

**EVALUACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN LA SEMILLA DEL DURAZNO
(*PRUNUS PERSICA*) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CIANHÍDRICO Y
BENZALDEHÍDO**

CINDY NICOLE VALENTINA GAVILÁN DUARTE

IVÁN MAURICIO MAHECHA ROJAS

Proyecto integral de grado para optar al título de

INGENIERO QUÍMICO

Director:

Juan Andrés Sandoval Herrera

Ing. Químico, M.Sc.

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA

FACULTAD DE INGENIERÍAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BOGOTÁ

2021

NOTA DE ACEPTACIÓN

Nombre
Firma del Director

Nombre
Firma del presidente del jurado

Nombre
Firma del jurado

Nombre
Firma del jurado

DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Mario Posada García-Peña

Consejero Institucional

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectoría Académica de Investigaciones

Dra. Alexandra Mejía Guzmán

Vicerrector Administrativo y Financiero

Dr. Ricardo Alfonso Peñaranda Castro

Secretario General

Dr. José Luis Macías Rodríguez

Decano de la Facultad de Ingenierías

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director del Programa de Ingeniería Química

Ing. Nubia Liliana Becerra Ospina

DEDICATORIA

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie

Dedico este trabajo principalmente a mis padres José Gavilán y Yolima Duarte, a mi hermano Cristian Gavilán, a mis abuelos, mis tías, y primos; gracias infinitas por todo el apoyo que he recibido de parte de ustedes a lo largo de mi carrera, por darme la fuerza para seguir, por ser pacientes, por todos los consejos y sobre todo por creer en mí y motivarme a ser la mejor ingeniera química (lo seré): este logro es de ustedes, los amo con todo mi corazón.

A mi pareja, mi compañero de aventuras Luis Estrada, te doy las gracias infinitas por ayudarme en cada momento a lo largo de mi carrera, por saber qué decirme cuando más lo necesitaba, por no dejar que me rindiera, por soportarme en cada caída, coger mi mano y levantarla para que siguiera con la cabeza en alto; más que nadie tú sabes cómo fue esta etapa para mí y terminar esto a tu lado me llena de felicidad, de amor infinito y apoyo incondicional, todo gracias a ti.
Juntos lo logramos.

A mi compañero y un gran amigo Iván Mahecha por ser el mejor en todo, por tu amistad a lo largo de los últimos años, por tu apoyo, por confiar en mí desde el primer momento, tanto como amigos como compañeros de proyecto, por cada logro cumplido a lo largo de estos años de universidad, por cada consejo, por cada risa, por cada alegría, gracias infinitas, mi querido colega, y vamos juntos por más logros.

Al Ing. Juan Andrés Sandoval por ser el mejor director de tesis que pudimos haber tenido y además por ser el mejor profesor que tuve a lo largo de mi carrera, muchas gracias por todo.

A mis mejores amigos Yeison Luna y Lorena Martínez, por decirme que soy capaz de lograr todo lo que me proponga, por celebrar cada logro como si fuera de ustedes, por darme los mejores consejos, por ser mis hermanos, por escucharme cuando los necesitaba y sobre todo por estar a mi lado, los quiero.

Finalmente, a mis compañeros, mis amigos de alegrías y tristezas les doy infinitas gracias a Dios y al universo por darme la oportunidad de conocer a cada uno de ustedes, no necesito nombrarlos porque estoy segura de que van a saber a quienes va dirigido. Les agradezco por darme fuerza cada año de luchar en esta maravillosa carrera, nadie dijo que esto fuera fácil y se luchó muchísimo, pero todos y cada uno de ustedes me enseñaron a no rendirme jamás. Lo logramos chicos, vamos por más éxitos en nuestras vidas, gracias por todo, los quiero infinitamente.

Cindy Nicole Valentina Gavilán Duarte.

"Siempre he creído y sigo creyendo que cualquier buena o mala fortuna que pueda surgir en nuestro camino, siempre podremos darle significado y transformarlo en algo de valor."

Hermann Hesse, Siddhartha

A mi madre, Ilianova Rojas quien siempre ha estado ahí desde el principio, apoyándome con su inmenso e incondicional corazón, dándome la fortaleza para seguir adelante en la vida.

A la memoria de mi padre, Mauricio Mahecha, por sus enseñanzas, dedicación y ternura que me han permitido ser la persona que soy.

A mi compañera y amiga Cindy Gavilán por el excelente equipo que formamos en el desarrollo de este proyecto, su confianza y gran amistad.

Iván Mauricio Mahecha Rojas

AGRADECIMIENTOS

A la empresa C.I Alliance S.A. por ofrecernos sus servicios y proveernos el material de trabajo que requeríamos para desarrollar nuestro proyecto.

A nuestro director de tesis Ing. Juan Andrés Sandoval Herrera, por brindarnos todo el apoyo que necesitamos durante las diferentes etapas de nuestro proyecto, por estar a nuestro lado en las demás actividades que hemos desarrollado juntos a lo largo de nuestra investigación y, sobre todo, por confiar en nuestras capacidades y motivarnos a creer en nosotros mismos.

A nuestro orientador el profesor David Sotelo por ayudarnos a lo largo de la elaboración de este trabajo, ofreciéndonos su tiempo, sus opiniones, sus correcciones y consejos para que el resultado fuese el mejor trabajo posible.

A la coordinadora de laboratorios Yenny Hernández, por hacer posible el trabajo experimental que era indispensable para el desarrollo de nuestra investigación, estando pendiente de nuestras necesidades a la hora de utilizar los laboratorios y ayudarnos aún en el contexto de pandemia actual.

A nuestra familia, por darnos en todo el momento el apoyo incondicional, los consejos, la sabiduría que necesitábamos y por estar pendientes de nosotros en cada etapa de nuestro proyecto, este es logro también es de ustedes: una meta cumplida entre todos.

A nuestros amigos, que estuvieron en cada momento de la carrera, por ser incondicionales, por darnos momentos de risa, de felicidad, por hacernos sentir apoyados en todo momento, por los consejos, y por estar todo el tiempo para nosotros.

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVOS	17
1. GENERALIDADES	18
1.1 Durazno (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.).	18
1.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica.	19
1.1.2 Variedad de durazno Dorado.	20
1.1.3 Composición química y nutricional.	20
1.1.4 Producción a nivel mundial.	22
1.1.5 Producción a nivel nacional.	24
1.2 Glucósidos cianogénicos.	26
1.2.1 Origen e historia.	26
1.2.2 Estructura química.	28
1.2.3 Biosíntesis.	30
1.2.4 Bioactivación (Cianogénesis).	30
1.2.5 Hidrólisis.	31
1.3 Amigdalina.	33
1.3.1 Origen.	34
1.4 Prunasina.	34
1.4.1 Origen.	35
1.5 Glucósidos cianogénicos provenientes de la fenilalanina como aminoácido precursor.	35
1.5.1 Hidrólisis enzimática.	36
1.6 Hongos filamentosos.	38
1.7 Generalidades del <i>Aspergillus niger</i> .	38
1.7.1 Producción enzimática.	39
1.7.2 Origen e historia.	40
1.7.3 Estructura Química.	41
1.7.4 Aplicaciones.	42
1.8 Benzaldehído.	43

1.8.1	<i>Origen e historia.</i>	43
1.8.2	<i>Estructura química.</i>	44
1.8.3	<i>Aplicaciones.</i>	45
1.9	Técnicas de cuantificación	46
1.9.1	<i>Microdifusión (determinación gravimétrica).</i>	46
1.9.2	<i>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).</i>	46
2.	VARIABLES QUE INTERVIENEN EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA AMIGDALINA Y LA PRUNASINA.	47
2.1	Tratamiento y conservación de la muestra.	47
2.1.1	<i>Trituración.</i>	47
2.1.2	<i>Conservación de la muestra.</i>	48
2.2	Variables que intervienen en la extracción.	48
2.3	Sistemas extractantes.	49
2.3.1	<i>Cromatografía líquida de alta resolución.</i>	49
2.3.2	<i>Extracción por Reflujo y Soxhlet.</i>	50
2.3.3	<i>Variables que intervienen en la hidrólisis enzimática.</i>	52
3.	METODOLOGÍA	56
3.1	Obtención y conservación de la muestra.	56
3.2	Extracción por el método Soxhlet.	58
3.2.1	<i>Obtención de benzaldehído mediante destilación.</i>	58
3.2.2	<i>Destilación.</i>	59
3.2.3	<i>Cuantificación de cianuro mediante titulación argentométrica.</i>	59
3.3	Microdifusión modificada de Conway.	63
3.3.1	<i>Cuantificación de cianuro mediante titulación argentométrica (Método de Mohr).</i>	65
3.3.2	<i>Caracterización cualitativa para presencia de benzaldehído mediante prueba de Schiff.</i>	66
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	67
4.1	Extracción Soxhlet.	67
4.1.1	<i>Cuantificación de cianuro por gravimetría.</i>	67
4.1.2	<i>Destilación por reflujo simple.</i>	69

4.2 Microdifusión.	70
4.2.1 <i>Cuantificación de cianuro por gravimetría.</i>	70
4.2.2 <i>Caracterización cualitativa para presencia de benzaldehído:</i>	74
5. CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	90

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Variedades de durazno clasificados por su coloración	18
Figura 2. Composición morfológica del durazno	19
Figura 3. Principales productores de durazno a nivel mundial entre el 2015 al 2019	23
Figura 4. Principales productores de durazno a nivel mundial entre el 2015 al 2019 (incluyendo China)	24
Figura 5. Producción nacional de durazno por departamento	25
Figura 6. Producción de durazno en Colombia entre los años 2015 al 2019	26
Figura 7. Estructura general de un glucósido cianogénico	28
Figura 8. Anabolismo general de los glucósidos cianogénicos	30
Figura 9. Compartimentación celular de las enzimas y glucósidos en plantas eudicotas monocotiledóneas	31
Figura 10. Etapas generales de la hidrólisis enzimática de los glucósidos cianogénicos	32
Figura 11. Hidrólisis enzimática general de los glucósidos cianogénicos en medio ácido diluido	33
Figura 12. Estructura molecular tridimensional de la amigdalina	33
Figura 13. Estructura tridimensional de la prunasina	34
Figura 14. Estructura molecular de la amigdalina y la prunasina	35
Figura 15. Rutas metabólicas de la amigdalina y la prunasina	36
Figura 16. Hidrólisis enzimática de la amigdalina- prunasina	37
Figura 17. Morfología del <i>Aspergillus niger</i>	38
Figura 18. Representación gráfica de una enzima, β -glucosidasa producida por hongos del género <i>Aspergillus</i>	39
Figura 19. Estructura molecular del ácido cianhídrico	41
Figura 20. Estructura molecular del benzaldehído	44
Figura 21. Comparación de resultados en la aplicación de diferentes sistemas extractantes para contenido de amigdalina	51
Figura 22. Diagrama de bloques del proceso de obtención y conservación de la muestra	57

Figura 23. Diagrama de bloques del proceso de extracción soxhlet y caracterización de la muestra	60
Figura 24. Curva de titulación del AgNO_3 para el método de Liebig Denigès	62
Figura 25. Ilustración del montaje para la recolección de CN mediante microdifusión	64
Figura 26. Diagrama de bloques del proceso de microdifusión y caracterización de la muestra	66
Figura 27. Comparación de los valores promedio de la concentración de ácido cianhídrico expresado en mg de cianuro por 100 gramos de muestra para las técnicas empleadas	75

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del duraznero	20
Tabla 2. Composición química del durazno	21
Tabla 3. Contenido nutricional del durazno	21
Tabla 4. Composición nutricional por cada 100g	22
Tabla 5. Principales productores de durazno a nivel mundial entre el 2015 al 2019	23
Tabla 6. Compuestos cianogénicos y sus descubridores	27
Tabla 7. Glucósidos cianogénicos y sus precursores	29
Tabla 8. Clasificación taxonómica	39
Tabla 9. Ejemplos de enzimas producidas de manera extracelular del <i>Aspergillus niger</i>	40
Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas del HCN	42
Tabla 11. Propiedades fisicoquímicas del benzaldehído	45
Tabla 12. Comparación de resultados en la aplicación de diferentes extractantes mediante cromatografía HPLC	50
Tabla 13. Propiedades de β -glucosidasas purificadas hidrolizando glucósidos cianogénicos aromáticos	53
Tabla 14. Propiedades de hidroxinitriloliasas purificadas hidrolizando glucósidos cianogénicos	53
Tabla 15. Propiedades de β -glucosidasas purificadas hidrolizando glucósidos cianogénicos aromáticos	55
Tabla 16. Reproducibilidad del ensayo por valoración gravimétrica para análisis en contenido de cianuro en semillas de durazno	67
Tabla 17. Reproducibilidad del ensayo por destilación simple para determinación de benzaldehído en semillas de durazno	69
Tabla 18. Reproducibilidad del ensayo por valoración gravimétrica para análisis en contenido de cianuro en semillas de durazno	71
Tabla 19. Reproducibilidad del ensayo por valoración gravimétrica para análisis en contenido de cianuro en semillas de durazno para muestras con y sin adición de enzima externa por inoculación de <i>A. niger</i>	72
Tabla 20. Reproducibilidad del ensayo por valoración gravimétrica para análisis en contenido de cianuro en semillas de durazno para muestras con y sin adición de enzima externa por inoculación de <i>A. niger</i> para 12 y 24 horas	73

LISTA DE ABREVIATURAS

%:	Porcentaje
°C:	Grados Celsius
AH:	Amigdalina hidrolasa
atm:	Atmósfera
cm:	Centímetros
CN:	Cianuro
cp:	Centipoise
g:	Gramos
GC:	Glucósidos cianogénicos
h:	Horas
kPa:	Kilopascal
Kps:	Constante de productos de solubilidad
L:	Litro
LD:	Liebig-Denigès
M:	Molar
mg:	Miligramos
min:	Minutos
mL:	Mililitro
mm:	Milímetros
mol:	Mol
N:	Normalidad
PH:	Prunasina hidrolasa
ppm:	Partes por millón
T:	Temperatura
t:	Tiempo
V:	Volumen

RESUMEN

Los residuos industriales de tipo agrícola en Colombia han venido implementándose en el aprovechamiento como fuente principal del desarrollo de nuevas estrategias para la producción de biomateriales, biocombustibles, productos químicos e inclusive generación de energía, a partir del uso de biomasa. El material sobrante de los duraznos es un material promisorio para muchos de los campos mencionados, pero en esta investigación se indagó, específicamente, en el planteamiento respecto a estrategias de extracción y cuantificación de los glucósidos cianogénicos que contiene la semilla del durazno aprovechando el proceso de cianogénesis para la generación de productos químicos de alto valor tales como el ácido cianhídrico y benzaldehído a través de métodos convencionales para la caracterización de estos compuestos estimando de manera descriptiva la realización de técnicas a nivel de laboratorio desde su extracción por microdifusión, destilación de reflujo simple y extracción Soxhlet hasta su caracterización por análisis gravimétricos así como la implementación de microorganismos capaces de producir enzimas tal como el *Aspergillus niger*, hongo filamentoso reconocido a nivel industrial por su adaptabilidad y producción de metabolitos que, para este proyecto se investigó su posible aprovechamiento al generar enzimas glucosidadas mediante su inoculación en ensayos experimentales con el fin de evaluar mejoras en la degradación enzimática de los glucósidos cianogénicos implicados en la semilla del durazno

Palabras clave: Durazno, Hidrólisis, Aprovechamiento de residuos, extracción, glucósidos cianogénicos, ácido cianhídrico, benzaldehído, *Aspergillus niger*.

