario donde se presentan problemáticas importantes frente a la desnutrición (Díaz & López, 2021). Por ello se efectuó un análisis experimental empleando una metodología netamente descriptiva con el fin de explorar la concentración de HCN en las hojas de yuca mediante técnicas de análisis colorimétrico y espectrofotométrico (UV-VIS), adecuando y optimizando metodologías estandarizadas para la obtención de linamarasa y la cuantificación de cianuro teniendo en cuenta el catabolismo de la linamarina como glucósido cianogénico representativo de la yuca así como la eliminación de este metabolito en la hoja al proponer 4 métodos que puedan reproducirse a nivel doméstico.

Frente a la metodología empleada en este experimento, se puede denotar que las configuraciones realizadas mostraron mejoría para la obtención de la linamarasa siendo optimizado el tiempo de centrifugación a cambio de la disminución de la temperatura en el equipo favoreciendo la cantidad de la enzima precipitada. Por otra parte, la cantidad de material usado influyó directamente en la cantidad separada, teniendo suficiente cantidad de linamarasa para su aplicación en la cuantificación de la totalidad de las muestras en esta experiencia al efectuar una concentración del 50% peso/volumen.

La literatura revisada demuestra que el material de origen biológico no siempre puede adjudicarse de manera puntual para una metodología global, por ello en diferentes textos, se observan diferencias en las concentraciones usadas para la extracción de la enzima. Según la metodología de Ikediobi

et al. (1980), la concentración del extracto previo a la centrifugación manejaba un 33% peso/volumen, mientras que Cooke, (1978), usaba solo el 0.13% para obtener suficiente enzima. Esto deja en claro que, según el tipo de materia prima, su estado, calidad, procedencia son factores que afectan la extracción de linamarasa. No obstante, la raíz de la yuca en Colombia suele mantener costos bajos y una cantidad mayor o igual a lo establecido puede escatimar otros productos necesarios para la extracción y pelletización de la linamarasa proveniente del parénquima de la raíz de yuca.

Un factor importante que se ha discutido a lo largo de la historia referente a la investigación de cianuro en especies vegetales que contengan cianógenos en diferentes partes de las plantas es el de complementar la hidrólisis enzimática propia de la planta con enzima de carácter externo para asegurar que la mayoría de los cianógenos sean degradados para liberar todo el HCN posible, o dejar que ocurra la reacción naturalmente sin necesidad de agregar un agente externo (Arrázola, 2002).

Es bien sabido que la linamarina, la lotaustralina y pequeñas cantidades de linustatina son sintetizadas en el tallo y las hojas de la yuca, principalmente en hojas jóvenes, donde la mayor concentración de enzimas degradadoras (linamarasa, cianoalaninas sintetas) de estos cianógenos se encuentran en la raíz (McMahon et al., 2022); por ello, la actividad enzimática de manera teórica se centra en las raíces dejando en duda si la cantidad de esta enzima es suficiente para llevar a cabo la hidrólisis de la linamarina situada en las hojas. Para la cuantificación de las hojas de las variedades tomadas, se llevó a cabo la metodología estándar y se adicionó enzima complementaria para asegurar que dicha reacción hidrolice toda la linamarina en HCN, esta enzima demostró buena actividad al reaccionar con linamarina de grado analítico. Sin embargo, para futuros ensayos, la evaluación de la actividad enzimática de las hojas ya analizadas con enzima adicional puede llegar a facilitar la metodología general. Cabe aclarar que para este caso se debe tener en cuenta solo para situaciones puntuales donde se conoce la procedencia de la planta.

En vista de los resultados obtenidos para las 28 variedades seleccionadas de yuca, se observó una concentración acorde de HCN en las hojas frente a la literatura con metodologías similares. En primera instancia se evidenció que la mayoría de los valores categorizados por variedad se encontraban en un rango de concentración entre las 1200 a 2500 ppm de HCN; donde tomando la totalidad de los datos obtenidos se da un rango entre 97 a 3936 ppm. Comparando los datos

reportados en la literatura frente a los obtenidos, se observó que existen variaciones del contenido de HCN para diferentes rangos, donde sobresalen valores considerablemente altos. Según Ospina et al. (2021), para 178 genotipos diferentes, se obtuvo una media de 2298 ppm de HCN. Adicional a esto, se menciona que la distribución del contenido de HCN entre todos los especímenes seleccionados para el estudio mantiene un comportamiento normal, lo que implica que las hojas de la yuca han preservado una distribución del contenido de HCN sin un proceso de modificación de tipo antropogénico o por selección natural. Para el estudio realizado con las 28 variedades, puede alcanzarse a notar este patrón, esto puede deberse a que las hojas no son consideradas un material con valor agregado en la mayoría de los casos, de igual modo que los cianógenos son sintetizados en este órgano y al ser un metabolito secundario cuyo rol principal es la defensa frente a insectos y plagas (Conn et al., 1988) implícito en el ciclo del nitrógeno (Dzombak et al., 2005).

Teniendo en cuenta la alta variabilidad presentada de los niveles de HCN para las mismas variedades en diferentes individuos, se identificaron diferentes razones por las cuales se presenta este fenómeno. En primer lugar, como medida de corroboración se realizaron unas muestras técnicas donde una vez revisadas se denotaron variaciones importantes, aunque mucho menor en comparación con los obtenidos en las muestras biológicas. Según Montagnac et al., 2009, estudios realizados para la producción de harina a partir de yuca africana en Mozambique, durante los años que se presentó temporada de sequía, los niveles de cianuro excedieron gradualmente superando las 100 ppm de HCN en raíces para diferentes muestras, cuyos valores iniciales fueron del 6% hasta llegar a más del 65% de las muestras en superar dicha concentración.

Partiendo de esta situación, se encuentra que la variación del contenido de cianuro en las hojas se debe principalmente al metabolismo intrínseco que tiene cada individuo en respuesta a un factor inducido de estrés (Sun et al., 2018), lo que posiblemente explique el por qué se evidenció una variación significativa de la concentración de los valores medios entre individuos de una misma variedad en comparación a la ausencia de diferencias significativas hacia el análisis de la concentración de HCN entre las variedades empleadas para el estudio (muestras técnicas). Sin embargo, para prácticas futuras es recomendable profundizar mayormente en las condiciones de crecimiento de las plantas modelo así como mantener controlado otros factores para así disminuir la aparición de ruido que probablemente afecte al análisis.

McMahon et al., 2022 y Sun et al., 2018 explican las fluctuaciones que tienen los glucósidos cianogénicos en diferentes plantas como resultado de cambios ambientales dando origen a factores de estrés abiótico; la sequía o el estrés hídrico, la salinidad del suelo, cambios drásticos de temperatura que inducen cambios a nivel fisiológico de una planta afectada. En los resultados presentados a nivel general se pudo observar diferencias sustanciales entre las variedades analizadas en función de la concentración de HCN encontrada posiblemente por estas afectaciones ambientales y biológicas mencionadas, principalmente por el estrés hídrico en la zona de recolección de la mayoría de los individuos dando prioridad en la conservación del agua en la planta al mantener una concentración alta de glucósidos en las hojas.

Otro factor importante que puede afectar los niveles de linamarina en la yuca es frente a su ciclo circadiano. De acuerdo con Schmidt et al., 2018, los glucósidos cianogénicos cumplen un rol en la fijación del carbono, lo que conlleva a fluctuaciones según la hora del día. Durante el cenit los niveles bajan drásticamente mientras que en horas del anochecer hasta tiempo antes del amanecer se encuentra la mayor concentración de este tipo de metabolitos. Cabe resaltar que los factores bióticos como enfermedades, plagas, la regulación fisiológica propia de la planta aportan a la generación de estrés y en consecuencia afecta al aumento o disminución de los cianógenos (Sun et al., 2018).

En cuanto a la evaluación de los tratamientos, se determinaron teniendo en cuenta la facilidad para reproducir el método, asegurar una calidad apta para el consumo según la norma acorde al contenido de cianuro en alimentos, brevedad a nivel operacional y que sean relativamente de costo bajo. Como es bien sabido, la eliminación de glucósidos cianogénicos en productos alimenticios depende de activar la hidrólisis para degradar (en este caso la linamarina) en sus productos finales (HCN y acetona) y posteriormente aplicar calor para así separar estas sustancias volátiles del alimento (Bradbury & Denton, 2014).

De los 4 tratamientos realizados para los dos métodos propuestos, siguiendo las observaciones mencionadas, se observó una disminución del contenido de cianuro para todos los tratamientos. Para el tratamiento que implicaba una trituración y hervido se observó que en las dos variedades aplicadas se removió un 76% de HCN para la variedad venezolana, mientras que para la punta de lanza solo se logró remover el 44%. Teniendo en cuenta la revisión elaborada por Montagnac et al., 2009, los

tratamientos que emplean hervido llegan a eliminar alrededor del 50% del contenido de HCN. De acuerdo con esto, se podría confirmar que el 60% de HCN eliminado como valor en promedio para las 2 variedades empleadas, se diferenció en un 10% de lo consultado en la revisión de literatura. Por otra parte, se observa que para el tratamiento destacado por la trituración y hervido en solución de bicarbonato al 0.4% se logró una remoción del 74% para la variedad venezolana y 66% para la punta de lanza, demostrando mayor efectividad. Según Latif et al. (2019), el bicarbonato facilita el rompimiento a nivel celular, lo que promueve a la interacción enzima sustrato favoreciendo a la eliminación del cianuro, donde el valor promedio de estos resultados se estima en un 70% de eliminación de HCN.

En el caso de los 2 tratamientos restantes (método en el que se empleó maceración en vez de trituración), la maceración demostró mayor eficiencia para ambos casos en comparación con los tratamientos donde se aplicó trituración. Como se observó, la diferencia entre los dos tratamientos para los valores medios es solo del 4.4% , esta diferencia en paralelo con los tratamientos de trituración puede explicarse por el tamaño de partícula reducido en la maceración. Finalmente, de los resultados obtenidos el tratamiento que mostró un mejor rendimiento fue el de aplicar maceración de las hojas hasta lograr una masa homogénea y dejar hervir en una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 0.4% durante 10 minutos, teniendo asegurado la eliminación alrededor del 90% de HCN en las hojas.

Por otra parte, la variación del tiempo de hervido influye en la concentración de HCN remanente en las hojas. (Anjani et al., 2021) realizaron un estudio cuya observación se basaba en la concentración de HCN frente al tiempo de hervido demostrando que la concentración es indirectamente proporcional al tiempo en el que se dejan reposar las hojas en agua en ebullición. Del mismo modo, Hawashi et al., 2019 efectuaron un estudio comparando los niveles de cianuro para las hojas frente al tiempo en remojo una vez maceradas para diferentes volúmenes de agua; los resultados demostraron para todos los casos una eliminación del 94 al 96% de eliminación para 10 minutos de remojo, de los cuales se alcanzó una eliminación alrededor del 97% de HCN para 20 minutos de remojo.