INTRODUCCIÓN

La industria química en el mundo está en constante evolución adaptándose a las demandas que emite su alrededor. En la actualidad el factor ambiental es de suma importancia para el desarrollo de un buen desempeño en la manufactura de productos químicos y la producción energética buscando así un equilibrio en la elaboración de un producto y la locación donde se sitúa la estructura correspondiente a la fabricación de dicho producto. Este paradigma conduce a incentivar la producción aplicando el uso de residuos de carácter agroindustrial o residuos de tipo orgánico mediante un procesamiento sostenible, que permita el máximo aprovechamiento tanto de la materia prima seleccionada como la disminución frente a la polución y daños al medio ambiente al enfatizar en la planeación y desarrollo de una empresa cuyo principio se base en la economía circular.

En Colombia la fruticultura y la industria agrícola generan variedad de residuos, entre ellos los subproductos de las frutas tales como sus semillas, cáscaras, hojas y demás partes poseen características físicas y químicas que pueden optarse como material biomásico potencial debido a que en su composición es posible emplear moléculas de gran interés como nuevas materias primas en la industria, además de productos ya existentes que pueden obtenerse alternativamente al aprovechar los residuos agroindustriales de origen frutícola. De acuerdo con el Consejo Nacional de Política Económica y Social (CONPES 3874) [1], en el país los residuos orgánicos de fruta suelen ser desechados sin considerarse un posible uso de sus propiedades, puesto que la desinformación que se presenta por parte del consumidor final aporta a la insostenibilidad tanto del proceso de siembra y cosecha, y a la manufactura como tal; debido al crecimiento poblacional se incrementa la producción de varios alimentos, así mismo se dificulta la adquisición de predios para realice la disposición final de estos sobrantes, que por lo general se depositan sin tratamiento alguno para la mitigación hacia el entorno, sumando la incorrecta separación de los desechos acumulados, lo que provoca una confluencia de residuos cuyos lixiviados se transforman en compuestos contaminantes para el medio ambiente y nocivos para la salud.

A partir de la situación de cambio y adaptación constante que se está dando en este tipo de industrias, las entidades buscan alternativas que promuevan la sostenibilidad y la integración a una economía circular al aprovechar y valorizar los residuos agroindustriales generados en el sector. Por consiguiente, se quiere realizar un estudio que implique la valorización de los residuos de un

tipo de fruta en particular. Las semillas del durazno son un residuo capaz de ser valorado como materia prima para la producción de productos intermedios enfocados hacia la formación de la economía circular a nivel industrial. Debido a su alto contenido en compuestos cianogénicos, “las semillas del durazno contienen amigdalina y prunasina, glucósidos cianogénicos presentes en la mayoría de las plantas de especie *Rosaceae*. Gracias a estos compuestos, las plantas liberan ácido cianhídrico como mecanismo de defensa contra fitófagos mediante la descomposición por hidrólisis enzimática de dichos compuestos. Este proceso forma parte del catabolismo secundario de las plantas y es conocido como cianogénesis” [2]. «Gran parte de las semillas de las plantas del género *Prunus* (almendro, cerezo, duraznero, etc....) contienen amigdalina en una proporción variable en cuanto a su diversidad. El proceso de cianogénesis consiste en la descomposición de los compuestos cianogénicos mediante 3 enzimas distintas. La enzima emulsina, en el caso de la amigdalina, desdobla las dos moléculas de glucosa presentes (representa el 71% de la molécula) y una molécula de benzaldehído cianhidrina, que consecuentemente se desdobla en una molécula de benzaldehído (que constituye el 23%) y una de ácido cianhídrico (que abarca el 6%)»[3].

La amigdalina y la prunasina son compuestos que, al descomponerse, generan variedad de productos químicos que pueden ser aprovechados a nivel industrial. En el presente trabajo se determinaron las variables que intervienen en la hidrólisis enzimática, así como la elaboración de ensayos a nivel experimental para obtener información sobre la cantidad presente de amigdalina y prunasina en el durazno *Prunus persica* a través de técnicas de cuantificación y extracción de gran sensibilidad tales como la microdifusión o medios analíticos cromatográficos como primer aspecto evaluativo para el planteamiento de una biorrefinería que utilice este tipo de residuos como materia prima.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la obtención de ácido cianhídrico y benzaldehído mediante la hidrólisis enzimática de la semilla del durazno en Colombia.

Objetivos Específicos

Determinar las variables que intervienen en la hidrólisis enzimática de la amigdalina y prunasina para la obtención de ácido cianhídrico y benzaldehído.

Establecer un método de extracción y cuantificación apto para la obtención de ácido cianhídrico y benzaldehído de la semilla del durazno

Evaluar de manera comparativa la cantidad de ácido cianhídrico y benzaldehído mediante la técnica de microdifusión con adición de enzimas externas y microdifusión normal variando el tiempo de disposición de operación.

1. GENERALIDADES

El ácido cianhídrico y el benzaldehído son compuestos químicos resultantes de la degradación enzimática de algunos glucósidos cianogénicos como la amigdalina y la prunasina. Dichas moléculas pueden encontrarse en residuos de frutos de hueso como el durazno. Desde su descubrimiento, los glucósidos cianogénicos han sido estudiados con diversos fines enfatizándose en la actualidad en aplicaciones farmacológicas.

1.1 Durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch.)

El durazno es el fruto correspondiente del duraznero (*Prunus persica*) originario de China, pertenece a los frutos de hueso que incluyen centenares de especies del género *Prunus*. El fruto es una drupa de forma globosa u ovoide con un diámetro de 4 a 10 cm, de colores entre amarillos y rojos (Figura 1) [4]. La epidermis es delgada, su mesocarpio es carnoso y el endocarpio de hueso contiene la semilla en forma de almendra [5]. Su nombre botánico (*Prunus persica* (L.) Batsch.) se refiere al país putativo de origen, Persia (Irán en la actualidad), y Linné en 1758 denominó la especie correspondiente según su descripción (*Amygdalus persica*) [6].

Figura 1.

Variedades de durazno clasificados por su coloración



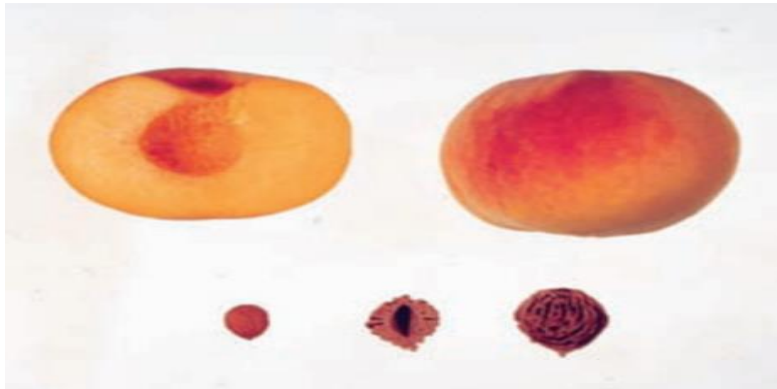
Nota. El durazno puede presentar una coloración rojiza entre el mesocarpio y el epicarpio. Tomado de: The Peach, Botany, Productions and Uses. 1 Ed, [En Línea]. Disponible: https://catalog.library.vanderbilt.edu/discovery/fulldisplay/alma991043334615903276/01VAN_INST:vanui [Acceso: feb.2,2021].

1.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica

Existe una gran diversidad morfológica entre los especímenes de duraznero, desde el tamaño del árbol, hábitat de crecimiento, el color y el tamaño de la flor, el tamaño de la fruta, su forma y textura etc. En la Tabla 1 se puede observar la clasificación taxonómica de la planta [6]. Los duraznos son reconocidos y clasificados por la presencia de tricomas en la piel, tejidos vegetales de funciones variadas entre ellas la fijación y absorción de humedad y por la adherencia de la pulpa al hueso a diferencia del melocotón y el nectarino, frutos que no presentan una unificación del mesocarpio al carozo o hueso pese a que pertenecen a la misma especie (Figura 2) [4].

Figura 2.

Composición morfológica del durazno



Nota. En la parte superior se puede evidenciar la coloración y forma del epicarpio y mesocarpio, en el costado inferior, se observa la conformación del pericarpio (semilla y hueso). Tomado de: The Peach, Botany, Productions and Uses. 1 Ed, [En Línea]. Disponible: https://catalog.library.vanderbilt.edu/discovery/fulldisplay/alma991043334615903276/01VAN_INST:vanui [Acceso: feb.02,2021].

Tabla 1.

Clasificación taxonómica del duraznero

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	Rosales
Familia:	<i>Rosaceae</i>
Género:	<i>Prunus</i>
Especie:	<i>Prunus persicae</i>

Nota. Descripción y asignación taxonómica general del durazno. Tomado de: J. A. Timana, “Caracterización de labores culturales y estado fitosanitario del cultivo de durazno en el municipio de Palestina Huila,” 2013.

En Colombia se producen diferentes tipos de durazno e injertos entre melocotones y nectarinos, pero sus variedades propias de durazno tales como el conservero amarillo diamante, dorado y riograndense [5].

1.1.2 Variedad de durazno Dorado

Este tipo de durazno es reconocido por su contenido en azúcares para su consumo e industrialización. Se caracteriza por presentar una coloración amarilla con ligera pigmentación rojiza del epicarpio, su mesocarpio es de un tono amarillo oro en donde al limitar con el pericarpio (hueso) se dan tonos rojizos a su alrededor. Tiene una forma redondeada con sutura ligeramente desarrollada, con un peso promedio de 150 g. Sus condiciones de adaptación son de 2 200 a 2 700 metros sobre el nivel del mar (msnm) y un requerimiento de 300 horas a temperaturas inferiores a 7 °C [4].

1.1.3 Composición química y nutricional

El durazno presenta un aporte energético de 40 kilocalorías llevándolo a considerarse un fruto moderadamente calórico; posee un contenido de agua alto (87%) y bajas cantidades de proteínas y lípidos[7] relativamente bajo el cual va en aumento en cuanto a las variedades más tardías [8]. El durazno es una buena fuente de vitamina A, aminoácidos y minerales (Tabla 2, 3 y 4) además de presentar un nivel bajo en sodio, factor que promueve su consumo especialmente a personas que sufran de hipertensión o colesterol alto [9].

Tabla 2.*Composición química del durazno*

Nutriente	Composición
Carbohidratos	Fructosa, galactosa, glucosa y sacarosa.
Minerales	Aluminio, azufre, bromo, calcio, zinc, cloro, cobalto, cobre, cromo, flúor, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, níquel, potasio, selenio, sodio y yodo.
Ácidos orgánicos	Ácido cítrico y ácido málico.
Aminoácidos	Ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, cistina, fenilalanina, glicina, hidroxiprolina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina.

Nota. Composición química general del durazno clasificada en minerales y grupos orgánicos relevantes. Tomado de: Información general acerca del melocotón, [En Línea]. <https://alimentos.org.es/melocoton>.

El Durazno tiene un contenido nutricional importante, el cual se caracteriza por sus antioxidantes y gran porcentaje en agua (Tabla 3).

Tabla 3.*Contenido nutricional del durazno*

Nutriente	Por cada 100g
Agua	88.87 g
Proteínas	0.92 g
Lípidos	0.25 g
Ceniza	0.43 g
Carbohidratos	9.54 g

Nota. Contenido nutricional del durazno en peso. Tomado de F. R. Mena Alanoca, “Extracción y caracterización del aceite crudo de la semilla de durazno (*Prunus persica*),” La Paz, Bolivia, 2015.

En la Tabla 4, se puede observar algunos de los nutrientes más importantes que aporta este fruto.

Tabla 4.*Composición nutricional por cada 100g*

<i>Descripción</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Unidad</i>
Agua	89.10	%
Calorías	38.00	Kcal
Proteínas	0.60	g
Grasas	0.10	g
Carbohidratos	9.70	g
Vitamina A	330.00	U. I
Tiamina	0.02	mg
Riboflavina	0.05	mg
Niacina	1.00	mg
Ácido ascórbico	7.00	mg
Calcio	9.00	mg
Fósforo	10.00	mg
Hierro	0.50	mg
Sodio	1.00	mg
Potasio	202.00	mg

Nota. Componentes nutricionales principales del durazno. Tomado de: F. R. Mena Alanoca, “Extracción y caracterización del aceite crudo de la semilla de durazno (*Prunus persica*),” La Paz, Bolivia, 2015.

1.1.4 Producción a nivel mundial

Los países productores más reconocidos de este fruto son China, Italia, España, Estados Unidos y Grecia (Tabla 5) [6]. La producción de frutos originarios de caducifolios se da principalmente en Asia gracias a China generando 14 472 276.75 toneladas de fruta producida en promedio durante el 2015 al 2019. En Europa, España lidera el nivel de durazno producido con un promedio de 1 559 882.6 toneladas para este mismo lapso seguido de Italia y Grecia, en América el productor más reconocido es Estados Unidos con un promedio de 797 637.4 toneladas(Figura 3)[10]. Tomando en cuenta la información presentada por la organización de agricultura y comida de las Naciones Unidas (FAO) se presenta como uno de los principales productores a nivel mundial de

duraznos, melocotones y nectarinos a China (Figura 4), evidenciando un leve aumento de producción por año a diferencia de otros líderes tal como España o Italia en Europa.

Tabla 5.

Principales productores de durazno a nivel mundial entre el 2015 al 2019

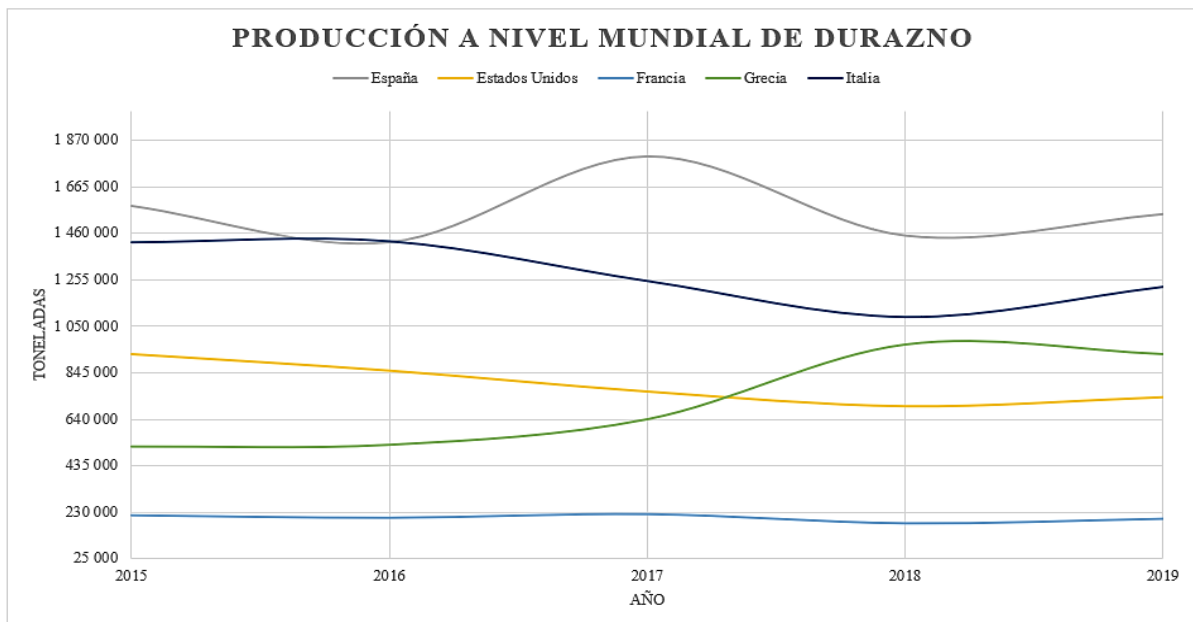
Año	China	Colombia	España	Estados Unidos	Francia	Grecia	Italia
	Toneladas producidas						
2015	13 668.386	29 334	1 581.510	927 787	217 146	521 111	1 422.856
2016	14 317.375	29 249	1 421.678	855 740	207 004	528 723	1 427.573
2017	14 654.672	31 198	1 799.685	764 410	221 853	640 974	1 250.721
2018	15 248.674	30 268	1 450.930	700 350	184 070	968 720	1 090.680
2019	15 841.928	30 038	1 545.610	739 900	202 820	926 620	1 224.940

Nota. Comparación de cantidad en toneladas producidas entre los principales países productores de durazno y Colombia. Tomado de: FAO, [En Línea]. Disponible: <http://www.fao.org/faostat/es/?#compare> [Acceso: feb.07,2021]

En la Figura 3 y 4, se ilustran estos datos con el fin de observar el comportamiento de producción.

Figura 3.

Principales productores de durazno a nivel mundial entre el 2015 al 2019

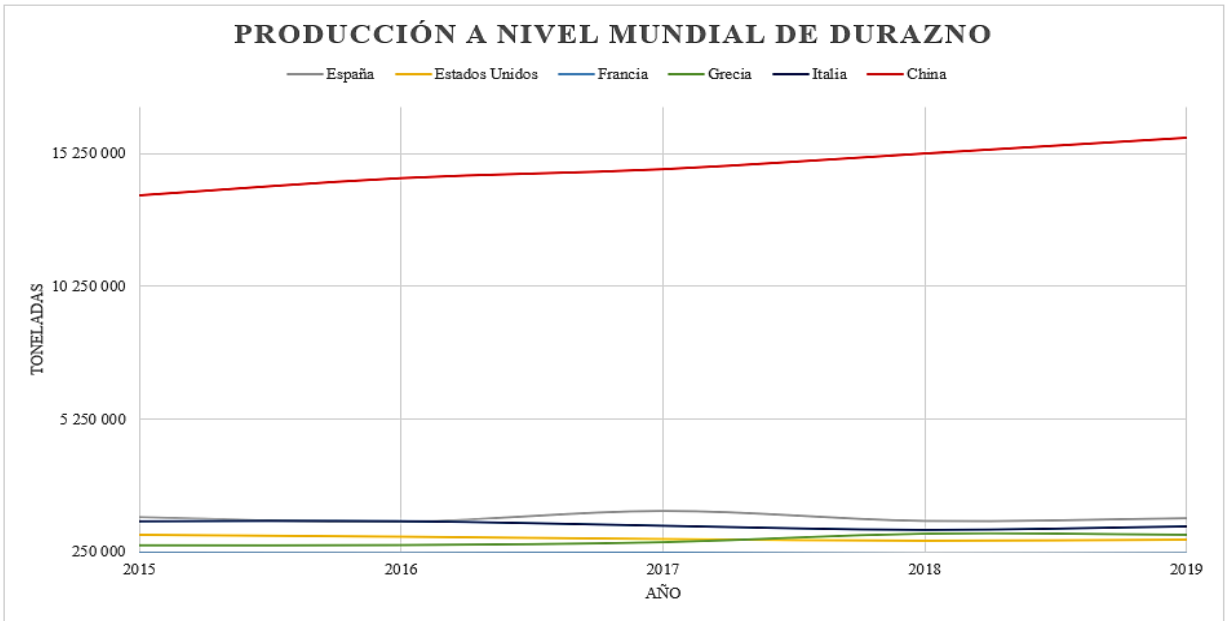


Nota. Comparación del comportamiento de producción de durazno en toneladas entre el año 2015 al 2019. Tomado de: FAO, [En Línea]. Disponible: <http://www.fao.org/faostat/es/?#compare> [Acceso: feb.07,2021].

Al añadir al principal productor a nivel mundial, se puede observar una diferencia considerable de como China proyecta un comportamiento creciente a comparación de otros países líderes para este rango de tiempo (Figura 4).

Figura 4.

Principales productores de durazno a nivel mundial entre el 2015 al 2019 (incluyendo China)



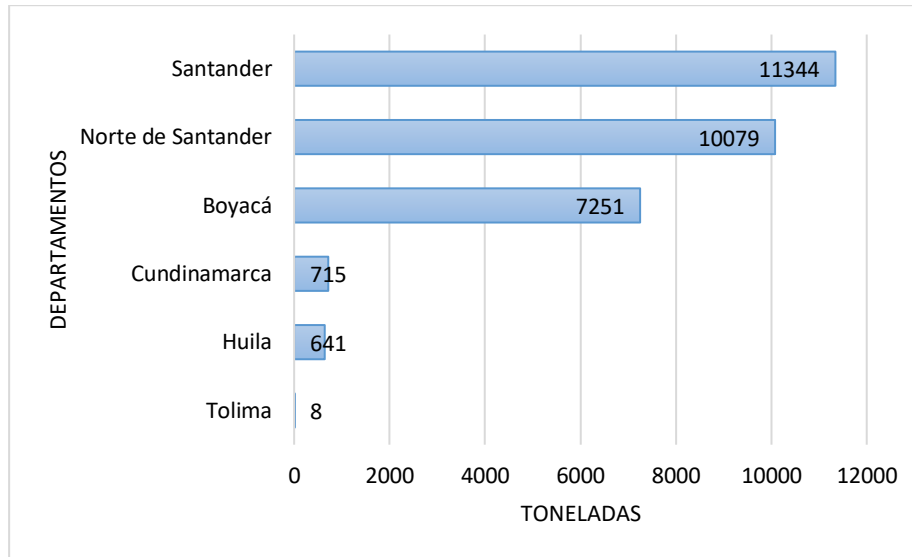
Nota. Comparación del comportamiento de producción de durazno en toneladas entre el año 2015 al 2019 incluyendo China. Tomado de: FAO, [En Línea]. Disponible: <http://www.fao.org/faostat/es/?#compare> [Acceso: feb.07,2021].

1.1.5 Producción a nivel nacional

La producción de durazno en Colombia se da principalmente en la región Andina en los departamentos del Norte de Santander y Boyacá. Según la encuesta nacional agropecuaria (ENA) del año 2019, se reportan a nivel nacional un total de 30 038 toneladas [11]. A continuación se puede observar en la Figura 5 la producción de durazno en toneladas por departamentos del país.

Figura 5.

Producción nacional de durazno por departamento



Nota. Producción de durazno en toneladas en Colombia clasificados por departamento.

Tomado de: ENA 2019, [En Línea]. Disponible:

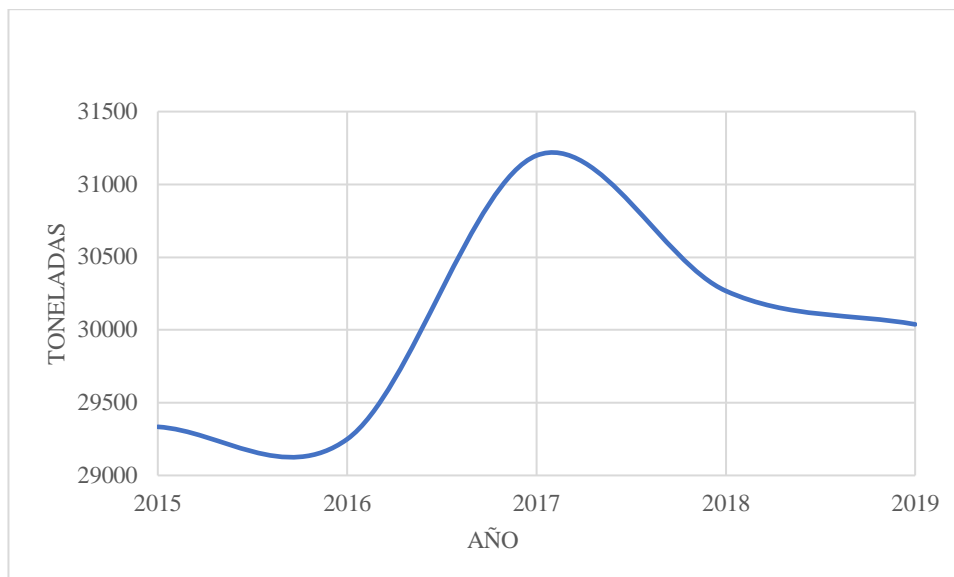
<https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/encuesta-nacional-agropecuaria-ena#anexos>. [Acceso: feb.07,2021].

La FAO, al igual que el ENA permite ver el comportamiento llevado entre el 2015 al 2019 respecto a la producción de durazno de origen nacional produciéndose en promedio durante los 5 años 30 017.4 toneladas, siendo el año con mayor producción el 2017 con un total de 31 198 toneladas (Figura 6).

La Producción del fruto en Colombia, a comparación de los países líderes presentados anteriormente en las Figuras 3 y 4, se considera baja por motivos más que todo geográficos, ya que como se había dicho en el apartado del origen del durazno, este proviene de zonas de Asia y el medio oriente, por lo que su cosecha a nivel nacional depende mucho de la intervención humana así como las condiciones climáticas presentadas en el cultivo.

Figura 6.

Producción de durazno en Colombia entre los años 2015 al 2019



Nota. Comportamiento de la producción del durazno en Colombia en toneladas entre el periodo anual 2015-2019. Tomado de: FAO, [En Línea]. Disponible: <http://www.fao.org/faostat/es/?#compare> [Acceso: feb.07,2021].

1.2 Glucósidos cianogénicos

Son compuestos químicos que se dan naturalmente en las plantas pertenecientes al género *Prunus*, *Sacumbus*, *Manihot*, *Linum*, *Bambusa*, *Sorghum* entre otros. Químicamente se definen como glucósidos de α -hidroxinitrilos, estos compuestos son potencialmente tóxicos y son fácilmente susceptibles al rompimiento de enlaces por hidrólisis enzimática liberando cianuro de hidrógeno cuando la planta portadora sufre daño físico [12].

1.2.1 Origen e historia

Los glucósidos cianogénicos fueron descubiertos en parte por el mecanismo metabólico de defensa en las plantas denominado cianogénesis, se dice que Heinrich Schrader probablemente los descubrió en 1803 al trabajar con almendras amargas; sin embargo, se atribuye el descubrimiento a Pierre Robiquet y Antoine Boutrond en 1830 al aislar la amigdalina desde el mismo material [12]. Posteriormente en 1837 Wöhler y Liebig propusieron incorporar la amigdalina pura obtenida de almendras dulces y amargas para extraer ácido cianhídrico a través de la descripción de un sistema enzimático quienes le dieron el nombre de "emulsina"[13] El descubrimiento de la amigdalina impulsó a varios químicos en el siglo XIX a aislar y reconocer otros glucósidos

cianogénicos de diferentes plantas así como el análisis de su estructura molecular [14]. En la Tabla 6 se encuentran algunos de los descubrimientos sobre este tipo de compuestos, no obstante, se conocen más de 60 estructuras diferentes hoy en día.

Tabla 6.