De acuerdo con lo mencionado, un aumento del tiempo ejercido en el hervido favorece a la eliminación casi total del agente tóxico, pero puede inclinarse a la desnaturalización proteica al exponer las hojas por un tiempo prolongado (Montagnac et al., 2009).

De acuerdo con los análisis inferenciales realizados se puede evidenciar que no existen diferencias estadísticamente significativas tomando como referencia los valores medios de las variedades al compararse, caso contrario a la comparación de los valores medios de los tratamientos. Por lo tanto, en este estudio, la concentración de HCN residual después de aplicar un tratamiento no varía según la variedad de yuca a la que se le aplique uno de los 4 tratamientos investigados.

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, por sus siglas en inglés) para el contenido de HCN en productos alimenticios elaborados a partir de Gari y harina de yuca determina que los niveles máximos corresponden a 2 y 10 mg HCN/kg respectivamente (Codex Alimentarius, 1995). Generalmente, la información está diseñada para productos elaborados a partir de la raíz, pero puede aplicarse para cualquier producto, en este caso las hojas. Según la JECFA en el apartado de *Codex Alimentarius* CXS 193-1995 (Estándar General para Contaminantes y Toxinas en Alimentos y Piensos) establece para alimentos que contengan glucósidos cianogénicos como fuente principal de cianuro una dosis de referencia aguda del 0.09 mg HCN/kg (peso corporal) en base húmeda y una ingesta diaria tolerable provisional (PMTDI, por sus siglas en inglés) de 0.02 mg HCN/kg (peso corporal) en base húmeda expresado en cianuro total (Codex Alimentarius, 1995).

Siguiendo la normativa, los resultados con mejor eliminación del contenido de HCN realizados en este estudio se lograron obtener muestras con 216 y 169 mg HCN/kg de muestra en base seca para las variedades venezolana y punta de lanza respectivamente; las concentraciones siguen extralimitando lo permitido aunque se exprese en base húmeda (75 y 55 mg HCN/kg de muestra). No obstante, en la Guía Técnica para Producción y Análisis de Almidón de Yuca desarrollada por la FAO, menciona que en casos especiales cuando los niveles de cianuro iniciales son relativamente altos, el cianuro remanente en el producto en base seca puede ser superior a 100 ppm (mg HCN/kg de muestra) (Aristizábal & Sánchez, 2007; Ceballos & Ospina, 2003).

De acuerdo con la media de los resultados mencionados anteriormente teniendo en cuenta la concentración expresada en mg de HCN/kg de muestra en base húmeda (65mg HCN/kg) y siguiendo

la ingesta diaria tolerable provisional del apartado CXS 193-1995 para alimentos que contienen glucósidos cianogénicos se puede deducir que para una persona adulta de 70 kg de peso corporal puede consumir 1.4mg de HCN proveniente de las hojas sin presentar algún peligro para su salud, de lo cual se deduce que puede consumir 21.5g de hojas de yuca diariamente sin presentar un efecto adverso de manera vitalicia.

Es importante revisar que criterios pueden establecerse para la medición de la toxicidad de las hojas de yuca como una nueva fuente alimenticia proveniente de esta planta para definir de manera más efectiva un reglamento específico. De manera teórica, si el producto es consumido con frecuencia, el cuerpo humano estequiométricamente necesita aproximadamente 1.2 mg de azufre proveniente de aminoácidos diarios para transformar 1 mg de HCN en tiocianato a través de la enzima rodanasa (Aristizábal & Sánchez, 2007); considerando que las hojas contienen aminoácidos de este tipo tales como la cisteína y metionina (Gundersen et al., 2022) como fuente de azufre puede mitigar parcialmente el HCN como antinutriente, siempre y cuando el contenido proteico no se vea afectado en el tratamiento.

8. Conclusiones y Recomendaciones

8.1. Conclusiones

El proceso de extracción de la enzima linamarasa se optimizó para asegurar la obtención de pellet suficiente para la cuantificación de cianuro en hojas de yuca, disminuyendo los tiempos de centrifugación a la mitad.

Para 28 variedades estudiadas de yuca provenientes de diferentes partes del país, se evidenció concentraciones dentro de un rango de 97 a 3936 mg_{HCN}/kg de muestra en base seca determinando una media de 1788 mg_{HCN}/kg y una mediana de 1804 mg_{HCN}/kg de las cuales las variedades TU01 de Tumaco-Nariño, V27 y V20 originarias del resguardo Villa Azul-Caquetá y la variedad T22 proveniente de San José del Guaviare superan concentraciones de 2000 ppm considerándose tóxicas, mientras que las variedades Venezolana de San Cayetano-Bolívar, Sucreña de San Cayetano-Bolívar y CA10 originaria de Chigorodó-Antioquia no superan concentraciones de 500 ppm.

Para el estudio de las muestras técnicas, se observó que existe variación del contenido de HCN en las hojas de los individuos pertenecientes a la misma variedad posiblemente por condiciones de carácter ambiental o por respuestas fisiológicas que influyen en el aumento o disminución de linamarina en los individuos estudiados. Sin embargo, se evidenció que no hay diferencias en la variación de los valores medios para la concentración de HCN entre las variedades analizadas.

En la evaluación para la remoción de HCN en las hojas se observaron resultados positivos en los 2 métodos, así como en los 4 tratamientos propuestos empleando como tiempo límite de operación en el hervido 10 minutos, evidenciando una mejor eficiencia en la maceración con bicarbonato de sodio llegando a obtenerse un 91.1% de remoción de HCN.

Los resultados de este estudio sugieren que la concentración de cianuro residual en las hojas de yuca después de la aplicación de los tratamientos investigados no está influenciada por la variedad de

yuca utilizada. Esto indica que, independientemente de la variedad de yuca, los tratamientos propuestos muestran ser efectivos en la reducción de la concentración de cianuro. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para el desarrollo de estrategias de tratamiento que puedan mejorar la seguridad alimentaria y la calidad de las hojas de yuca como alimento.

Finalmente se puede observar que el desarrollo experimental realizado permitió en este proyecto evidenciar el acercamiento de las hojas de yuca como un potencial alimento cuya eliminación del contenido de HCN implica operaciones sencillas y reproducibles además de efectivas. Así mismo, la concentración de HCN en las hojas analizadas demuestran su alto valor agregado como material para el desarrollo de alternativas a procesos a nivel industrial aprovechando la bioquímica de la degradación enzimática de la linamarina.

8.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar la extracción de la enzima linamarasa seleccionando una raíz en estado de sobremaduración, preferiblemente en lo posible con un parénquima ancho para facilitar la preparación de la materia prima a la hora de pelar y homogeneizar, asegurando gran cantidad de tejido rico en la enzima proporcionando mayor cantidad a precipitar.

Para futuras experiencias, es recomendable iniciar la toma de la medida de absorbancia en la solución de mayor concentración e ir secuencialmente hasta la menor, esto debido a la rápida disminución de absorbancia por el comportamiento de la reacción colorimétrica. De igual forma tener presente el pH de manera constante debido a la susceptibilidad del analito con los reactivos.

Se sugiere tener siempre presente la peligrosidad que conlleva la manipulación de varios de los reactivos implícitos en el desarrollo del proyecto, principalmente en la curva de calibración. Por ello es importante el uso de los equipos de protección personal para evitar la exposición de agentes químicos, especialmente al HCN y la Cloramina-T usados en la colorimetría de manera frecuente.

Para un análisis con mayor precisión del contenido de HCN en un conjunto de plantas, se aconseja la preparación de un espacio exclusivo para dicha práctica cuyas condiciones ambientales sean controladas lo mayormente posible, así como la realización de un diseño de experimentos que facilite evidenciar la variación de niveles de HCN disminuyendo el posible ruido estadístico presentado por

factores biológicos. Esta idea se recomienda debido a la limitación encontrada durante la ejecución del proyecto por las condiciones climáticas presentadas en los periodos de recolección de las muestras.

Es aconsejable profundizar la relación que tienen las enzimas que participan en la síntesis de la linamarina con la cantidad de dicha molécula que pueda producirse en las hojas, esto con el fin de buscar estrategias alternas, o en su defecto complementarias para los tratamientos de eliminación de HCN en las hojas para así mejorar la inocuidad del material para uso alimentario sin afectar el contenido proteico con las mismas.

Para futuras investigaciones, se recomienda tener en cuenta una reproducibilidad mayor para la cuantificación de HCN en hojas de yuca, así como profundizar la variación del nivel de este tóxico entre individuos de la misma y entre variedades. De igual forma es importante llevar a cabo una profundización en cuanto a la normatividad al consumo en específico de las hojas, puesto a que no existe un apartado que indique de manera regulatoria una dosis segura de las hojas como componente alimentario-soportada por estudios toxicológicos tal como ocurre con la raíz y sus productos.

Bibliografía

- Aguilar, E., Rodríguez, A., Saborío, D., Morales, J., Chacón, M., Rodríguez, L., Acuña, P., Torres, S., & Gómez, Y. (2017). *Manual del cultivo de Yuca*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10918.pdf>
- Anjani, N., Hamzah, B., & Abram, H. (2021). Analysis of Cyanide Contents in Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) Based on Boiling Time with Formation of Hydrindantin Complex by Using UV-Vis Spectrophotometry. *Jurnal Akademika Kimia*, 10(1), 49–52. <https://doi.org/10.22487/J24775185.2021.V10.I1.PP49-52>
- Appenteng, K., Krueger, R., Johnson, C., Ingold, H., Bell, R., Thomas, L., & Greenlief, C. (2021). Cyanogenic Glycoside Analysis in American Elderberry. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 1384, 26(5), 1384. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26051384>
- Arias, J., Ramos, L., Acosta, L., Camacho, H., & Marín, Z. (2005). *Diversidad de yucas (Manihot esculenta Crantz) entre los Ticuna: Riqueza cultural y genética de un producto tradicional*.
- Aristizábal, J., & Sánchez, T. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. *Boletín de servicios agrícolas de la FAO - 163*, 153. <https://doi.org/10.4060/CC2323EN>
- Arrázola, G. (2002). Análisis de glucósidos cianogénicos en variedades de almendro : implicaciones en la mejora genética Tesis Doctoral [Universidad de Alicante]. En *Universidad de Alicante*. <http://hdl.handle.net/10045/3219>
- Arrázola, G., Grané, N., Martín, M. L., & Dicenta, F. (2013). Determinación de los compuestos cianogénicos amigdalina y prunasina en semillas de almendras mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Química Aplicada y Analítica Rev. Colomb. Quim*, 42(1), 23–30.
- Arrázola, G., Sánchez, R., Dicenta, F., & Grané, N. (2012). Art Content of the cyanogenic glucoside amygdalin in almondRG. *Agronomía Colombiana*, 30, 6. <https://www.researchgate.net/publication/333982839>
- Baird, B., Eaton, D., & Rice, W. (2017). Standard Methods for the examination of water and wastewater. En American Public Health Association (23a ed.).