Compuestos cianogénicos y sus descubridores

Compuesto	Investigadores	Año
Amigdalina	Robiquet y Boutron- Charlard	1830
Linamarina	Jorissern y Hairs	1891
Durrina	Dustan y Henry	1902
Ginocardina	Power y Gomal	1904
Sambunigrina	Bourquelot y Danjou	1905
Viacinamina	Bertrand	1906
Prunasina	Hérsissey	1907
Acacipetalina	Steyn y Rimington	1935
Nandina glucósido	Finnemore y Large	1936
Taxipilina	Finnemore, Reichard y Large	1936
Zierina	Finnemore y Cooper	1936
Acalipina	Rimington y Roets	1937
Lotaustralina	Finnemore y Cooper,	1938
<i>Polydesmus</i>	Pallares	1946
Lucumina	Bachstez, Prieto y Gaja	1948
Proteacima	Young y Hamilton	1966
Barteriosida	París Y Bouquet	1969
Trigloquinina	Eyjólfsson	1969

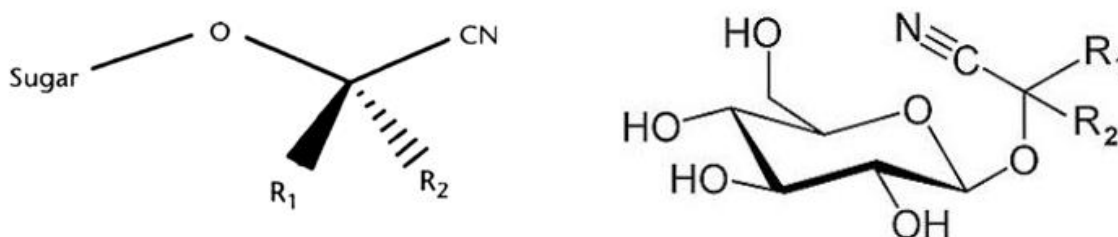
Nota. Cronología de algunos compuestos cianogénicos descubiertos durante el siglo XIX a mediados del siglo XX, G. Arrázola. 2002, “Análisis de glucósidos cianogénicos en variedades de almendro: implicaciones en la mejora genética Tesis Doctoral” ,[En Línea]. Disponible : <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3219/1/Arrazola-Paternina-Guillermo.pdf>

1.2.2 Estructura química

La estructura general de un glucósido cianogénico es un azúcar D- β -glucosa, unido por un enlace o- β -glucosídico a una aglicona (Figura 7) [3], pero, existen casos en los que se presenta una variación en la naturaleza del azúcar que compone la molécula[15]. Los glucósidos cianogénicos derivan de los aminoácidos L-valina, L-isoleucina, L-Leucina, L-fenilalanina, L-tirosina o de la L-2(2'-cyclopentenil) glicina cuya naturaleza es no proteica [16], aunque existen glucósidos como la acalifina y trigloquinina provenientes de precursores como el ácido nicotínico [17].

Figura 7.

Estructura general de un glucósido cianogénico

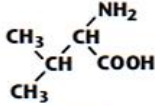
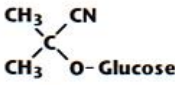
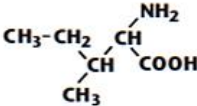
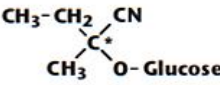
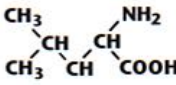
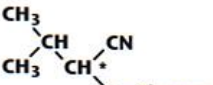
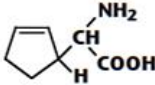
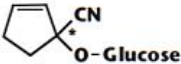
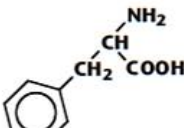
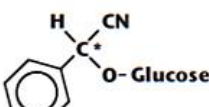
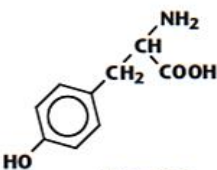
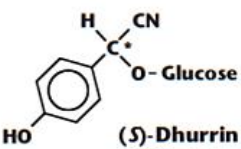


Nota. Estructura molecular general de los glucósidos cianogénicos. Lado izquierdo representación de Cram. Lado derecho representación esquelética. Tomado de: J. Vetter, “Plant Cyanogenic Glycosides,” Springer, Dordrecht, 2017, pp. 287–317,[En Línea]. Disponible: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-94-007-6464-4_19

Los glucósidos cianogénicos se pueden clasificar ya sea por su derivación de los 6 aminoácidos (ver Tabla 7), o en cuatro grupos de acuerdo a la estructura molecular de su aglicona. «Los primeros son glucósidos derivados del 2-hidroxi-2-fenilacetnitrilo, el glucósido más conocido de este grupo es la amigdalina. El segundo grupo pertenece a los glucósidos derivados de agliconas alifáticas saturadas como la linamarina. El tercer grupo los conforman glucósidos con una aglicona que contiene un doble enlace en la posición alfa o beta del grupo nitrilo. Finalmente, el cuarto grupo está formado por glucósidos con una aglicona alicíclica insaturada como la ginocardina» [12].

Tabla 7.

Glucósidos cianogénicos y sus precursores

Precursors	Basic structures	Derivatives (examples)
 <p>Valine</p>	 <p>Linamarin</p>	<p>Linustatin = Linamarin-6'-glucoside</p>
 <p>Isoleucine</p>	 <p>(<i>R</i>)-Lotaustralin (<i>S</i>)-Epilotaustralin</p>	<p>Neolinustatin = Lotaustralin-6'-glucoside</p>
 <p>Leucine</p>	 <p>(<i>S</i>)-Heterodendrin (<i>R</i>)-Epiheterodendrin</p>	<p>Proacacipetalin = Heterodendrin-2-3-en Cardiospermin = 4-Hydroxy-proacacipetalin Proacaciberin = Proacacipetalin-6'-arabinside</p>
 <p>Cyclopentenylglycine</p>	 <p>(<i>R</i>)-Deidaclin (<i>S</i>)-Tetraphyllin A</p>	<p>Taraktophyllin = 4-(<i>S</i>)-hydroxy-deidaclin Taraktophyllin-6'-rhamnoside Gynocardin = 4-(<i>S</i>)-5-(<i>R</i>)-Tetraphyllin A</p>
 <p>Phenylalanine</p>	 <p>(<i>R</i>)-Prunasin (<i>S</i>)-Sambunigrin</p>	<p>Amygdalin = Prunasin-6'-glucoside Holocalin = <i>m</i>-Hydroxyprunasin Prunasin-6'-malonate Vicianin = Prunasin- 6'-arabinside</p>
 <p>Tyrosine</p>	 <p>(<i>S</i>)-Dhurrin (<i>R</i>)-Taxiphyllin</p>	<p>Proteacin = <i>p</i>-Glycosyloxy-dhurrin Dhurrin-6'-glucoside Nandinin = 4'-Caffeoyl-<i>p</i>-glycosyloxy- mandelonitrile</p>

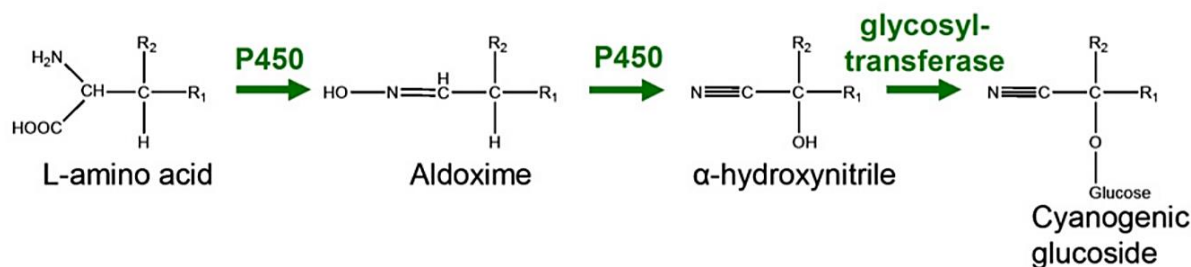
Nota. Clasificación de los glucósidos cianogénicos representativos para cada aminoácido precursor representando como algunos ejemplos la prunasina junto con la sambunigrina y, como diglucósidos la amigdalina y la vicianina como sustancias derivadas de la fenilalanina. Tomado de: D. Selmar, "Biosynthesis of Cyanogenic Glycosides, Glucosinolates and Non-Protein Amino Acids," in *Annual Plant Reviews*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018, pp. 92–181.

1.2.3 Biosíntesis

En la formación de los glucósidos cianogénicos participa un monosacárido o un disacárido junto con un hidroxinitrilo aromático o alifático dependiendo del precursor implicado. «La ruta metabólica actual para la biosíntesis de los glucósidos cianogénicos se divide en tres etapas principales (Figura 8): En primer lugar el aminoácido precursor es convertido a una aldoxima intermediaria (los aminoácidos son hidrolizados a N-Hidroxilaminoácidos que se convertirán a una aldoxima). Estas reacciones son catalizadas por una enzima de la familia citocromo P450. En la segunda fase las aldoximas son transformadas a cianohidrinas (hidroxinitrilos). Nuevamente la enzima que actúa en esta reacción pertenece al grupo de las citocromo P450. Finalmente, las cianohidrinan son glicosiladas mediante una uridina difosfato (UDP)-glucosiltransferasa» [18].

Figura 8.

Anabolismo general de los glucósidos cianogénicos



Nota. Biosíntesis general de los glucósidos cianogénicos a partir de un aminoácido. Tomado de: M. Zagrobelny, S. Bak, and B. L. Møller, “Cyanogenesis in plants and arthropods,” *Phytochemistry*, vol. 69, no. 7. Pergamon, pp. 1457–1468, May 01, 2008, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.019.

1.2.4 Bioactivación (Cianogénesis)

El proceso catabólico de los glucósidos cianogénicos está ligado a la cianogénesis, que como su nombre lo indica, hace referencia a la síntesis de moléculas tanto de lípidos como glucósidos cianogénicos, pero también representa la descomposición de estos mismos mediante una hidrólisis enzimática produciendo moléculas de ácido cianhídrico junto con un compuesto orgánico generalmente un aldehído o una cetona [18].

Se ha reconocido a los glucósidos cianogénicos como fitoanticipinas, moléculas inhibitorias presentes en un individuo vegetal sano para otro tipo de organismos tales como hongos fitopatógenos o fitófagos, por lo que su principal función es la liberación de ácido cianhídrico

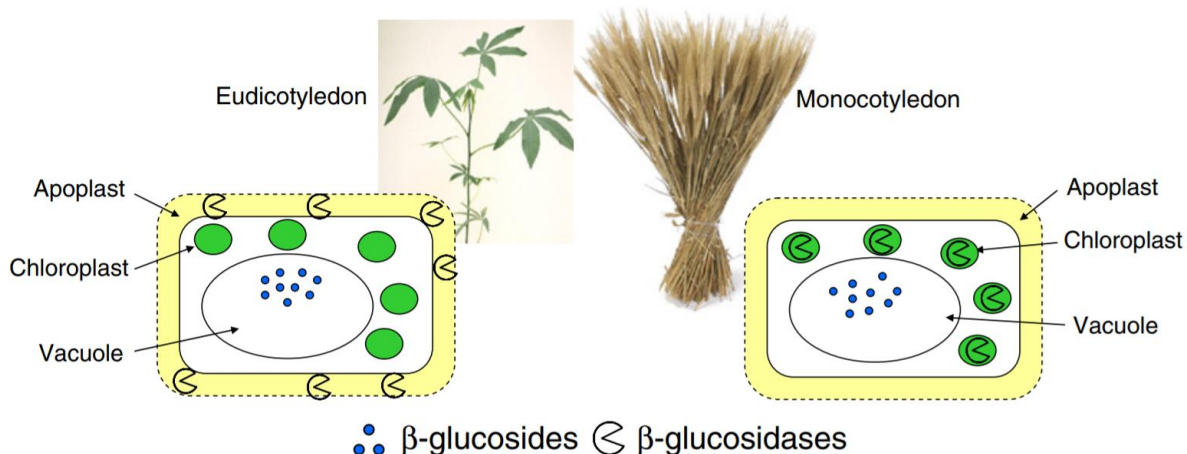
como mecanismo de defensa sobre todo entre la interacción planta-insecto [20], pero se les ha descrito como compuestos generados por la planta como fuente de almacenamiento de nitrógeno en la vacuola central de las células [21]. Diversas investigaciones han intentado encontrar un rol biológico específico de estos glúcidos debido a que sus funciones varían dependiendo de la especie de la planta, ecosistema o factores bióticos o abióticos de estrés [20].

1.2.5 Hidrólisis

La degradación enzimática de los glucósidos cianogénicos solo ocurre cuando el tejido celular se ve físicamente afectado, la ruptura de tejido permite la interacción entre las enzimas ubicadas en el apoplasto del tejido dañado, cuerpos proteicos o en los cloroplastos de las células con los glucósidos cianogénicos (GC) ubicados en la vacuola central (Figura 9) [17],[22].

Figura 9.

Compartimentación celular de las enzimas y glucósidos en plantas eudicotas y monocotiledóneas



Nota. Representación de los diferentes lugares donde residen las β-glucosidas (eudicotas en el apoplasto y monocotiledóneas en los cloroplastos celulares). Tomado de: A. V. Morant *et al.*, “β-Glucosidasas as detonators of plant chemical defense,” *Phytochemistry*, vol. 69, no. 9. *Phytochemistry*, pp. 1795–1813, jun. 2008, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/j.phytochem.2008.03.006.

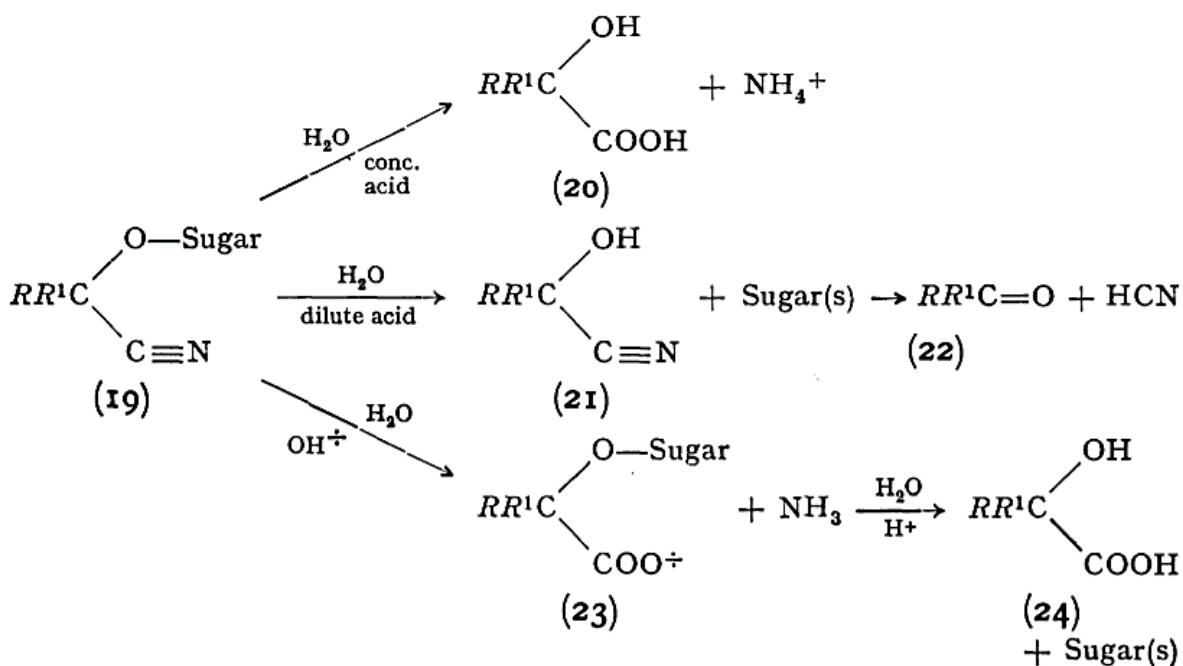
La hidrólisis puede variar según el medio presentado ante la degradación enzimática de los GC, Eyjólfsson [12] en sus estudios explica detalladamente las etapas generales sobre el proceso catabólico de los GC y los productos que pueden darse a partir de ellos (Figura 10). El proceso de cianogénesis se desarrolla en un medio ácido diluido entre un intervalo de pH (5.5-6), obteniéndose

como productos finales HCN y un aldehído o una cetona dependiendo del GC. Cuando la reacción ocurre en un medio ácido concentrado se produce un ácido orgánico y amonio mientras que en un medio básico se produce un hidroxiaácido esterificado y amoniaco como compuestos intermedios llevando a generarse finalmente, un ácido orgánico y un glúcido [3].

La mayoría de los glucósidos cianogénicos los conforman un monosacárido y una cianhidrina de carácter inestable, que es estabilizada por un enlace glucosídico entre el azúcar y la cianhidrina [2]. «En los GC compuestos por un disacárido, como la amigdalina y la vicianina, dos moléculas de azúcar se involucran en dicha estabilización. Sin importar su estructura molecular los GC en su bioactivación participan dos tipos de enzimas, las β -glucosidasas y las Hidroxinitriloliasas. El catabolismo inicia por la degradación enzimática del azúcar por una o más β -glucosidasas (según sea la complejidad del grupo químico) separándose de su correspondiente α -hidroxinitrilo (cianhidrina), posteriormente la cianhidrina involucrada se descompone en presencia de una α -hidroxinitrilo liasa separando el ácido cianhídrico del aldehído o la cetona» (Figura 11) [14].

Figura 10.

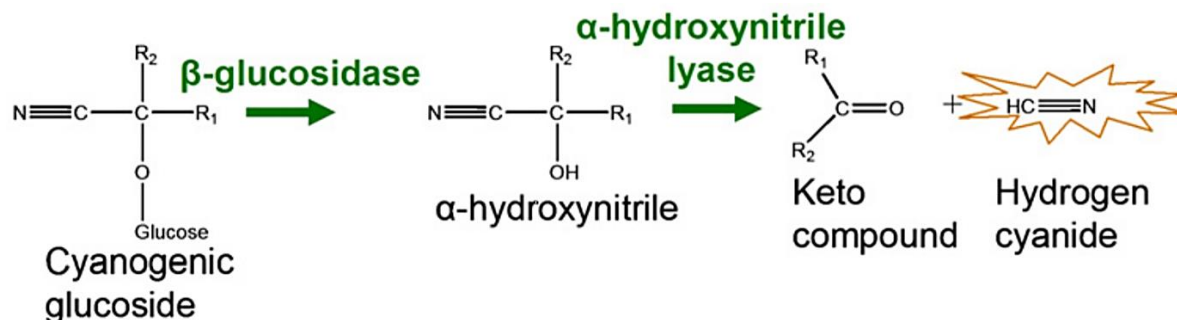
Etapas generales de la hidrólisis enzimática de los glucósidos cianogénicos



Nota. Rutas catabólicas que pueden tomar los glucósidos cianogénicos en función de su pH según Eyjólfsson. Tomado de: W. Bromer *et al.*, *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 28. Vienna: Springer Vienna, 1970, [En Línea]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-211-74019-4>

Figura 11.

Hidrólisis enzimática general de los glucósidos cianogénicos en medio ácido diluido.



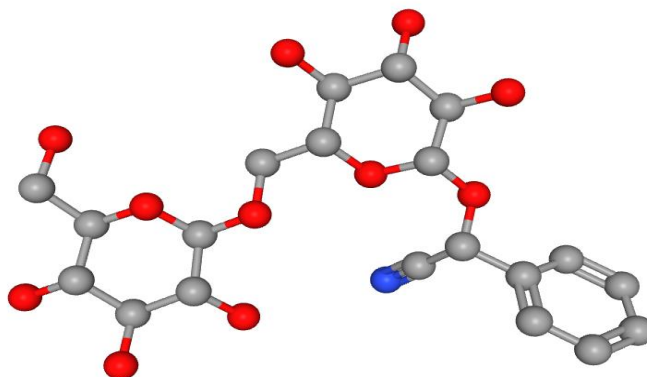
Nota. Bioactivación mediante hidrólisis enzimática de los glucósidos cianogénicos. Tomado de : M. Zagrobelny, S. Bak, and B. L. Møller, “Cyanogenesis in plants and arthropods,” *Phytochemistry*, vol. 69, no. 7. Pergamon, pp. 1457–1468, May 01, 2008,[En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.019.

1.3 Amigdalina

Es un glucósido cianogénico presente en las semillas de diversas plantas pertenecientes a la familia *Rosaceae*, siendo este el primer glucósido de este tipo en descubrirse. Su nombre completo es α (6-O- β -D-glucopiranosil- β D-glucopiranosil benceno) acetónitrilo es una molécula compuesta por una genciobiosa, compuesto conformado por dos moléculas de D-glucosa unidas entre sí (Figura 12).

Figura 12.

Estructura molecular tridimensional de la amigdalina



Nota. Estructura tridimensional de la amigdalina representando los átomos conformantes por su color (Carbono gris, Nitrógeno azul y oxígeno rojo).Tomado de: NCBI, [En Línea], Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/656516>. [23]

1.3.1 Origen

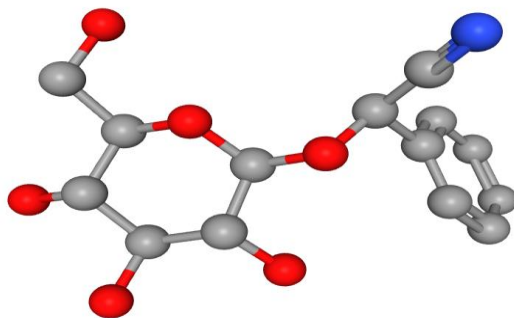
Se le conoce por ser el primer glucósido cianogénico en descubrirse entre los años 1830-1835, su nombre proviene de las semillas amargas (*Amygdalus communis*) donde “amigdalina” proviene del griego *amygdalon* (semilla de almendra) [18]. «En 1837 Liebig y Wöhler continuaron los estudios de Martrès, Vogel, Ittner y Giese, Stange, Robiquet y Boutron-Charlard, donde descubrieron el desdoblamiento de la amigdalina presente en las almendras amargas formando glucosa, benzaldehído y ácido cianhídrico. Estos dos investigadores observaron que, al disolver 567 granos de amigdalina en una cantidad de emulsión de almendras dulces, tal que el peso total fuera de 32 onzas, se obtenía un líquido absolutamente de la misma fuerza en HCN y en aceite volátil de almendras amargas que una solución medicinal denominada *l'aqua amygdalarum amarum* muy común en las farmacopeas prusianas de la época» [13]. Gracias a esta investigación se plantearon análisis tanto cualitativos como cuantitativos de mayor precisión y seguridad para la determinación de las sustancias que contiene la amigdalina en especial para el contenido de HCN presente.

1.4 Prunasina

La prunasina es el D-mandelonitrilo beta-D-glucósido, es el glucósido cianogénico más simple procedente de las plantas pertenecientes al género *Prunus* (Figura 13).

Figura 13.

Estructura tridimensional de la prunasina



Nota. Estructura tridimensional de la prunasina representando los átomos conformantes por su color (Carbono gris, Nitrógeno azul y oxígeno rojo).

Tomado de: NCBI, [En Línea]. Disponible:

[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119033#section=3D-](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119033#section=3D-Conformer)

[Conformer](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119033#section=3D-Conformer) [24]

1.4.1 Origen

La prunasina fue aislada por primera vez por Hérissé en 1905 de las hojas y corteza del cerezo y el laurel junto con la prulaurasina (mezcla equimolar entre prunasina y sambunigrina) [12], su nombre proviene del latín *Prunus* (ciruelo) término que también caracteriza a un género de plantas que contienen este compuesto.

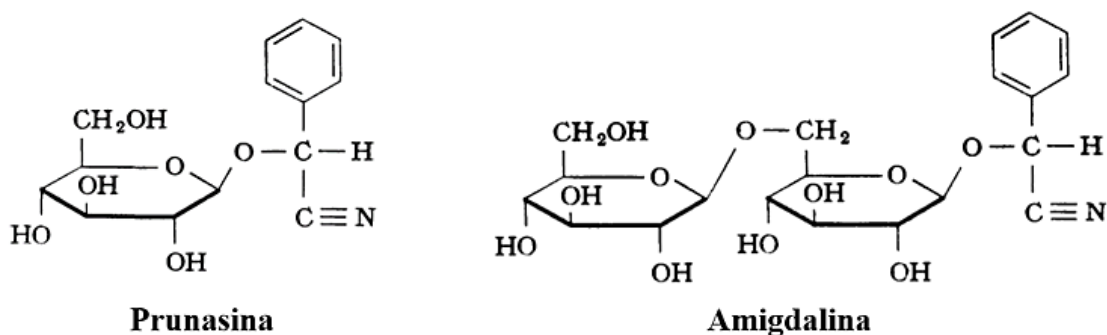
1.5 Glucósidos cianogénicos provenientes de la fenilalanina como aminoácido precursor

“Muchos de los GC más destacados provienen de la L-fenilalanina como la prunasina, acacipetalina, proacacipetalina, 3 hydroxyheterodendrina, sambunigrina, amigdalina, (R)-vicianina, entre otros”[20]. Se caracterizan por poseer una aldoxima como aglicona lo que les permite obtener benzaldehído como uno de sus productos cuando la cianogénesis sucede.

La amigdalina y la prunasina son glucósidos aromáticos cuya estructura difiere simplemente por una molécula de D-glucopiranososa unida mediante un enlace glucosídico β a otra molécula de este tipo, formando así una genciobiosa, generalmente ambos GC son contenidos en las semillas y hojas de plantas pertenecientes al género *Prunus* de la familia *Rosaceae* (Figura 14).

Figura 14.

Estructura molecular de la amigdalina y la prunasina.

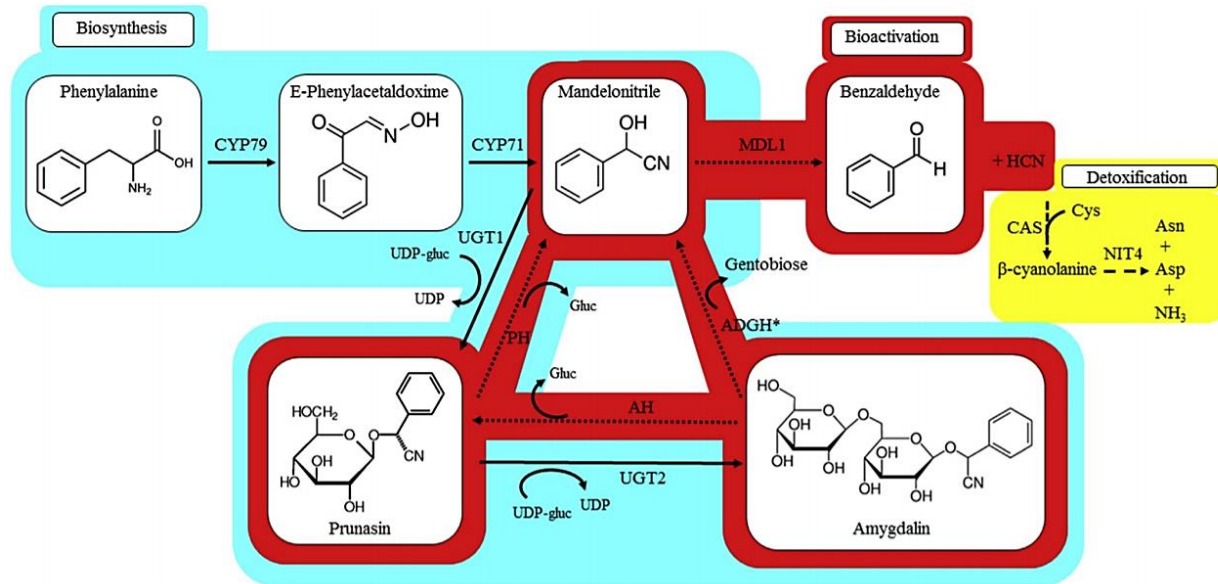


Nota. Diferencias entre las moléculas de amigdalina y prunasina. Tomado de: W. Bromer *et al.*, *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 28. Vienna: Springer Vienna, 1970. [En Línea]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-211-74019-4>

El metabolismo (anabolismo, catabolismo y detoxificación) de estas dos moléculas puede observarse en la siguiente ilustración (Figura 15).