- Belcher, R. (1969). Gilbert H. , Quantitative Chemical Analysis, 2nd Edn. *Analytica Chimica Acta*, 45(1). [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)89411-8](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)89411-8)
- Bjarnholt, N., & Møller, B. (2008). Hydroxynitrile glucosides. En *Phytochemistry* (Vol. 69, Número 10, pp. 1947–1961). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.018>
- Bradbury, J., Bradbury, G., & Egan, V. (1994). Comparison Of Methods Of Analysis Of Cyanogens in Cassava. *Acta Horticulturae*, 375, 87–96. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.1994.375.6>
- Bradbury, J. , & Denton, C. (2014). Mild method for removal of cyanogens from cassava leaves with retention of vitamins and protein. *Food Chemistry*, 158, 417–420. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.02.132>
- Brimer, L., Abrahamsson, M., Mlingi, N., & Rosling, H. (1998). A modified microdiffusion assay with solid-state detection for the determination of total cyanogens (CNp) in cassava flour. Comparison to the method of O'Brien et al. (1991). *Food Chemistry*, 62(2), 239–242. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00152-0)
- Bromer, W., Egge, H., Eiter, K., Eyjólfsson, R., Gross, D., Hikino, H., Hikino, Y., Jackson, B. G., Morin, R. B., Pike, J. E., Warnhoff, E. W., Wiegandt, H., & Wong, E. (1970a). *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (W. Herz, H. Grisebach, & A. I. Scott, Eds.; Vol. 28). Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-7123-3>
- Casanto, E. (2001). *Varietades de la Yuca Entre los Ashánincas* (M. Pinto, Ed.; Vol. 1). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ceballos, H., & Ospina, B. (2003). La yuca en el Tercer Milenio. En *CIAT: CLAYUCA: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, FENAVI* (Primera Edición). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Chaiareekitwat, S., Latif, S., Mahayothee, B., Khuwijitjaru, P., Nagle, M., Amawan, S., & Müller, J. (2022). Protein composition, chlorophyll, carotenoids, and cyanide content of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) as influenced by cultivar, plant age, and leaf position. *Food Chemistry*, 372, 131173. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131173>
- Chaouali, N., Gana, I., Dorra, A., Khelifi, F., Nouioui, A., Masri, W., Belwaer, I., Ghorbel, H., & Hedhili, A. (2013). *Potential Toxic Levels of Cyanide in Almonds (Prunus amygdalus), Apricot Kernels (Prunus armeniaca), and Almond Syrup. 2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/610648>
- Codex Alimentarius. (1995). *General Standard for Contaminants and Toxins in Food And Feed-CXS 193-1995*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Conn, E. (1980). Cyanogenic Compounds. En *Ann. Rev. Plant Physiol* (Vol. 31).
www.annualreviews.org
- Conn, E., Knowles, J., Ingvorsen, K., Godtfredsen, E., Tsuchiya, T., Wyatt, M Linton, A., Halkier, A., Scheller, V., Moller, L., Poulton, E., Manning, K., Hughes, A., Sharif, L., Dunn, A., Oxtoby, E., Nahrstedt, A., Jones, A., Brimer, L., Westley, J., ... Lieberei, R. (1988a). Ciba Foundation Symposium 140 - Cyanide Compounds in Biology (D. Evered & S. Harnett, Eds.). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470513712>
- Cooke, R. (1978). An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*manihot esculenta* crantz). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(4).
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290408>
- Cooke, R. (1979). Enzymatic assay for determining the cyanide content of cassava and cassava products. *CIAT'S*.
- Comara, L., Xiao, J., & Burlando, B. (2016). Therapeutic Potential of Temperate Forage Legumes: A Review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56 Suppl 1, S149–S161.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1038378>
- Da Ponte, J. (2006). *Cartilha da manipueira: uso do composto como insumo agrícola* (Tercera Edición). Banco do Nordeste do Brasil.
- del Cueto, J., Møller, L., Dicenta, F., & Sánchez-Pérez, R. (2018). β -Glucosidase activity in almond seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126, 163–172.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.028>
- Deng, P., Cui, B., Zhu, H., Phommakoun, B., Zhang, D., Li, Y., Zhao, F., & Zhao, Z. (2021). Accumulation Pattern of Amygdalin and Prunasin and Its Correlation with Fruit and Kernel Agronomic Characteristics during Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Kernel Development. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 397, 10(2), 397. <https://doi.org/10.3390/FOODS10020397>
- Díaz, P., & López, C. (2021). Yuca: Pan y Carne, Una Alternativa Potencial para Hacer Frente al Hambre Oculta. *Acta Biológica Colombiana*, 26(2), 235–246.
<https://doi.org/10.15446/abc.v26n2.84569>
- Dunstan, W. R., Henry, T. A., & Auld, S. J. M. (1906). Cyanogenesis in Plants. Part IV.--The Occurrence of Phaseolunatin in Common Flax (*Linum usitatissimum*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 78(523), 145–152. <http://www.jstor.org/stable/80155>
- Dzombak, A., Ghosh, S., & Wong, M. (2005). Cyanide in Water and Soil. Eds.; Primera Edición. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420032079>

- Eksittikul, T., & Chulavatnatol, M. (1988). Characterization of cyanogenic β -glucosidase (Linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 266(1). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90257-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90257-3)
- Essers, A., Bosveld, M., Van Grift, D., & Voragen, J. (1993). Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63(3). <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740630305>
- Ganjewala, D., Kumar, S., Devi, A., & Ambika, K. (2010). Advances in cyanogenic glycosides biosynthesis and analyses in plants: A review. *Szegediensis, Acta Biologica*, 54(1), 1–14. <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>
- Gleadow, M., Bjarnholt, N., Jorgensen, K., Fox, J., & Miller, R. (2011). Cyanogenic glycosides (pp. 283–310). Stadium Press LLC. https://www.researchgate.net/publication/223138629_CYANOGENIC_GLYCOSIDES
- Gleadow, M., & Møller, L. (2014). Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annual review of plant biology*, 65, 155–185. <https://doi.org/10.1146/ANNUREVPLANT-050213-040027>
- Glorio, G. (2020). *Metodo di Liebig-Denigés: Argentometria* | “Ripetiamo Insieme: ACF1, #9.1”. <https://www.youtube.com/watch?v=-Mcwt97X3NI&list=LL&index=7&t=185s>
- Gómez, G., & Valdivieso, M. (1985). Cassava foliage: Chemical composition, cyanide content and effect of drying on cyanide elimination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(6), 433–441. <https://doi.org/10.1002/JSFA.2740360602>
- Gomez, A., Berkoff, C., Gill, K., Iavarone, T., Lieberman, E., Ma, M., Schultink, A., Karavolias, G., Wyman, K., Chauhan, D., Taylor, J., Staskawicz, J., Cho, J., Rokhsar, S., & Lyons, B. (2022). CRISPR-Cas9-mediated knockout of CYP79D1 and CYP79D2 in cassava attenuates toxic cyanogen production. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1079254. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1079254/BIBTEX>
- Gundersen, E., Christiansen, C., Jørgensen, K., & Lübeck, M. (2022). Production of leaf protein concentrates from cassava: Protein distribution and anti-nutritional factors in biorefining fractions. *Journal of Cleaner Production*, 379, 134730. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.134730>
- Halter, G., Chen, D., Hild, N., Mora, A., Stoessel, R., Koehler, M., Grass, N., & Stark, J. (2013). Induced cyanogenesis from hydroxynitrile lyase and mandelonitrile on wheat with polylactic acid multilayer-coating produces self-defending seeds. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(3), 853–858. <https://doi.org/10.1039/C3TA14249C>

- Harenčár, Ľ., Ražná, K., & Nôžková, J. (2021). Cyanogenic Glycosides - Their Role and Potential in Plant Food Resources. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 11(3), e4771–e4771. <https://doi.org/10.15414/JMBFS.4771>
- Hawashi, M., Sitania, C., Caesy, C., Aparamarta, W., Widjaja, T., & Gunawan, S. (2019). Kinetic data of extraction of cyanide during the soaking process of cassava leaves. *Data in Brief*, 25, 104279. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2019.104279>
- Hillocks, J., & Thresh, M. (2002). *Cassava: biology, production and utilization*. Wallingford (United Kingdom) CABI. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UI.JS>
- Hinostroza, F., Mendoza, M., Navarrete, M., & Muñoz, X. (2014). *Cultivo de yuca en el Ecuador (436)*. Portoviejo, EC: INIAP, Estación Experimental Portoviejo, Programa Horticultura-Yuca, 2014. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5214>
- Hue, K., Van, D. T., Ledin, I., Wredle, E., & Spörndly, E. (2012). Effect of Harvesting Frequency, Variety and Leaf Maturity on Nutrient Composition, Hydrogen Cyanide Content and Cassava Foliage Yield. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(12), 1691–1700. <https://doi.org/10.5713/AJAS.2012.12052>
- ICSC 0492 - Cianuro De Hidrógeno, Licuado. (s/f). Recuperado el 18 de noviembre de 2022, de https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=0492&p_version=2
- Ikediodi, O., Onyia, G., & Eluwah, E. (1980). A Rapid and Inexpensive Enzymatic Assay for Total Cyanide in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and Cassava Products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(12). <https://doi.org/10.1271/bbb1961.44.2803>
- Jansen Van Rijssen, W., Morris, J., & Eloff, N. (2013). Food safety: Importance of composition for assessing genetically modified cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8333–8339. https://doi.org/10.1021/JF401153X/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2013-01153X_0002.JPEG
- Juma, S., Mukami, A., Mweu, C., Ngugi, P., & Mbinda, W. (2022). Targeted mutagenesis of the CYP79D1 gene via CRISPR/Cas9-mediated genome editing results in lower levels of cyanide in cassava. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1009860. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1009860/BIBTEX>
- KEGG DOSA Os04t0474900-01. (s/f). Recuperado el 6 de septiembre de 2023, de https://www.genome.jp/dbget-bin/get_linkdb?-t+compound+dosa:Os04t0474900-01
- Kongsawadworakul, P., Viboonjun, U., Romruensukharom, P., Chantuma, P., Ruderman, S., & Chrestin, H. (2009). The leaf, inner bark and latex cyanide potential of *Hevea brasiliensis*: evidence for involvement of cyanogenic glucosides in rubber yield. *Phytochemistry*, 70(6), 730–739. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2009.03.020>