Figura 15.

Rutas metabólicas de la amigdalina y la prunasina



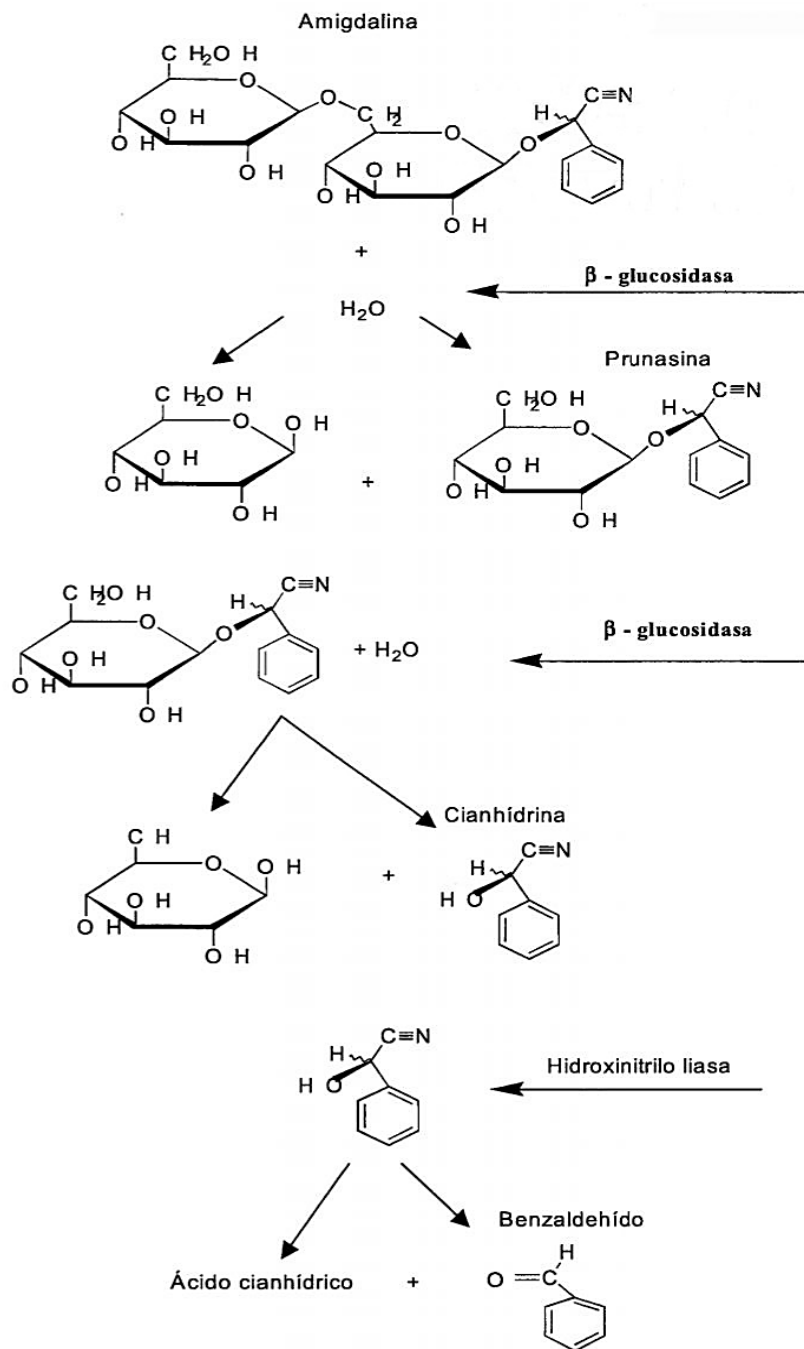
Nota. Las rutas metabólicas son representadas por su coloración, donde el anabolismo (sombreado azul) abarca de izquierda a derecha el proceso de biosíntesis desde la fenilalanina como precursor hasta la amigdalina como el compuesto final; desde la parte inferior derecha hasta la parte superior derecha se observa el catabolismo de la amigdalina (sombreado rojo) hasta la liberación de HCN llevando finalmente a un proceso de detoxificación en las plantas donde este último producto es transformado en cianoalanina hasta su degradación en amoníaco, asparagina y ácido aspártico. Tomado de: J. del Cueto, B. L. Møller, F. Dicenta, and R. Sánchez-Pérez, “ β -Glucosidase activity in almond seeds,” *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 126, pp. 163–172, May 2018, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/j.plaphy.2017.12.028. [25]

1.5.1 Hidrólisis enzimática

La degradación total de la amigdalina consta de tres etapas al ser un disacárido, en la primera etapa ocurre la separación de la genciobiosa por la acción de una β -glucosidasa permitiendo la descomposición de la amigdalina a una molécula de glucosa y una molécula de prunasina; posteriormente otra β -glucosidasa rompe el enlace glucosídico que une a la cianhidrina (mandelonitrilo) con la glucosa restante donde finalmente, la cianhidrina será degradada a ácido cianhídrico y benzaldehído por la degradación enzimática de una hidroxinitriloliasa (Figura 16) [3].

Figura 16.

Hidrólisis enzimática de la amigdalina- prunasina



Nota. Hidrólisis enzimática detallada de la amigdalina-prunasina. Tomado de: G. Arrázola, “Análisis de glucósidos cianogénicos en variedades de almendro: implicaciones en la mejora genética Tesis Doctoral,” 2002.[En Línea], Disponible: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3219/1/Arrazola-Paternina-Guillermo.pdf>

1.6 Hongos filamentosos

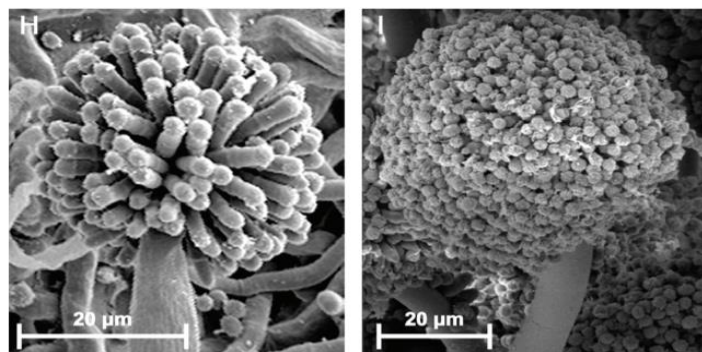
Los hongos filamentosos son un grupo de microorganismos conocidos por su gran capacidad degradativa de materia orgánica gracias a su producción enzimática. « La enzima β -glucosidasa ha sido producida, purificada y caracterizada por variedad de especies de hongos filamentosos, cuyas enzimas, de tipo extracelular, pertenecen al grupo 3 de hidrolasas glucosídicas. Se conoce que la β -glucosidasa ha sido producida por organismos como *Acremonium persicinum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, entre otros. La especie *Aspergillus niger* es la mayor fuente de β -glucosidasa como recurso de trabajo bajo el nombre comercial de Novazym 188»[26].

1.7 Generalidades del *Aspergillus niger*

Es un hongo filamentososo caracterizado por su coloración negra y su aparición en ciertas comidas. «Fue descrito en 1867 en un manuscrito titulado "*Physiologie des mucédinees*" por el botánico Philippe Eduard Léon van Tieghem quien lo aisló de agallas mohosas con el objetivo de estudiar la producción de ácido gálico mediante fermentación fúngica. Es un hongo cosmopolita cuyo crecimiento puede darse entre 6 a 47°C, pH 1.5 y 9.8 y una actividad acuosa mayor o igual a 0,77»[27] (Figura 17).

Figura 17.

Morfología del Aspergillus niger



Nota. imágenes tomadas por microscopía electrónica del *Aspergillus niger*. Tomado de: J. Dijksterhuis and H. Wösten, “Development of *Aspergillus niger*,” *Studies in Mycology*, vol. 74, pp. 1–93, Mar. 2013, [En Línea]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/journal/studies-in-mycology/vol/74/suppl/C>

En la Tabla 8 puede observarse su clasificación taxonómica.

Tabla 8.

Clasificación taxonómica

Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Eurotiomycetes</i>
Orden	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Aspergillaceae</i>
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>Niger</i>

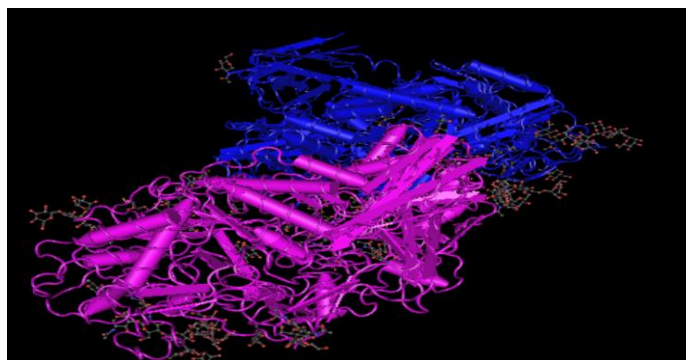
Nota. Clasificación taxonómica del hongo filamentoso *Aspergillus niger*. Tomado de: J. Dijksterhuis and H. Wösten, “Development of *Aspergillus niger*,” *Studies in Mycology*, vol. 74, pp. 1–93, Mar. 2013, [En Línea]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/journal/studies-in-mycology/vol/74/suppl/C>

1.7.1 Producción enzimática

El *A. niger* es reconocido y usado en la industria por su producción de ácido cítrico como un metabolito de interés; sin embargo, se le atribuye la variedad de enzimas que puede producir, tales como la α -amilasas, catalasas, celulasas, α -glucosidasas, β -glucosidasas (Figura 18), lipasas, entre otras (Tabla 9)[28].

Figura 18.

*Representación gráfica de una enzima, β -glucosidasa producida por hongos del género *Aspergillus**



Nota. Estructura cristalina de una β -glucosidasa del *A. aculeatus* en complejo con D-glucosa. Tomado de : NCBI, [En Línea].

Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4IIG> [29].

En la Tabla 9, se puede observar algunas de las enzimas producidas por el *A.niger*

Tabla 9.

Ejemplos de enzimas producidas de manera extracelular del Aspergillus niger

Number	Commonly used name	Systematic name
1.1.3.4	Glucose oxidase	β -D-Glucose:oxygen 1-oxidoreductase
1.11.1.6	Catalase	Hydrogen-peroxide:hydrogen-peroxide oxidoreductase
3.1.1.3	Lipase	Triacylglycerol acylhydrolase
3.1.1.11	Pectinesterase	Pectin, pectylhydrolase
3.1.1.20	Tannase	Tannin acylhydrolase
3.1.3.8	Phytase	myo-Inositol-hexakisphosphate-3-phosphohydrolase
3.2.1.1	α -Amylase	1,4- α -D-Glucan glucanohydrolase
3.2.1.3	Glucoamylase	1,4- α -D-Glucan glucohydrolase
3.2.1.4	Cellulase	1,4-(1,3;1,4)- β -D-Glucan-4-glucanohydrolase
3.2.1.6	β -glucanase	1,3-(1,3;1,4)- β -D-Glucan 3(4)-glucanohydrolase
3.2.1.7	Inulinase	2,1- β -D-Fructan fructanohydrolase
3.2.1.8	Xylanase	1,4- β -D Xylan xylanohydrolase
3.2.1.15	Polygalacturonase	Poly(1,4- α -D-galacturonide) glucanohydrolase
3.2.1.21	Cellobiase	β -D-Glucoside glucohydrolase
3.2.1.22	α -Galactosidase	α -D-Galactoside galactohydrolase
3.2.1.23	β -Galactosidase	β -D-Galactoside galactohydrolase
3.2.1.24	α -Mannosidase	α -D-Mannoside mannohydrolase
3.2.1.26	Invertase	β -D-Fructofuranoside fructohydrolase
3.2.1.55	α -L-Arabinofuranosidase	α -L-Arabinofuranoside arabinofuranohydrolase
3.2.1.57	Isopullulanase	Pullulan-4-glucanohydrolase
3.2.1.67	Poly(galacturonate) hydrolase	Poly(1,4- α -D-galacturonide) galacturonohydrolase
3.2.1.78	Mannanase	1,4- β -D-Mannan mannanohydrolase
3.2.1.89	Galactanase	Arabinogalactan 4- β -D-galactanohydrolase
3.4.16.1	Carboxypeptidase	Peptidyl-L-amino-acid hydrolase
4.2.2.2	Pectate lyase	Poly(1,4- α -D-galacturonide) lyase
4.2.2.10	Pectin lyase	Poly(methoxygalacturonide) lyase

Nota. Metabolitos enzimáticos producidos extracelularmente por *A. niger* con su respectiva clasificación y nombre sistemático. Tomado de: C. K. Campbell, "Forms of Aspergillosis," in *The Genus Aspergillus*, Springer US, 1994, pp. 313–319.

Ácido cianhídrico

Es un líquido incoloro a 20°C, con ligero olor a almendras amargas; en fase gaseosa es conocido como cianuro de hidrógeno. Se le considera un ácido débil caracterizado por su estructura lineal conformado por un grupo nitrilo o cianuro unido a un hidrógeno. Tiene un punto de ebullición de 26°C lo cual permite muy fácilmente su paso al estado gaseoso. Algunas industrias utilizan compuestos de cianuro en procesos de síntesis para la fabricación de plásticos, papel, telas, gomas, fotografía y plaguicidas. Actualmente, su principal aplicación se basa en la recuperación de metales preciosos.

1.7.2 Origen e historia

El ácido cianhídrico, también denominado ácido prúsico, es un compuesto altamente tóxico que puede encontrarse tanto en animales como en plantas. Fue descubierto en 1782 por Carl Wilhelm Scheele al experimentar con azul de Prusia (actualmente conocido como ferrocianuro de hierro). En un principio, el ácido cianhídrico fue usado con fines terapéuticos proveniente del destilado de

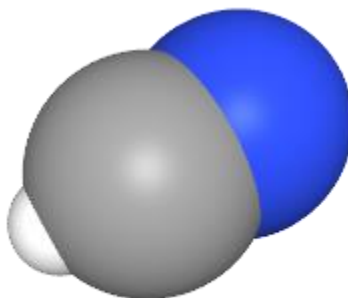
diversas plantas hasta finales del siglo XIX, quien fue reemplazado principalmente por barbitúricos y otros productos sintéticos recién descubiertos. En el siglo XX, se empleó principalmente como gas venenoso para la eliminación de plagas y como arma química. Sin embargo, se empezó a utilizar como reactivo para la elaboración de numerosos compuestos químicos que hoy en día se elaboran a través de dicho compuesto tales como el adiponitrilo, cianhidrina de acetona y cianuro de sodio. [13].

1.7.3 Estructura Química

Es un ácido débil, líquido, incoloro, tóxico, de baja viscosidad y con olor característico a almendras amargas; posee como estructura química una molécula lineal formada por carbono y nitrógeno mediante la unión de un enlace triple covalente y por un hidrógeno con un enlace covalente sencillo (Figura 19). Esta molécula, es una especie química aniónica soluble en agua formando el grupo CN, igualmente es una molécula inorgánica del grupo de las sales que puede reaccionar entre su ácido o formar sales estables reaccionando con metales de transición [30]. Gran parte de la vegetación y algunos frutos contienen ácido cianhídrico. Por naturaleza química se produce por la interacción de glucósidos cianogénicos y una enzima hidrolítica que es la β -glucosidasa la cual da paso al proceso de cianogénesis y el rompimiento de las células de vegetales y frutos facilitando la interacción de estos compuestos causando la liberación del HCN [31].

Figura 19.

Estructura molecular del ácido cianhídrico



Nota. Estructura tridimensional del HCN representando los átomos por sus colores (Carbono gris, hidrógeno blanco y nitrógeno azul). Tomado de : NCBI, [En Línea]. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/768> [32].

La producción industrial del ácido cianhídrico se realiza a nivel mundial a través de procesos como el Sohio, Shawinigan, BMA y Andrussow; este último, se destaca por ser el proceso con mayor

eficiencia; razón por la cual se le atribuye como el principal método de fabricación de HCN a nivel mundial, a partir de la síntesis de amoníaco y metano en una reacción altamente exotérmica con el uso del catalizador de platino y rodio, en un reactor adiabático que permite alcanzar temperaturas mayores a 1000°C y presiones de 2 bar [33]. En la Tabla 10 se pueden observar algunas propiedades de esa sustancia.

Tabla 10.

Propiedades fisicoquímicas del HCN

Propiedades	HCN	Unidades
Peso molecular	27.03	g/mol
Pto de fusión	-13	°C
Pto de ebullición	26	°C
Presión de vapor	82.6	kPa
Pto de inflamación	-18	°C
Solubilidad en agua	100	%
Volatilidad	100	%
Densidad relativa	0.69	
Cte de ionización	7.2×10^{-10}	K a 25°C
Apariencia	incoloro	
Olor	almendras	
Cte de disociación	9.2	pka
Calor de combustión	642	kJ/mol
Calor de vaporización	25.2	kJ/mol
Densidad del vapor	0.901	
T. de autoinflamación	538	°C

Nota. Propiedades físicas y químicas generales del HCN. Tomado de: NCBI, [En Línea]. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/768>.

1.7.4 Aplicaciones

La producción a nivel mundial del ácido cianhídrico aumenta anualmente entre un 1 a un 2%, donde la mayor parte del uso del ácido cianhídrico pertenece a la industria minera. Este ácido se puede usar como punto de partida para la síntesis de otros compuestos químicos, como es el caso del adiponitrilo, usado como materia prima para la síntesis de Nylon 66. Otro reactivo es la

cianhidrina de acetona usada principalmente como disolvente a nivel de laboratorio, pinturas, medicina, adhesivos e industria automotriz, así mismo, está la metionina, uno de los nueve aminoácidos esenciales para el ser humano, permitiendo el crecimiento y regeneración celular, funcionando de igual modo, como alimento en la industria porcina y avícola. Por último, está el grupo de los cianuros siendo el más importante a nivel mundial, empleándose en la industria farmacéutica, galvánica, y metalúrgica, así como en la síntesis de polímeros [33].

1.8 Benzaldehído

También conocido como bencenocarbal, es el compuesto orgánico más simple del grupo de aldehídos aromáticos. Tiene color amarillento opaco, posee un olor característico a almendras y un punto de ebullición de 180°C, además presenta miscibilidad en compuestos como alcohol, éter, benceno y es poco soluble en agua . El benzaldehído presenta una oxidación acelerada en presencia de oxígeno, transformándose en ácido benzoico. Es uno de los compuestos intermedios para la síntesis de compuestos en las industrias farmacéuticas, tinturas, perfumes y alimentos [34].

1.8.1 Origen e historia

El benzaldehído es conocido por ser un componente del aceite de almendra. Se puede encontrar en la naturaleza o de manera artificial. Alrededor del año 1832 , los científicos Friedrichs Wöhler y Justus Liebig, realizaron un estudio sobre la oxidación de alcohol, en ese momento ensayaron con aceite de almendra amarga e involuntariamente encontraron el compuesto, del cual procedieron a aislarlo para posteriormente usarlo como fuente de investigación sobre la química orgánica [35].

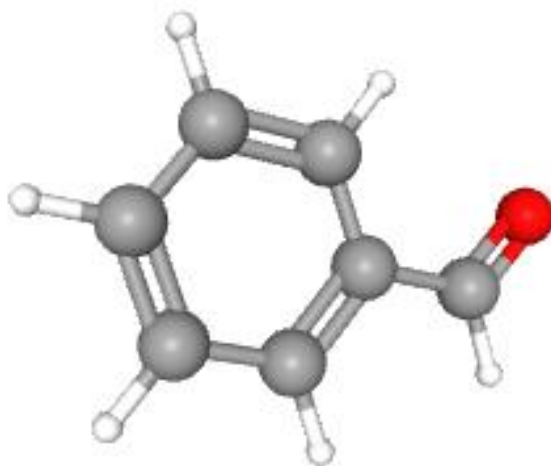
Los métodos convencionales para su obtención de manera sintética generan trazas de impurezas que, en consecuencia, producen benzaldehído de baja pureza y cuyo rendimiento en usos posteriores es menor, debido a que es compuesto sensible frente a otras sustancias. El benzaldehído es un producto que se encuentra de manera natural, pero últimamente se busca sintetizar mediante principios de la química verde como una forma limpia y natural de obtener el benzaldehído y demás subproductos intermedios para usos importantes en la industria [36].

1.8.2 Estructura química

El benzaldehído ha sido detectado en 100 especies de plantas distintas , consistiendo en un anillo de benceno con un sustituyente de aldehído, haciéndolo perteneciente al grupo de estos (Figura 20). Los aldehídos de bajo peso molecular tienen olores penetrantes agradables, a diferencia de los que tienen una estructura molecular más compleja, de tal forma que la percepción de olores representativos de los aldehídos y algunas cetonas se intensifiquen, característica que frecuenta su uso en la industria cosmética [37]. En la Tabla 11 se pueden observar algunas propiedades sobre esa sustancia.

Figura 20

Estructura molecular del benzaldehído.



Nota. Estructura tridimensional del benzaldehído representando sus átomos por color (Carbono gris, hidrógeno blanco y oxígeno rojo). Tomado de : NCBI, [EN Línea]. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzaldehyde> [38].

Tabla 11.*Propiedades fisicoquímicas del benzaldehído*

Propiedades	Benzaldehído	Unidades
Peso molecular	106.12	g/mol
Pto de fusión	-26	°C
Pto de ebullición	170	°C
Presión de vapor	0.13	kPa
Pto de inflamación	64.4	°C
Solubilidad en agua	0.6	%
Viscosidad	1.321	cp a 25°C
Densidad relativa	1.04	
Cte de disociación	14.9	pka
Apariencia	incoloro	
Olor	almendras	
Índice de refracción	1.5456	a 20°C/D
Calor de combustión	-3525	kJ/mol
Calor de vaporización	42.5	kJ/mol a 179°C
Densidad del vapor	3.65	
T. de autoinflamación	192.22	°C

Nota. Propiedades físicas y químicas generales del benzaldehído. Tomado de: NCBI, [En Línea]. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzaldehyde>.

1.8.3 Aplicaciones

El benzaldehído es utilizado en la industria como aromatizante y saborizante por su olor característico a almendra, también es aprovechado como disolvente industrial e intermediario en la industria de perfumes, aceites, algunos ésteres, productos farmacéuticos, aditivos y tintes alicíclicos. Es utilizado para formar otros compuestos químicos como el ácido benzoico [39].

En la actualidad, el benzaldehído es sintetizado industrialmente por la oxidación de tolueno, siendo un subproducto de éste o por el método de hidrólisis de cloruro de bencilideno. Gran parte de industrias de alto impacto que consumen benzaldehído están buscando vías alternas a su obtención y hasta el momento una de las mejores opciones es por medio de la oxidación de estireno usando como catalizadores zeolitas y peróxido de hidrógeno para suavizar la reacción, obteniendo en varios estudios y escalando a nivel industrial como la mejor opción [36].

1.9 Técnicas de cuantificación

1.9.1 *Microdifusión (determinación gravimétrica)*

Se emplea la microdifusión de Conway como método de aislamiento de un analito el cual utiliza un sistema de cámara cerrada permitiendo así la determinación de algunas sustancias susceptibles de volatilización y fijación en un medio apropiado [40]. Este método consiste en dos compartimientos ubicados de tal forma que en una de las cavidades esté la sustancia volátil y en la cavidad restante la sustancia de fijación, lo que asegura la hermeticidad de la cámara, estableciendo en esta una corriente de gas desde el área de liberación hacia el área de fijación, el cual entrará en contacto con la diferencia de gases de ambas superficies. Después del contacto de gases, la muestra es aislada para realizar un análisis cuantitativo por método de titulación; para realizar un correcto análisis por medio de esta técnica se deben tener en cuenta los factores ambientales, tiempo, dimensiones de los viales, reactivos a usar, agitación y, por último, los reactivos usados para la titulación [3]. Últimamente este método ha sido usado para determinar la concentración de alcohol en la sangre, orina y en análisis criminalísticos, igualmente para determinación de nitrógeno y de dióxido de carbono siendo uno de los métodos más económicos para análisis químicos cualitativos.

1.9.2 *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*

La cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas cromatográficas más usadas ya que tiene la capacidad de separar los analitos de diferente naturaleza de la mezcla de una muestra a analizar. Este método interviene una fase móvil que contiene la parte líquida y es la que lleva la muestra a través de la fase estacionaria que puede ser sólida o en algunos análisis puede tener una película líquida sostenida con una película sólida. Los componentes que presentan mayor afinidad con la fase estacionaria se pueden desplazar con una menor velocidad que los que no presentan ese tipo de afinidad [41].

Actualmente se emplea esta técnica para la separación de compuestos orgánicos que presenten volatilidad variada, ya que la cromatografía líquida tiene alta sensibilidad y una fácil adaptación para análisis cuantitativos, separación de especies por su volatilidad o al ser termolábiles. Generalmente las industrias disponen de estos equipos para cuestiones analíticas, donde manejan compuestos como los aminoácidos, hidrocarburos, proteínas, terpenos, plaguicidas, antibióticos y algunas variedades de sustancias inorgánicas [42].

2. VARIABLES QUE INTERVIENEN EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA AMIGDALINA Y LA PRUNASINA

Las almendras del durazno son caracterizadas como cuerpos proteicos con una gran variedad de componentes, destacándose por su cantidad en grasas, proteínas y su contenido en agua. Su composición es similar a las almendras dulces, pero una diferencia que repercute es su sabor amargo provocado por el contenido de amigdalina.

Estudios realizados sobre la genética de las almendras demuestran que dicha propiedad es influenciada por un genotipo "amargo" de naturaleza recesiva dependiente de la variedad de la planta, (trátese del género *Prunus*). La investigación desarrollada por Guillermo Arrázola sobre el mejoramiento genético del almendro *Prunus dulcis* (Miller) implicando la naturaleza de glucósidos cianogénicos presentes en dicha planta para diversas variedades de la especie [3], muestra un estudio profundizado acerca de los factores y variables que interceden en cuanto a la extracción de amigdalina y prunasina, así como su contenido en cianuro entre muestras amargas y dulces de almendra. Las variables mostradas a continuación se tomaron de investigaciones realizadas por diversos autores

2.1 Tratamiento y conservación de la muestra

Diversos autores que han trabajado con muestras de semillas de naturaleza similar para la extracción y análisis de GC, generalmente de especies de la familia *Rosaceae*, prepararon la muestra mediante la selección de almendras teniendo en cuenta la homogeneidad de las semillas y su lugar de procedencia implicando la variedad de dicha especie.

Dado a que las almendras tienen un gran contenido de humedad, variable que repercute en la concentración de GC presentes en la muestra, es importante minimizar su pérdida, Conn y Møller [14], Dicenta y Arrázola [43], y Poulton [44] en sus investigaciones sobre el contenido de amigdalina realizaron una trituration para darle uniformidad al material y consecuentemente una congelación de la muestra.

2.1.1 Trituración

La trituration facilita el manejo de las muestras en los sistemas extractantes a tratar, permitiendo una mayor difusión del analito y reduciendo la variabilidad en la cantidad aislada de la sustancia

objetivo. El proceso de trituración es recomendable realizarse en equipos con superficies lisas, evitando un apelmazamiento de trozos de almendra que pueda causar pérdidas considerables de muestra, de igual forma, el calentamiento no deseado en los equipos de molienda o trituración, según sea el caso deberán ser controlados, ya que en el momento de disrupción del tejido de la semilla, da inicio a la degradación enzimática y un incremento de temperatura puede aumentar la velocidad en que se da la reacción [45].

El tamaño de partícula recomendado para análisis cromatográficos y análisis que impliquen una difusión del analito es de 1 mm o menor según Del Cueto, Møller y Dicenta [25], y Arrázola [3], autores que han realizado cromatografía líquida de alta resolución empleando diferentes tamaños entre 1 a 5 mm.