- Kotopka, J., & Smolke, C. D. (2019). Production of the cyanogenic glycoside dhurrin in yeast. *Metabolic Engineering Communications*, 9, e00092. <https://doi.org/10.1016/J.MEC.2019.E00092>
- Latif, S., & Müller, J. (2015). Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 147–158. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2015.04.006>
- Latif, S., Zimmermann, S., Barati, Z., & Müller, J. (2019). Detoxification of Cassava Leaves by Thermal, Sodium Bicarbonate, Enzymatic, and Ultrasonic Treatments. *Journal of Food Science*, 84(7), 1986–1991. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14658>
- Lebot, V. (2008). Tropical root and tuber crops: Cassava, sweet potato, yams, aroids. En *Tropical Root and Tuber Crops: Cassava, Sweet Potato, Yams, Aroids*. <https://doi.org/10.1079/9781845934248.0000>
- Llorens, J. (2004). Enfermedades neurológicas asociadas al consumo de variedades de mandioca con alto contenido en gluconitrilos. *Endocrinología y Nutrición*, 51(7), 418–425. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(04\)74638-0](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(04)74638-0)
- Mahecha, I., & Gavilán, C. (2021). *Evaluación de hidrólisis enzimática en la semilla del durazno (Prunus Persica) para la producción de ácido cianhídrico y benzaldehído* [Fundación Universidad de América]. <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/8658>
- Marcía, J., Gil, Á., Varela, F., Henríquez, M., Sosa, L., Pérez, S. F., & Ruíz, S. J. (2022). Cassava detoxification and ereba preparation: contribution to strengthening the food security and sovereignty of the Garífuna people in Honduras. *Bionatura*, 7(3). <https://doi.org/10.21931/RB/2022.07.03.14>
- Mcmahon, J., Sayre, R., & Zidenga, T. (2022). Cyanogenesis in cassava and its molecular manipulation for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 73(7), 1853–1867. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab545>
- Milena, S., Gutiérrez, D., Aragón, G., Escobar, A., Ortiz, D., Sánchez, T., Imbachí, P., & Pachón, H. (2011). Evaluación De La Composición Nutricional, Antinutricional y Biodisponibilidad in Vitro de Diferentes Extractos Foliare. *Revista chilena de nutrición*, 38(2), 168–176. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182011000200007>
- Minagricultura. (2021). *Cadena Productiva de la Yuca*. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Yuca/Documentos/2021-03-31%20Cifras%20Sectoriales%20yuca.pdf>
- Montagnac, J., Davis, C., & Tanumihardjo, S. (2009). Processing techniques to reduce toxicity and antinutrients of Cassava for use as a staple food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(1). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00064.x>

- Moo, J., Azorín, P., Ramírez, N., & Moreno, P. (2020). State of the production and consumption of pesticides in Mexico | Estado de la producción y consumo de plaguicidas en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2), 1DUMMUY
- Morant, V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, M., Sánchez, R., Møller, L., & Bak, S. (2008). β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. En *Phytochemistry* (Vol. 69, Número 9, pp. 1795–1813). *Phytochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.03.006>
- Nyirenda, K. (2020). Toxicity Potential of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants. *Medical Toxicology*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.91408>
- Nzwalo, H., & Cliff, J. (2011). Konzo: from poverty, cassava, and cyanogen intake to toxico-nutritional neurological disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001051>
- Ogbonna, C., Braatz de Andrade, R., Rabbi, Y., Mueller, A., Jorge de Oliveira, E., & Bauchet, J. (2021). Large-scale genome-wide association study, using historical data, identifies conserved genetic architecture of cyanogenic glucoside content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root. *The Plant Journal*, 105(3), 754–770. <https://doi.org/10.1111/TPJ.15071>
- Ospina, M. (2018). *Evaluación de propiedades nutricionales y de calidad comercial en siete centros de diversidad de yuca con genotipificación para contenido de cianuro*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/63355>
- Ospina, M., Pizarro, M., Tran, T., Ricci, J., Belalcazar, J., Luna, L., Londoño, F., Salazar, S., Ceballos, H., Dufour, D., & Becerra Lopez-Lavalle, L. A. (2021). Cyanogenic, carotenoids and protein composition in leaves and roots across seven diverse population found in the world cassava germplasm collection at CIAT, Colombia. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(3). <https://doi.org/10.1111/ijfs.14888>
- Parra Olarte, J. L. (2019). *Subsector Productivo de la Yuca*. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Yuca/Documentos/2019-06-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Parra, L. (2019). Subsector Productivo de la Yuca. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Yuca/Documentos/2019-06-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Pičmanová, M., Neilson, H., Motawia, S., Olsen, E., Agerbirk, N., Gray, J., Flitsch, S., Meier, S., Silvestro, D., Jørgensen, K., Sánchez, R., Møller, L., & Bjarnholt, N. (2015). A recycling pathway for cyanogenic glycosides evidenced by the comparative metabolic profiling in three cyanogenic plant species. *Biochemical Journal*, 469(3), 375–389. <https://doi.org/10.1042/BJ20150390>

- Poulton, J. (1990). Cyanogenesis in Plants. *Biological Reviews*, 5(2), 126–141. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1930.tb00896.x>
- Quiroga, P. (2009). *Revisión de la toxicocinética y la toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros*. <https://www.researchgate.net/publication/262441449>
- Ramírez, V. (2011). Toxicidad del cianuro. Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71(1). <https://doi.org/10.15381/anales.v71i1.74>
- Rijssen, W., Morris, J., & Eloff, N. (2013). Food safety: Importance of composition for assessing genetically modified cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8333–8339. https://doi.org/10.1021/JF401153X/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2013-01153X_0002.JPEG
- Rivadeneira, E., Rosas, C., Vázquez, A., Díaz, R., & Rodríguez, L. (2019). Efecto de la acetona cianohidrina, un derivado de la yuca, sobre la actividad motora y la función renal y hepática en ratas Wistar. *Neurología*, 34(5), 300–308. <https://doi.org/10.1016/J.NRL.2017.01.004>
- Rodas, I. (2000). *Ingenio yuquero en el Cauca: estudio de factibilidad*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. <https://hdl.handle.net/10568/54087>
- Rodríguez, R., & Suárez, B. (2021). Analysis of Cyanogenic Compounds Derived from Mandelonitrile by Ultrasound-Assisted Extraction and High-Performance Liquid Chromatography in Rosaceae and Sambucus Families. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(24). <https://doi.org/10.3390/molecules26247563>
- Schmidt, F., Cho, S., Olsen, C., Yang, S., Møller, B., & Jørgensen, K. (2018). Diurnal regulation of cyanogenic glucoside biosynthesis and endogenous turnover in cassava. *Plant Direct*, 2(2). <https://doi.org/10.1002/pld3.38>
- Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, K., del Mazo, J., Grasl, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Leblanc, C., Nebbia, S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Vleminckx, C., Wallace, H., Benford, D., Brimer, L., Mancini, R., ... Schwerdtle, T. (2019). Evaluation of the health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in foods other than raw apricot kernels. *EFSA Journal*, 17(4), e05662. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5662>
- Senning, A. (2007). Elsevier's dictionary of chemoetymology : the whies and whences of chemical nomenclature and terminology. 433. <https://books.google.com/books?id=Fl4sdCYrq3cC&pg=PA344>
- Sun, Z., Zhang, K., Chen, C., Wu, Y., Tang, Y., Georgiev, M. I., Zhang, X., Lin, M., & Zhou, M. (2018). Biosynthesis and regulation of cyanogenic glycoside production in forage plants.

- Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/S00253-017-8559-Z/METRICS>
- Tanaka, T., Kimura, K., Kan, K., Katori, Y., Michishita, K., Nakano, H., & Sasamoto, T. (2020). Quantification of amygdalin, prunasin, total cyanide and free cyanide in powdered loquat seeds. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1778186>
- Thodberg, S., Sørensen, M., Bellucci, M., Crocoll, C., Bendtsen, A. K., Nelson, D. R., Motawia, M. S., Møller, B. L., & Neilson, E. H. J. (2020). A flavin-dependent monooxygenase catalyzes the initial step in cyanogenic glycoside synthesis in ferns. *Communications Biology* 2020 3:1, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01224-5>
- Torkaman, P., Veiga, M., de Andrade, P., Oliveira, A., Motta, S., Jesús, L., & Lavkulich, M. (2021). Leaching gold with cassava: An option to eliminate mercury use in artisanal gold mining. *Journal of Cleaner Production*, 311, 127531. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.127531>
- Umuhozariho, M., Shayo, N., Msuya, J., & Sallah, P. (2014). Cyanide and selected nutrients content of different preparations of leaves from three cassava species. *African Journal of Food Science*, 8(3), 122–129. <https://doi.org/10.5897/AJFS2013.1100>
- Vetter, J. (2017). *Plant Cyanogenic Glycosides* (pp. 287–317). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6464-4_19
- Villada, W. (2010). *Determinación experimental de las condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática de almidón de yuca nativa de la región amazónica en la ciudad de Leticia* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/7496>
- Wink, M. (2010). Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition. En *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1002/9781444320503>
- Yeoh, H., Tatsuma, T., & Oyama, N. (1998). Monitoring the cyanogenic potential of cassava: the trend towards biosensor development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 17(4), 234–240. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00009-0)
- Zagrobelny, M., Bak, S., & Møller, B. L. (2008). Cyanogenesis in plants and arthropods. En *Phytochemistry* (Vol. 69, Número 7, pp. 1457–1468). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.019>
- Zagrobelny, M., Bak, S., Rasmussen, V., Jørgensen, B., Naumann, M., & Møller, L. (2004). Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry*, 65(3), 293–306. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2003.10.016>

- Zagrobelny, M., de Castro, P., Møller, B. L., & Bak, S. (2018). Cyanogenesis in Arthropods: From Chemical Warfare to Nuptial Gifts. *Insects* 2018, Vol. 9, Page 51, 9(2), 51. <https://doi.org/10.3390/INSECTS9020051>
- Zagrobelny, M., & Møller, L. (2011). Cyanogenic glucosides in the biological warfare between plants and insects: The Burnet moth-Birdsfoot trefoil model system. *Phytochemistry*, 72(13), 1585–1592. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2011.02.023>
- Zhong, Y., Xu, T., Ji, S., Wu, X., Zhao, T., Li, S., Zhang, P., Li, K., & Lu, B. (2021). Effect of ultrasonic pretreatment on eliminating cyanogenic glycosides and hydrogen cyanide in cassava. *Ultrasonics Sonochemistry*, 78, 105742. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2021.105742>
- Zuk, M., Pelc, K., Szperlik, J., Sawula, A., & Szopa, J. (2020). Metabolism of the Cyanogenic Glucosides in Developing Flax: Metabolic Analysis, and Expression Pattern of Genes. *Metabolites* 2020, Vol. 10, Page 288, 10(7), 288. <https://doi.org/10.3390/METABO10070288>

Anexos

ANEXO A Manipulación de reactivos

Ácido Cianhídrico:

CAS: 74-90-8

Nº ONU: 1051

CE: 200-821-6 **Información fisicoquímica:**

Fórmula: HCN

Masa molecular: 27.03

Punto de ebullición: 26°C

Punto de fusión: -13°C

Densidad relativa (agua = 1): 0.69 (líquido)

Solubilidad en agua: miscible

Presión de vapor, kPa a 20°C: 82.6

Densidad relativa de vapor (aire = 1): 0.94

Punto de inflamación: -18°C c.c.

Temperatura de autoignición: 538°C

Límites de explosividad, % en volumen en el aire:
5.6-40.0

Coefficiente de reparto octanol/agua como log
Pow: -0.25

Clasificación y etiquetado:

- Líquido y vapores extremadamente inflamables
- Mortal en caso de ingestión, en contacto con la piel o si se inhala
- Provoca irritación ocular
- Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

Envasado:

- Contaminante marino.
- No transportar con alimentos y piensos.

Exposición y efectos sobre la salud:

Vías de exposición

La sustancia se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión.

Efectos de exposición de corta duración

Estado físico; aspecto: líquido o gas incoloro de olor característico.

Peligros físicos

El gas se mezcla bien con el aire, formándose fácilmente mezclas explosivas.

Peligros químicos

La sustancia puede polimerizar espontáneamente si no está estabilizada. La sustancia puede polimerizar por calentamiento intenso bajo la influencia de bases, por encima del 2% de agua, o si no está estabilizada químicamente. Esto genera peligro de incendio o explosión. Por combustión, formación de gases tóxicos y corrosivos incluyendo óxidos de nitrógeno. La disolución en agua es un ácido débil. Reacciona violentamente con oxidantes y cloruro de hidrógeno en mezclas alcohólicas. Esto genera peligro de incendio y explosión.

La sustancia irrita los ojos y el tracto respiratorio. La sustancia puede irritar la piel. La sustancia puede afectar a la respiración celular. Esto puede dar lugar a convulsiones y pérdida del conocimiento. La exposición podría causar la muerte. Se recomienda vigilancia médica.

Riesgo de inhalación

La evaporación de esta sustancia a 20°C producirá muy rápidamente una concentración nociva de la misma en aire.

Efectos de exposición prolongada o repetida

La sustancia puede afectar a la tiroides.

Almacenamiento:

Almacenar solamente si está estabilizado. A prueba de incendio. Fresco. Separado de alimentos y piensos y materiales incompatibles. Ver Peligros

Químicos. Almacenar en un área sin acceso a desagües o alcantarillas.

- VLA-ED: (como CN) 0,9 ppm; 1 mg/m³
- VLA-EC: (como CN) 4,5 ppm; 5 mg/m³

Notas: vía dérmica.

Nº de índice (clasificación y etiquetado armonizados conforme al Reglamento CLP de la UE): 006-006-00-X . Clasificación UE

Transporte

Clasificación ONU

Clase de Peligro ONU: 6.1; Peligro Secundario

ONU: 3; Grupo de Embalaje/Envase ONU: I

Límites de exposición profesional (INSST 2022):

Tomado de: (ICSC 0492 - CIANURO DE HIDRÓGENO, LICUADO, s/f)
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=0492&p_version=2

ANEXO B
LISTADO DE MATERIAL VOLUMÉTRICO

N°	Nombre	Clase	Características
1	Vasos de precipitado	A	10 ml \pm 0.025 ml 1000 ml \pm 0,4 ml
2	Micropipeta	Volumen variable	100 – 1000 ul
3	Micropipeta	Volumen variable	20 – 200 ul
4	Pipeta graduada	AS	Con división de escala de 10/0.1 mL \pm 0.05 mL
5	Tubos Falcon	-	Con división de escala de 15/1 mL \pm 0.05 mL
6	Tubos Falcon	-	Con división de escala de 50/5 mL \pm 0.05 mL
7	Frascos de almacenamiento Schott	A	500 ml \pm 0.025 ml 1000 ml \pm 0,4 ml

ANEXO C
LISTADO DE REACTIVOS

No.	Nombre	Grado	Características
1	Ácido acético glacial	Sigma Aldrich	Concentración al 100%
2	Agua	Destilada	-
4	Ácido ortofosfórico	Sigma Aldrich	Concentración al 85%
5	Ácido sulfúrico	Sigma Aldrich	Concentración al 97%
6	Sulfato de amonio	Merck	Pureza al 98%
7	Ácido clorhídrico	Merck	Concentración 36%(p/v)
8	Hidróxido de sodio en perlas	Merck	Pureza 99%
9	Cianuro de potasio	Sigma Aldrich	Pureza 98%
10	Ácido isonicotínico	Sigma Aldrich	Pureza 98%
11	Ácido 1-3 dimetilbarbitúrico	Sigma Aldrich	Pureza 98%
12	Cloramina T	Merck	Pureza al 97%

ANEXO D
LISTADO DE EQUIPOS

No.	Nombre	Clase	Características
1	Espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-VIS)	Modelo 1200 S/N WP 14051405045	Rango de longitud de onda: 190-1100nm
2	Centrífuga Thermofisher	Modelo ST16R S/N 23868	Capacidad de 6 Tubos con sistema de refrigeración y 11400xg (fuerza centrífuga relativa)
3	Medidor de pH Hanna Instruments	Modelo 211	Electrodo de bulbo de vidrio Rango de medición 0- 14pH Calibración regular- compensación automática de temperatura
4	Balanza analítica	OHAUS S/N 1183 1225111211	Capacidad máxima 310g Legibilidad: 0.001g

ANEXO E
EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL EMPLEADOS

No.	Nombre	Grado	Características
1	Respirador de pieza facial de media cara	3M	Número 6100
2	Filtros de respirador de pieza facial de media cara para vapores orgánicos y gases ácidos	3M	Número 6003 Aprobado por la NIOSH contra contaminantes por encima de 10 veces los niveles límite de exposición permisible



ANEXO F

Protocolo para Determinación de la Concentración de Cianuro en Hojas de Yuca mediante Espectrofotometría UV-VIS

Referencias del método analítico empleado:

El método “Determinación de cianuro de cianógenos específicos en productos de yuca mediante espectrofotometría UV-VIS” , es un método aceptado por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

1. Preparación de enzima

El procedimiento para la cuantificación de cianuro requiere de la participación de un grupo de enzimas conocidas como emulsinas, conformadas por glucosidasas e hidroxinitriloliasas. Estas enzimas permitirán descomponer la linamarina, cianógeno presente en la yuca a cianuro mediante hidrólisis. Este grupo de enzimas al encargarse de la degradación de la linamarina son conocidas también como linamarasas.

A continuación, se denotan los pasos a seguir:

- *Preparación de reactivos:*

Buffer acetato 0.1M pH 5.5

1000mL

Añadir 5.7mL de ácido acético glacial (100%) en 994.3mL de agua destilada para preparar 1L de buffer

200mL

Añadir 1.14mL de ácido acético glacial (100%) en 198.86mL de agua destilada para preparar 1L de buffer

Hidróxido de sodio 5M

1000mL

Añada 200g de NaOH en 1L de agua destilada, agite hasta tener una solución homogénea con suma precaución de los gases generados en la reacción. Es recomendable realizar el proceso en una cabina de extracción

Ajuste el pH del buffer acetato con la solución de hidróxido de sodio preparado con ayuda de un medidor de pH previamente calibrado.

- *Preparación de material vegetal*

Pesar 100g de tejido parenquimatoso unido a la pulpa de raíz de yuca en trozos pequeños de 0.2 cm de alto por 0.5 cm de ancho aproximadamente

Añada 200mL de buffer en un procesador junto con el material vegetal en trozos para homogeneizar la mezcla. Puede realizar esta operación para diferentes volúmenes recomendando mantener una concentración de 50% (p/v).

Lleve la solución resultante a centrifugación durante 30 minutos a una temperatura de 20°C y 10000g de rotación en tubos Falcon preferiblemente de 50 mL.

Cuidadosamente separe el sobrenadante resultante para luego realizar una solución al 60% de saturación con sulfato de amonio; para ello añada 92g de sulfato de amonio en 200mL de sobrenadante. Ajuste la cantidad de sulfato necesario en el volumen resultante para lograr un 60% de saturación si es necesario.

Lleve a almacenamiento en frío (4°C) la solución obtenida durante 16-24h.

- *Separación de la enzima*

La enzima por acción de la fuerza centrífuga y por la disminución de la temperatura de la solución permite la precipitación de la enzima en forma de pellet, por lo que se deben seguir los siguientes pasos:

Prepare la refrigeración de la centrífuga a 2°C, espere 10 minutos.

Prepare una solución buffer fosfato 0.1M de 1000mL empleando 6.8mL de ácido fosfórico al 85% en 994mL de agua destilada ajustando a un pH de 6.5 con la solución de hidróxido de sodio 5M preparada anteriormente.

En tubos Falcon de 50mL añada la solución refrigerada anteriormente y llévela a centrifugación a 2°C durante 30 minutos a 10000g. Observe si se presenta precipitado en el fondo de los tubos, si es necesario centrifugue durante 30 minutos adicionales.

Debe presentarse un resultado similar al siguiente:



Una vez obtenido el pellet, rápidamente separe el sobrenadante del precipitado y marque la zona del tubo con un círculo el lugar donde se encuentra el pellet

Si es necesario lleve a centrifugación nuevamente durante 15 minutos para obtener todo el precipitado posible.

En los tubos con el precipitado añada 12.5mL de buffer fosfato.

- *Aislamiento- purificación de la linamarasa*

En este momento se busca purificar la enzima de impurezas principalmente de linamarina, y sus productos derivados (acetona cianohidrina y cianuro) que pueden afectar medidas en procesos futuros de cuantificación. Por ello se lleva a cabo una diálisis que permite la separación de moléculas pequeñas mediante difusión, de un medio concentrado a un medio inocuo.

Prepare la membrana de diálisis sujetando uno de los dos extremos en sentido vertical con un gancho fijador.

El extremo que queda libre debe ser separado cuidadosamente con ayuda de una superficie fina e inocua, puede utilizarse una punta de micropipeta de 1mL para facilitar la apertura al penetrar en una esquina del doblez.

Cuando logre abrir un poco la membrana, inserte lentamente mediante una micropipeta de 1mL la solución con enzima obtenida en el paso anterior hasta lograr llenar la membrana

Cierre con el otro gancho la membrana y deje sumergida completamente en buffer fosfato de la siguiente manera:



Finalmente se deja reposar durante 2 horas y se renueva el medio inocuo (solución buffer) para asegurar la purificación de la enzima, esto debe realizarse 3 veces.

Una vez se cumplen las 6 horas, las muestras se distribuyen en tubos Falcon de 15mL almacenadas a -20°C . La conservación puede mantenerse hasta dos meses con la mayor actividad enzimática posible.

2. Evaluación de la actividad enzimática

En esta fase se revisa el comportamiento de las enzimas respecto a la liberación de cianuro proveniente de la linamarina. Para ello se evalúa de manera cualitativa mediante un proceso colorimétrico el cianuro remanente en forma de cloruro de cianógeno cuya coloración se percibe fácilmente en un tono azul-violeta.

Para la realización de esta etapa se requiere la preparación de los siguientes reactivos:

Reactivo de color Y:

El reactivo de color Y actúa como indicador para visualizar el cianuro en la solución, se compone de ácido isonicotínico y ácido 1-3 dimetilbarbitúrico. El ácido barbitúrico reaccionará con el cianuro formando un complejo visible por su estructura basada en la pirimidina, mientras que el ácido isonicotínico aumenta la selectividad de la reacción.

Cloramina T:

La cloramina tiene como función reaccionar con el cianuro presente y complementar la reacción con el ácido barbitúrico formando cloruro de cianógeno, así como aumentar la sensibilidad del ensayo al crearse este compuesto.

Hidróxido de sodio:

El hidróxido de sodio cumple un papel en mantener el cianuro liberado en la solución acuosa evitando la pérdida de analito por volatilidad.

- *Preparación de reactivos:*

Los reactivos deben prepararse con cuidado y los equipos de protección personal adecuados, los reactivos pueden emitir vapores tóxicos y pueden ser nocivos en caso de inhalación.

Reactivo de color Y: 15mL

Disolver 0.28g de hidróxido de sodio en 15mL de agua destilada (Es fundamental disolver este reactivo en primer lugar)

Disolver 0.525g de ácido 1-3 dimetilbarbitúrico en la solución de hidróxido de sodio

Disolver 0.43g de ácido isonicotínico

Cloramina T: 3mL

Disolver 30mg de Cloramina T en cristales en 3mL de agua destilada

Mantener refrigerado hasta su uso

Solución 0.2M de hidróxido de sodio : 1000mL (reutilizable)

Disuelva 40mL de solución de hidróxido de sodio 5M preparada anteriormente en 1000mL de agua destilada.

Patrón de linamarina 5mM:

Agregue 7mg de linamarina al 97% de pureza en un tubo Falcon de 15mL

Disuelva la linamarina con buffer fosfato 0.1M a un pH de 6.0

Siempre que vaya a realizar el proceso colorimétrico debe preparar en fresco los reactivos.

- *Colorimetría:*

En tubos Falcon de 15mL prepare 3 alícuotas de la enzima purificada usando como solvente buffer fosfato 0.1M con un pH de 6.0 de la siguiente manera:

Añada en cada tubo para los ensayos 0.5mL de patrón de linamarina, luego adicione 0.1mL, 0.2mL y 0,3mL de enzima para los tubos 1, 2 y 3 respectivamente

Realice un blanco para el control de linamarina y un blanco para el control de la enzima aparte de los 3 ensayos

Para el blanco de linamarina agregue 0.5mL de patrón de linamarina

Para el Blanco de enzima añada 0.1mL de enzima

Teniendo ya todas las muestras preparadas lleve a incubación durante 30 minutos a 30°C

Posteriormente adicione 0.6 mL de hidróxido de sodio 0.2M a cada tubo con el fin de fijar el cianuro generado y detener la hidrólisis enzimática

Después para todos los tubos, añada 2.8mL de buffer fosfato y 0.1mL de cloramina T en solución. Incube 5 minutos a temperatura ambiente

Finalmente adicione 0.6mL de reactivo color Y para la totalidad de los tubos y agite. Deje reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

Observe el cambio de coloración entre los tubos, finalizado el tiempo las muestras, a excepción del blanco de enzima deben presentar una coloración azul-violeta cuyo gradiente será más opaco hacia los ensayos con mayor volumen de enzima añadida.

Adicionalmente puede revisar la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro UV-VIS con una longitud de onda de 440nm. Sin embargo, no es necesario realizar este proceso para esta etapa.

3. Curva de calibración

Toda manipulación de cianuro debe realizarse en una campana de extracción con los elementos de protección personal, principalmente el empleo de una máscara para vapores orgánicos y gases ácidos de doble filtro.

Prepare en un desecador con ácido sulfúrico al 98% (agente desecante) 4g de cianuro de potasio en un vidrio de reloj. Realice este proceso con mucho cuidado, el cianuro de potasio es extremadamente tóxico y debe tener las medidas de protección personal adecuadas. El ácido sulfúrico emite vapores tóxicos y corrosivos por lo que se debe manipular cuidadosamente.

Deje en reposo el cianuro de potasio desecando durante 24 horas.

Para la cuantificación de cianuro en hojas de yuca se recomienda tener un rango de concentraciones entre 0 a 500 $\mu\text{g}_{\text{CN}}/\text{mL}$ para variedades cuya concentración se considere elevada, por otro lado, se puede aplicar un rango de 0 a 100 $\mu\text{g}_{\text{CN}}/\text{mL}$ para variedades de menor concentración.

Prepare 1L de buffer fosfato 0.1M ajustando a un pH de 8.0

- *Preparación de soluciones*

Solución madre de 500 $\mu\text{g}_{\text{CN}}/\text{mL}$

Prepare una solución de buffer fosfato e hidróxido de sodio 0.2M con un volumen de 500mL de la siguiente manera:

290mL de hidróxido de sodio

210mL de buffer fosfato

250mg de KCN (agregar en cámara de extracción con los EPP mencionados)

Ajuste a un pH de 8.0 con HCL 2M (preparar en campana de extracción con cuidado 62mL de HCL al 36% en 1000mL de agua).

En tubos Falcon de 15mL realice diluciones empleando 10mL como volumen final con buffer fosfato 0.1M a 8.0 pH en intervalos de 100 $\mu\text{g}_{\text{CN}}/\text{mL}$ con ayuda de la siguiente fórmula:

$$v_i = \frac{v_f C_f}{C_i}$$

Donde:

V_i: volumen inicial

V_f: Volumen final (10mL)

C_i: Concentración inicial

C_f: Concentración final (C_i-100)

Afore las soluciones a 10mL con buffer fosfato.

Solución madre de 100 $\mu\text{g}_{\text{CN}}/\text{mL}$

Prepare una solución de buffer fosfato e hidróxido de sodio 0.2M con un volumen de 500mL de la siguiente manera:

290mL de hidróxido de sodio

210mL de buffer fosfato

50mg de KCN (agregar en cámara de extracción con los EPP mencionados)

Ajuste a un pH de 8.0 con HCL 2M (preparar en campana de extracción con cuidado 62mL de HCL al 36% en 1000mL de agua).

En tubos Falcon de 15mL realice diluciones empleando 10mL como volumen final con buffer fosfato 0.1M a 8.0 pH en intervalos de 20 $\mu\text{g}_{\text{CN}}/\text{mL}$ con ayuda de la siguiente fórmula:

$$v_i = \frac{v_f C_f}{C_i}$$

Donde:

V_i : volumen inicial

V_f : Volumen final (10mL)

C_i : Concentración inicial

C_f : Concentración final (C_i-20)

Afore las soluciones a 10mL con buffer fosfato.

Recuerde preparar un blanco con buffer fosfato.

- *Preparación de reactivos (colorimetría)*

Reactivo de color Y: 15mL

Disolver 0.28g de hidróxido de sodio en 15mL de agua destilada (Es fundamental disolver este reactivo en primer lugar)

Disolver 0.525g de ácido 1-3 dimetilbarbitúrico en la solución de hidróxido de sodio

Disolver 0.43g de ácido isonicotínico

Cloramina T: 3mL

Disolver 30mg de Cloramina T en cristales en 3mL de agua destilada

Mantener refrigerado hasta su uso.

- *Procedimiento colorimétrico:*

Agregue 0.1mL de cloramina T a todas las muestras, preferiblemente inicie desde la solución más diluida hacia la más concentrada, agite y deje reposar 10 minutos.

Adicione 0.6mL de Reactivo Y a todas las muestras, de la misma manera que la cloramina T. Debe observarse un cambio en la coloración de las muestras desde un rosado tenue a un rojo anaranjado. Espere 10 minutos hasta que las muestras se tornen azul-violeta.

- *Lectura de absorbancia (espectrofotometría)*

Mientras se da la reacción colorimétrica, ajuste la longitud de onda a 440nm en el espectrofotómetro UV-VIS.

En una celda de cuarzo, añada con ayuda de una micropipeta 3mL de buffer fosfato para calibrar el equipo para lectura de absorbancia. Para ello inserte la celda con el buffer y oprima el botón 0A/100% T. Se debe registrar 0.000 en la pantalla del equipo.

Las muestras alcanzan su máxima absorbancia en un periodo de tiempo alrededor de 8 a 10 minutos, donde eventualmente irá disminuyendo, por lo que debe empezar a medir desde la muestra más concentrada hacia la más diluida.

Añada 3mL de muestra en una celda de cuarzo y registre la medida. Haga esto para todas las muestras incluyendo el blanco.

Se recomienda repetir la fase 3 desde por lo menos 2 veces adicionales para obtener resultados más precisos mediante análisis estadísticos.

Los residuos generados deben ser almacenados en la cámara de extracción en un contenedor sellado herméticamente.

4. Cuantificación de cianuro en hojas de yuca

En la fase final del método, es importante tener en cuenta que las plantas producen cianógenos en mayor cantidad cuando se encuentran en un nivel de desarrollo entre 5 a 7 meses de vida.

- *Recolección de muestras*

Recolecte las muestras que considere para realizar la cuantificación, teniendo en cuenta recolectar entre 1 a 6g de material por muestra. Mantenga las muestras húmedas y a una temperatura entre 2 a 4°C recomendablemente durante un tiempo menor a 24 horas.

- *Distribución y clasificación:*

Pese en una balanza por lo menos 1g de muestra triturada manualmente (trozos relativamente pequeños) y divida la cantidad en 2 partes iguales.

La primera parte debe depositarse en sobres de papel y deben estar rotulados adecuadamente

La segunda parte se debe rotular y almacenar en cajas de Petri.

- *Preparación extracto*

Las muestras almacenadas en cajas de Petri se destinarán para la cuantificación de cianuro; para ello es necesario preparar un medio de extracción que permitirá tener una mejor conservación del analito:

Medio de extracción: 2L

Añada lentamente 14mL de ácido fosfórico al 85% en 500mL de etanol al 96% en un matraz o un frasco Schott de 2L, finalmente afofe hasta completar el volumen máximo.

Según el peso que denotó para las muestras en la caja de Petri debe homogeneizar con ayuda de un procesador las hojas en el medio de extracción teniendo como referencia la siguiente proporción:

Por cada 4g de muestra se añade 50mL de medio de extracción.

Deposite el extracto resultante en tubos Falcon de 50mL y almacene a -20°C hasta su posterior manipulación.

Proceda a centrifugar las muestras en fase líquida durante 10 minutos a 25°C con 10000rpm

El sobrenadante resultante debe filtrarse al vacío:

Prepare el montaje de filtración al vacío como se muestra a continuación:



Elaboración propia en BioRender.com

Conecte la manguera más pronunciada de la bomba de vacío al matraz Kitasato y revise que al otro extremo de la bomba se encuentre la salida de aire completamente despejada.

Encienda la bomba y ajuste la presión de succión según lo vea necesario, agregue el extracto y espere a que se separe bien el contenido.

Lave los componentes del montaje y siempre use un nuevo filtro. Evite que la bomba succione agua.

Almacene el extracto en tubos Falcon de 15mL y lleve a -20°C .

- *Peso seco*

Las muestras guardadas en sobres se deben ingresar a un horno para secado durante 24h a 90°C . Registre el peso final de las muestras en una balanza.

- *Análisis de contenido de cianuro:*

En esta parte del proceso se debe tener sumo cuidado con la temperatura de las muestras a la hora de juntar las enzimas y el extracto de las hojas, puesto que se pueden ver afectadas las moléculas participes e inducir a pérdidas del cianuro por volatilización.

Prepare los reactivos para el procedimiento colorimétrico de manera similar que en las fases anteriores.

Prepare una solución de hidróxido de sodio 0.2M adicionalmente

Prepare 1000mL de buffer fosfato 0.1M a un pH de 6.0

En frascos herméticamente sellados añada 1mL de extracto de muestra junto con 0.4mL de buffer fosfato.

Añada 1 mL de enzima linamarasa (Inicio de la reacción de hidrólisis enzimática)

En un baño termostático incube los frascos durante 15 minutos a 30°C

Añada 0,6mL de hidróxido de sodio 0.2M y deje reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos (fijación del cianuro liberado)

Finalmente añada 2.8mL de buffer fosfato (ajuste de pH para facilitar la reacción colorimétrica pH 7-8)

El volumen resultante por cada muestra debe ser de 4mL.

Para revisar la concentración debe realizar el mismo procedimiento colorimétrico que se usó con la curva de calibración, pero a diferentes tiempos:

Agregue 0.1mL de cloramina T, agite y deje reposar 5 minutos

Agregue 0.6mL de reactivo Y (reactivo isonicotinato/1,3-dimetilbarbitúrico) y agite. Deje reposar 10 minutos

Mida en el espectrofotómetro calibrado con buffer fosfato 0.1M a 440nm

Registre la absorbancia resultante

Calcule la concentración de cianuro en mg/kg o ppm con ayuda de la siguiente fórmula:

$$HCN (ppm) = \frac{m_{HCN} F_{d1} F_{d2}}{V_{total} m_{ps}}$$

Donde:

$$m_{HCN} = \frac{A - b}{m}$$

$$F_{d1} = \frac{V_{total}}{V_{extracto}}$$

$$F_{d2} = \frac{V_{solvente}}{V_{extracto}}$$

m_{HCN} : µg/mL HCN leído de la curva de calibración, usando lecturas de absorbancia a 440 nm

V_{total} : Volumen final del tubo (4.7 mL)

F_{d1} : Factor de dilución 1

F_{d2} : Factor de dilución 2

$V_{solvente}$: Volumen de la solución del extracto

$V_{extracto}$: Volumen utilizado del extracto

m_{ps} : Masa de la muestra en peso seco

ANEXO H

Datos crudos utilizados para la cuantificación de HCN en hojas

Muestras Biológicas

Variedad	Réplica peso fresco (g)			Réplica peso seco (g)			Vf (mL)			Absorbancia			mHCN (µg/mL)			mHCN/Vt			HCN(ppm) (µg/g)			Media	D estandar	
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
	24	3.11	3.00	-	0.85	0.73	-	38	35	-	0.461	0.881	-	13.844535	53.160912	-	2.307422563	8.86015198	-	814.384434	3641.15835			-
CA10	3.10	-	-	0.67	-	-	38	-	-	0.327	-	-	1.3007391	-	-	0.216789846	-	-	97.0700803	-	-	97.0700803	-	97.0700803
CA11	2.34	3.12	3.14	0.67	0.75	0.68	23	28	33	0.621	0.417	0.691	28.822203	9.7256769	35.374932	4.803700435	1.62094615	5.895822	2150.91064	648.378459	2601.09794	1800.12901	1022.52832	
JA02	3.31	3.30	3.20	0.90	0.87	0.98	30	24	25	0.670	0.645	0.760	33.409113	31.068853	41.834051	5.568185533	5.17814212	6.97234184	1856.06184	1785.56625	2134.39036	1925.33948	184.442697	
S02	3.01	3.13	-	0.75	0.78	-	34	27	-	0.581	0.581	-	25.077786	25.077786	-	4.179630967	4.17963097	-	1671.85239	1607.55037	-	1639.70138	45.4683908	
S05	3.40	-	-	0.72	-	-	35	-	-	0.545	-	-	21.707811	-	-	3.617968446	-	-	1507.48685	-	-	1507.48685	-	1507.48685
S07	3.03	-	-	0.72	-	-	28	-	-	0.717	-	-	37.808803	-	-	6.301467158	-	-	2625.61132	-	-	2625.61132	-	2625.61132
T05	3.00	3.06	-	0.83	0.78	-	28	33	-	0.705	0.535	-	36.685478	20.771706	-	6.114246317	3.46195108	-	2209.96855	1331.51965	-	1770.7441	621.157176	
T08	2.45	-	-	0.72	-	-	33	-	-	0.662	-	-	32.66023	-	-	5.443371639	-	-	2268.07152	-	-	2268.07152	-	2268.07152
T09	3.30	3.30	-	0.76	0.79	-	33	30	-	0.930	0.467	-	1.5815703	14.406198	-	0.263595056	2.40103298	-	104.05068	911.784677	-	507.917679	571.154187	
T13	3.20	3.14	-	0.80	0.88	-	32	30	-	0.531	0.523	-	20.397265	19.648381	-	3.399544132	3.27473024	-	1274.82905	1116.38531	-	1195.60718	112.036644	
T22	3.00	-	-	0.85	-	-	33	-	-	0.851	-	-	50.352599	-	-	8.392099875	-	-	2961.9176	-	-	2961.9176	-	2961.9176
T35	2.80	3.30	-	0.71	0.83	-	38	30	-	0.518	0.520	-	19.180329	19.36755	-	3.196721555	3.22792503	-	1350.72742	1166.71989	-	1258.72365	130.112971	
T41	3.10	-	-	0.95	-	-	35	-	-	0.641	-	-	30.694411	-	-	5.115735169	-	-	1615.49532	-	-	1615.49532	-	1615.49532
TU1	3.00	-	-	0.73	-	-	30	-	-	0.927	-	-	57.466991	-	-	9.577831864	-	-	3936.09529	-	-	3936.09529	-	3936.09529
V03	3.33	2.50	3.00	0.76	0.74	0.78	35	21	28	0.935	0.438	0.633	58.215875	11.691496	29.945528	9.702645757	1.94858262	4.99092128	3829.99175	789.95927	1919.58511	2179.84759	1536.63322	
V06	3.13	3.15	3.23	0.83	0.84	0.77	28	32	33	0.841	0.685	0.466	49.416495	34.813269	14.312587	8.236082508	5.80221158	2.38543125	2976.89729	2072.21842	929.388797	1992.83484	1026.05998	
V20	3.16	3.00	3.45	0.83	0.78	0.81	33	31	33	0.693	0.734	0.939	35.562153	39.40018	58.590316	5.927025477	6.56669668	9.7650527	2142.29837	2525.65257	3616.68619	2761.54571	764.976497	
V27	3.25	2.80	-	0.75	0.58	-	34	28	-	0.769	0.881	-	42.676545	53.160912	-	7.112757466	8.86015198	-	2845.10299	4582.83723	-	3713.97011	1228.76367	
V43	2.30	3.25	3.02	0.63	0.57	0.66	25	33	35	0.483	0.792	0.613	15.903965	44.829584	28.073319	2.650660771	7.47159741	4.67888654	1262.21941	3932.41969	2126.76661	2440.46857	1362.46067	
V44	3.55	3.43	3.30	0.82	0.72	0.74	32	34	33	0.565	0.650	0.613	23.580019	31.536905	28.073319	3.93000318	5.2561508	4.67888654	1437.80604	2190.06283	1896.8459	1841.57159	379.162243	
V58	3.20	2.80	-	0.83	0.85	-	28	24	-	0.680	0.720	-	34.345217	38.089634	-	5.7242029	6.34827237	-	2068.989	2240.56672	-	2154.77786	121.323768	
V61	3.06	-	-	0.81	-	-	33	-	-	0.723	-	-	38.370465	-	-	6.395077578	-	-	2368.54725	-	-	2368.54725	-	2368.54725
V68	2.92	3.33	-	0.72	0.73	-	28	33	-	0.406	0.547	-	8.6959623	21.895032	-	1.449327045	3.64917192	-	603.886269	1499.65969	-	1051.77298	633.407463	

Muestras biológicas promediadas

Variedad	Réplica peso fresco (g)		Réplica peso seco (g)		Vf (mL)	Absorbancia		mHCN (µg/mL)	mHCN/Vt	Concentración mg/kg
	R4	R4	R4	R4		R4	R4			
24	3.06	0.79	36.5	0.671	33.503	5.584	2120.425545			
CA10	3.10	0.67	38	0.327	1.301	0.217	97.07008034			
CA11	2.87	0.70	28	0.576	24.641	4.107	1760.066941			
JA02	3.27	0.92	26.333333	0.692	35.437	5.906	1932.945762			
S02	3.07	0.77	30.5	0.581	25.078	4.180	1639.070967			
S05	3.40	0.72	35	0.545	21.708	3.618	1507.486852			
S07	3.03	0.72	27.5	0.717	37.809	6.301	2625.611316			
T05	3.03	0.81	30	0.620	28.729	4.788	1784.384608			
T08	2.45	0.72	33	0.662	32.660	5.443	2268.071516			
T09	3.30	0.78	31.5	0.399	7.994	1.332	515.7344593			
T13	3.17	0.84	31	0.527	20.023	3.337	1191.834709			
T22	3.00	0.85	32.5	0.851	50.353	8.392	2961.917603			
T35	3.05	0.77	33.75	0.519	19.274	3.212	1251.554529			
T41	3.10	0.95	35	0.641	30.694	5.116	1615.495316			
TU1	3.00	0.73	30	0.927	57.467	9.578	3936.095286			
V03	2.94	0.76	28	0.669	33.284	5.547	2189.756533			
V06	3.17	0.81	30.833333	0.664	32.847	5.475	2019.310492			
V20	3.20	0.81	32.333333	0.789	44.518	7.420	2759.352256			
V27	3.03	0.67	31	0.825	47.919	7.986	3602.911904			
V43	2.86	0.62	31	0.629	29.602	4.934	2387.281407			
V44	3.43	0.76	33	0.609	27.730	4.622	1824.347437			
V58	3.00	0.84	26	0.700	36.217	6.036	2155.799155			
V61	3.06	0.81	33	0.723	38.370	6.395	2368.547251			
V68	3.13	0.73	30.25	0.477	15.295	2.549	1054.861855			

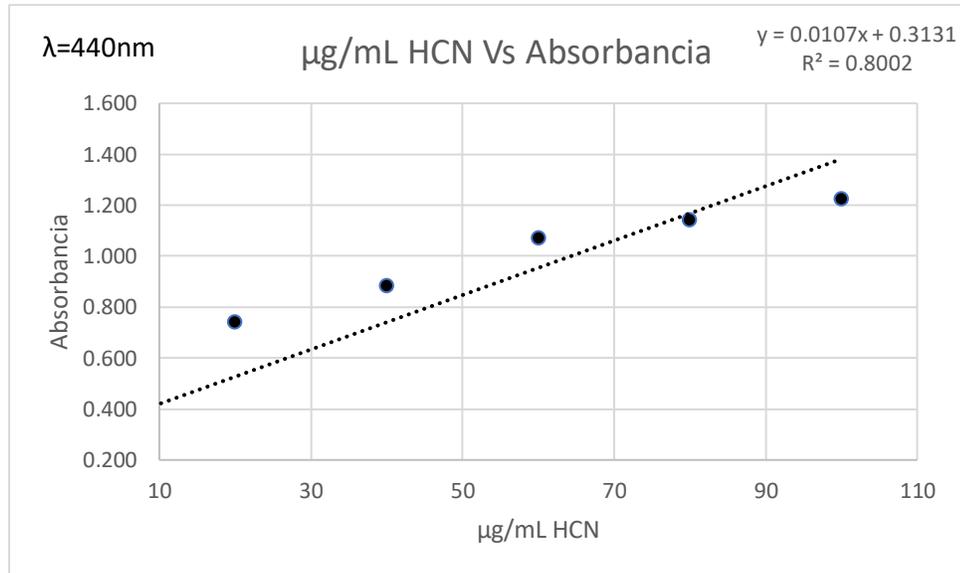
Muestras técnicas

Variedad	Individuo	réplica			réplica			réplica			réplica			HCN(ppm) (µg/g)	HCN(ppm) (µg/g)	HCN(ppm) (µg/g)
		Peso fresco(g)			Peso seco(g) (mmgs (g))			Absorbancia			mHCN (µg/mL)					
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c			
V47	R1	1.021	1.010	1.052	0.330	0.290	0.320	0.340	0.369	0.354	2.51767454	5.23237672	3.82822042	228.8795035	541.2803508	358.8956645
	R2	1.011	1.015	1.008	0.300	0.280	0.290	0.341	0.356	0.338	2.61128496	4.01544126	2.3304537	261.1284959	430.2258495	241.0814171
	R3	1.093	1.080	1.032	0.340	0.330	0.310	0.415	0.378	0.391	9.53845605	6.07487051	7.29180597	841.6284752	552.2609551	705.6586421
JA02	R1	1.025	0.999	1.004	0.370	0.340	0.340	0.420	0.503	0.450	10.0065082	17.776173	12.8148208	811.3384989	1568.485855	1130.719479
	R2	1.028	1.133	1.015	0.340	0.340	0.340	0.457	0.478	0.498	13.4700937	15.4359125	17.3081209	1188.537679	1361.992281	1527.187141
	R3	1.030	1.025	1.025	0.340	0.340	0.340	0.379	0.376	0.380	6.16848093	5.88764967	6.26209135	544.2777287	519.4984999	552.5374177
V20	R1	1.044	1.051	1.005	0.290	0.290	0.320	0.518	0.503	0.436	19.1803293	17.776173	11.5042749	1984.172	1838.914451	1078.52577
	R2	1.051	1.050	1.002	0.300	0.280	0.260	0.350	0.340	0.338	3.45377874	2.51767454	2.3304537	345.378741	269.7508434	268.8985037
	R3	1.078	1.014	1.053	0.290	0.280	0.280	0.335	0.334	0.335	2.04962244	1.95601202	2.04962244	212.0299074	209.5727162	219.6024041
CA10	R1	1.070	1.010	1.030	0.360	0.360	0.350	0.380	0.380	0.371	6.26209135	6.26209135	5.41959756	521.8409455	521.8409455	464.5369341
	R2	1.010	1.060	1.030	0.340	0.340	0.360	0.390	0.401	0.405	7.19819555	8.22791017	8.60235185	635.1349013	725.9920738	716.8626542
	R3	1.020	1.010	1.020	0.340	0.320	0.330	0.417	0.460	0.439	9.72567689	13.750925	11.7851061	858.1479611	1289.149215	1071.373285
CA11	R1	1.050	1.000	1.050	0.360	0.340	0.350	0.503	0.585	0.520	17.776173	25.4522275	19.3675502	1481.347752	2245.784778	1660.075729
	R2	1.010	1.010	1.020	0.340	0.350	0.330	0.421	0.480	0.446	10.1001186	15.6231334	12.4403791	891.1869329	1339.125717	1130.943553
	R3	1.020	1.030	1.000	0.340	0.330	0.360	0.387	0.400	0.387	6.91736429	8.13429975	6.91736429	610.3556724	739.4817954	576.4470239

ANEXO I

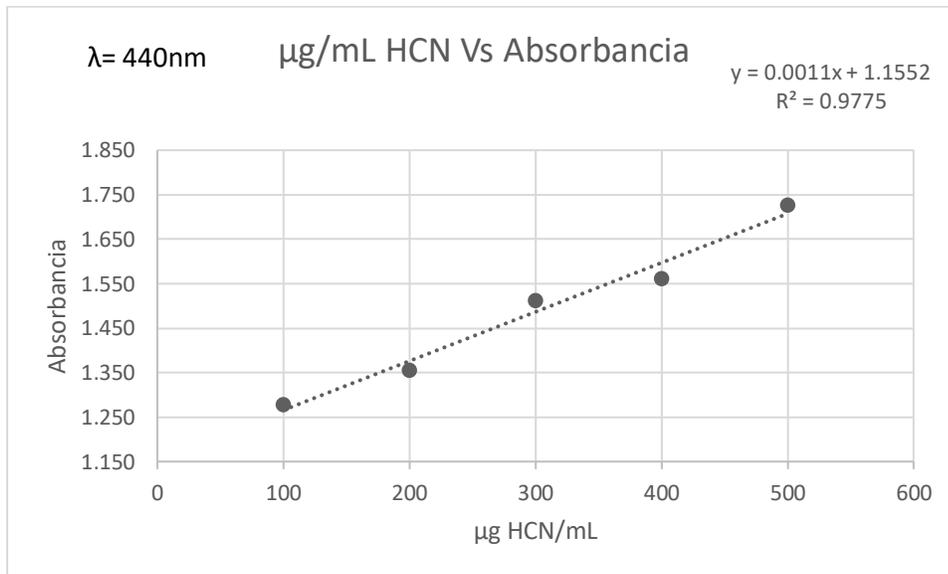
Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de HCN

Curva de calibración 1 para cuantificación de HCN en muestras.



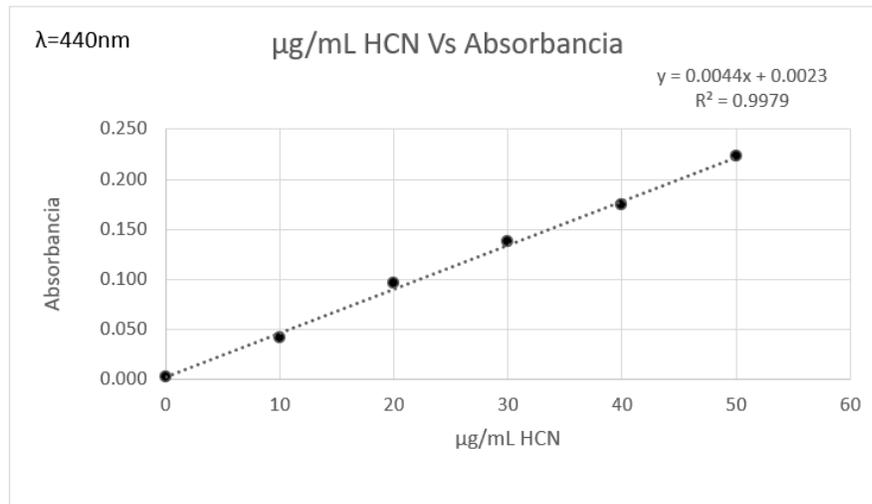
$\mu\text{gCN/mL}$	Absorbancia	D.est.	RSD
100	1.228	3.66%	2.98%
80	1.143	3.32%	2.90%
60	1.073	4.90%	4.57%
40	0.886	1.48%	1.68%
20	0.745	4.31%	5.79%
0	0.009	0.04%	5.08%

Curva de calibración 2 para cuantificación de HCN en muestras.



$\mu\text{gCN/mL}$	Media	D.est.	RSD
500	1.727	1.01%	0.58%
400	1.562	0.76%	0.49%
300	1.511	0.72%	0.48%
200	1.355	2.06%	1.52%
100	1.278	1.10%	0.86%
0	0.009	0.03%	0.68%

Curva de calibración para cuantificación de HCN en muestras tratadas



$\mu\text{g/mL}$	Media	Des. est	RSD
50	0.223	0.25%	1.13%
40	0.175	0.50%	2.88%
30	0.138	0.25%	1.83%
20	0.096	0.59%	6.12%
10	0.042	1.08%	25.75%
0	0.002	0.03%	11.10%