2.1.2 Conservación de la muestra

Una vez triturada la muestra, debe ser congelada o liofilizada, operaciones que permiten reducir drásticamente la velocidad de reacción al tratarse de una descomposición en medio acuoso. El proceso puede llevarse a cabo mediante una congelación instantánea empleando nitrógeno líquido de manera habitual por refrigeración. El proceso instantáneo asegura una cristalización homogénea del agua contenida en la muestra, lo que permite un mayor control sobre la reacción gracias al impedimento de la generación de cristales de mayor tamaño dentro del tejido celular, pero, no es un factor de mucha relevancia en cuanto a la recuperación de contenido de cianuro o amigdalina. Si se opta por una congelación por refrigeración se recomienda mantener la muestra a una temperatura de -18°C o menor hasta su posterior uso. El congelamiento de la muestra ayuda también a mantener en buen estado las grasas de la semilla, evitando su enranciamiento prematuro.

2.2 Variables que intervienen en la extracción

Los sistemas extractantes que pueden emplearse para el aislamiento de la amigdalina, prunasina y sus derivados (HCN y benzaldehído) son muy variados, aunque, existen similitudes que permiten adaptar una mejora en los sistemas extractantes, por ejemplo la proporción de solventes que se aplican, el tiempo de ejecución de la extracción, el caudal de operación para extracción por cromatografía líquida; en el caso de extracciones simples es importante el número de reflujos que deben realizarse en caso de extracciones discontinuas o, el tiempo de operación y su temperatura.

2.3 Sistemas extractantes

2.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución

Las técnicas cromatográficas por medio líquido son muy comunes en este tipo de análisis debido a su precisión y fiabilidad en la obtención de resultados. Generalmente se selecciona como analito a la amigdalina por su participación y contenido en varios alimentos, además de ser uno de los glucósidos cianogénicos más comunes en insectos y plantas. Al analizar la cantidad de amigdalina mediante cromatografía HPLC es posible cuantificar la cantidad total de cianuro, ventaja sobre otras técnicas que directamente miden el contenido de cianuro ignorando la procedencia del GC precursor.

2.3.1.i Tipo de solvente. La extracción de GC usualmente emplea tres tipos de disolventes, el acetonitrilo, el metanol y el agua. Estas sustancias, que actúan como fase móvil en el cromatógrafo pueden aplicarse en estado puro o en proporciones varias entre estas mismas. Muchos investigadores del área han preferido utilizar el metanol, en estado puro y en proporciones junto con agua para sus análisis como es el caso de Bolarinwa, Orfila y Morgan [46], Boháčová, Procházková y Halko [47], Radoičić *et al* [48], Jihyun *et al* [49] y Zhang *et al* [50] enfatizando en el contenido de amigdalina proveniente de varias semillas de frutas de hueso y variedades de almendras amargas.

2.3.1.ii Tiempo de retención. El tiempo de retención del proceso se encuentra relacionado con la hidrólisis enzimática ocuriente en la muestra. Al tratarse principalmente de la amigdalina como el GC más abundante a comparación de la prunasina, la molécula irá degradándose en función del tiempo, esto, también se encuentra ligado al tipo de solvente a usar. La hidrólisis ocurre en medio acuoso, es decir que si se aplica en la fase móvil un porcentaje de agua se promueve la obtención de las moléculas partícipes en la hidrólisis (amigdalina, prunasina, mandelonitrilo, ácido cianhídrico y benzaldehído).

La concentración de cada molécula puede variar según la proporción de agua a usar, al igual que el tiempo empleado; en otras palabras, mientras más tiempo se encuentre la molécula en el proceso se obtendrá mayor concentración de benzaldehído y HCN. Arrázola demuestra en su trabajo [3], a través del uso de diferentes mezclas de solventes a diferentes proporciones la concentración de amigdalina expresada en contenido total de cianuro (Tabla 12). El autor recomienda el uso de metanol puro para el análisis simultáneo de amigdalina y prunasina, mientras que si solo se desea

obtener el contenido total de cianuro se aplique una proporción de metanol: agua 80:20 con un tiempo máximo de extracción de 4 horas, ya que al tratarse de una reacción enzimática hidrolítica, prolongar el tiempo de operación puede llegar a perder el contenido de los productos de interés por su naturaleza sensible a condiciones ambientales.

Tabla 12.

Comparación de resultados en la aplicación de diferentes extractantes mediante cromatografía HPLC

Extractante	Tiempo de retención	Concentración
Metanol	Amigdalina: 3.5 min	9.8 mg cianuro/100g
Agua	Amigdalina: 3.3 min No Identificado: 8.2 min	$C_{\text{agua}} = C_{\text{metanol}} / 360$ Pico ancho y asimétrico
Metanol : Agua (80:20)	Amigdalina: 3.3 min Prunasina: 5.9 min	$C_{\text{metanol:agua (80:20)}} = C_{\text{metanol}} / 8$ $C_{\text{metanol:agua(80:20)}} = 8.8 \text{ mg/100g}$
Metanol : Agua (50:50)	Amigdalina: 3.3 min No identificado: 8.3 min	$C_{\text{metanol:agua (50:50)}} = C_{\text{metanol}} / 36$ Pico ancho y asimétrico
Acetonitrilo : Agua (20:80)	Amigdalina: 3.3 min No identificado 8.3 min	$C_{\text{acetonitrilo :agua (20:80)}} = C_{\text{metanol}} / 36$ Pico ancho y asimétrico

Nota. Se indica en los resultados el tiempo de retención empleado y la concentración de amigdalina y prunasina obtenida expresada en contenido total de CN aplicando cromatografía líquida de alta resolución. Tomado de: G. Arrázola, “Análisis de glucósidos cianogénicos en variedades de almendro: implicaciones en la mejora genética Tesis Doctoral,” 2002. [En Línea], Disponible: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3219/1/Arrazola-Paternina-Guillermo.pdf>

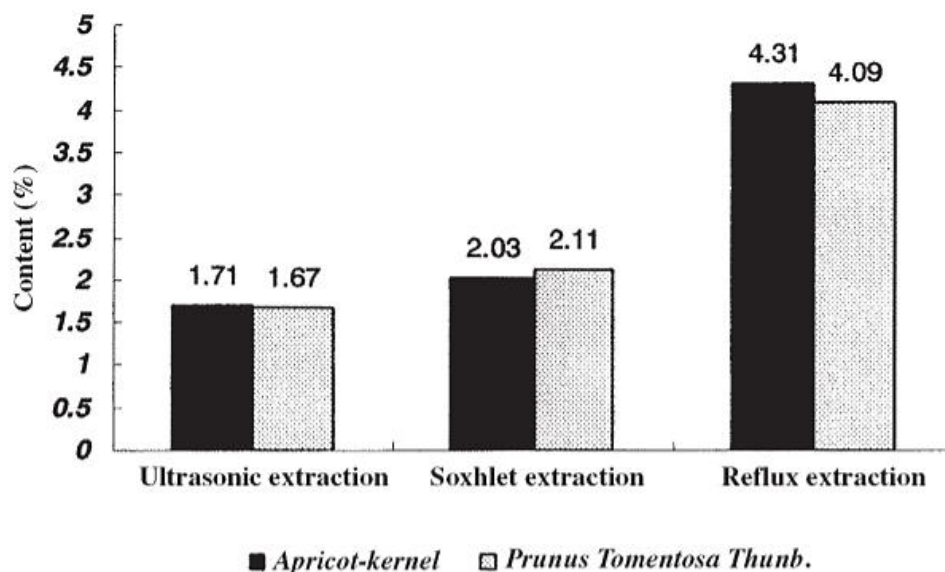
2.3.2 Extracción por Reflujo y Soxhlet

La extracción Soxhlet es uno de los sistemas extractantes más simples y eficaces para el aislamiento de diversas sustancias de tipo orgánico, es un sistema que permite la separación de las grasas y los glúcidos contenidos en una muestra determinada. En este caso se sabe que la semilla del durazno tiene un porcentaje en grasas entre un 40-46 % de contenido [51], otros autores en sus trabajos investigativos obtuvieron un porcentaje entre el 40% al 54% [52]. Generalmente esta técnica se emplea para la obtención del aceite de las semillas utilizando hexano como solvente; sin embargo, muchos autores han recomendado el uso de solventes más amigables para su extracción [9], [52]. Para la extracción de GC de la semilla, junto con proporciones de aceite autores como Ruiz y García [53] Radoičić *et al* [48], y Feng, Ding y Zheng [54], realizaron ensayos experimentales para la obtención de amigdalina de especímenes de almendra de diferente

procedencia empleando etanol, metanol y agua como solventes. Los extractos obtenidos permiten realizar su análisis por cuantificación dependiendo de la metodología implicada, Ruíz y García aplicaron un proceso de cristalización para cuantificar la amigdalina recuperada, otros como Amaya, Cárdenas y Gómez [55] emplearon cromatografía líquida al igual que Feng, Ding y Zheng, quienes compararon el uso de estos dos métodos extractivos junto con una extracción ultrasónica (Figura 21).

Figura 21.

Comparación de resultados en la aplicación de diferentes sistemas extractantes para contenido de amigdalina.



Nota. Contenido de amigdalina en semillas de albaricoque y *Prunus Tomentosa* obtenido mediante tres métodos extractantes: Extracción ultrasónica, Soxhlet (empleando metanol) y por reflujo simple (empleando agua). W. Feng, M.-Y. Ding, and R. Zheng, “Isolation and Quantitation of Amygdalin in Apricot kernel and *Prunus tomentosa* thunb by HPLC whit solid-Phase extraction,” *Journal of Chromatographic Science*, vol. 43, 2005, [En línea]. Disponible: <https://academic.oup.com/chromsci/article-abstract/43/7/383/384427>.

2.3.2.i Consideraciones sobre las variables. Básicamente, la obtención de buenos resultados mediante estos sistemas extractantes tradicionales se fundamenta en el tiempo de extracción y la temperatura de operación, también ligados a la naturaleza del solvente. Consecuente a los resultados, los autores recomiendan una temperatura entre los 70°C hasta los 100°C durante 1 a 5 horas según se considere en la experimentación [53].

2.3.2.ii Remoción de grasas. Como se ha dicho, las extracciones continuas por el método Soxhlet permiten la separación del contenido graso de un material en específico, Arrázola desarrolló estudios sobre la relevancia de la presencia de estas sustancias para la extracción de amigdalina debido a que las grasas pueden interferir en el análisis cuantitativo del glucósido [3]. El autor llegó a la conclusión mediante análisis cromatográficos y por microdifusión que el desengrasado de la muestra causa una pérdida del contenido de amigdalina y prunasina, por lo que recomienda no realizar un desengrasado; por lo tanto, no se llevará a cabo un desengrasado previo en la práctica experimental de este proyecto.

2.3.3 Variables que intervienen en la hidrólisis enzimática

La reacción de descomposición de la amigdalina y la prunasina requiere especial cuidado en cuanto al contenido de productos a obtener, para el caso del diglucósido y el monoglucósido se sabe que se degradan secuencialmente hasta ácido cianhídrico, benzaldehído y glucosa, pero como se ha visto, su degradación se ve afectada principalmente por el pH del medio en que se presente, variando los productos químicos finales. A continuación, se presentan las variables más influyentes en cuanto a la determinación de los productos deseados y el comportamiento de la reacción en sí.

2.3.3.i Potencial de hidrógeno. La primera variable a tener en cuenta, e inclusive la de mayor importancia es el pH. Bioquímicamente el metabolismo de los organismos que realizan el proceso de cianogénesis ocurre en un medio ligeramente ácido, liberando el HCN hasta la fase de detoxificación [25]. En las Tablas 13 y 14 se puede observar algunas propiedades óptimas de las enzimas propias de diferentes especies que contienen GC clasificadas por glucosidasas (Tabla 13) e hidroxinitriloliasas (Tabla 14). Las enzimas son denominadas según la molécula a hidrolizar. Para el caso de especies que tengan amigdalina se les conoce como amigdalina hidrolasa (AH), así como la prunasina, prunasina hidrolasa (PH), enzimas que actúan eficientemente en un pH entre 4.5 a 5.0 según la investigación de Poulton [14]. En el caso de las liasas relacionadas con especímenes de almendras amargas, *Prunus amygdalus* el pH óptimo se encuentra entre un pH de 5.5 a 6.0 para la degradación del mandelontirilo en HCN y benzaldehído. Es importante resaltar que ambas enzimas se encuentran naturalmente en la semilla.

Tabla 13.

Propiedades de β -glucosidasas purificadas hidrolizando glucósidos cianogénicos aromáticos

Enzyme	Fold purification	Native molecular mass (kDa)	Subunit molecular mass (kDa)	pI	Carbohydrate	pH optimum	Reference
<i>Prunus serotina</i> amygdalin hydrolases (I and II)	209 (I) 216 (II)	55–60	62	6.6 (I) 6.5 (II)	Yes	4.5–5.0	Kuroki & Poulton (1986)
<i>Prunus serotina</i> prunasin hydrolases (I, IIa and IIb)	122 (I) 85 (IIb)	68 (I) 140 (IIa) 68 (IIb)	69.5 (I) 69.5 (IIa) 69.5 (IIb)	4.0–4.5	Yes	5.0	Kuroki & Poulton (1987)
<i>Sorghum bicolor</i> dhurrinases (1A, 1B and 2A)	56 (1A) 54 (1B) 100 (2A)	200–240 (1A) 100–110 (1B) 250–300 (2A)	57 (1A, 1B) 61 (2A)	5.5 (1A, 1B)	No	6.0–6.2 (1B, 2A)	Hösel et al (1987)
<i>Davallia trichomanoides</i> vicianin hydrolase	7	340	32.5, 49, 56	4.6–4.7	No	5.0–6.0	Lizotte & Poulton (1988)

Nota. Propiedades generales de las enzimas glucosidasas purificadas de varias especies de plantas. Tomado de: E. E. Conn et al., Ciba Foundation Symposium 140 - Cyanide Compounds in Biology. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1988, [En Línea]. Disponible: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470513712>

Tabla 14.

Propiedades de hidroxinitrilosidasas purificadas hidrolizando glucósidos cianogénicos

Enzyme	Fold purification	Native molecular mass (kDa)	Subunit molecular mass (kDa)	pI	FAD	Carbohydrate	pH optimum	Substrates	Reference
<i>Prunus amygdalus</i>	–	60.4–62.1	–	4.42– 4.46	Yes	Yes	5.5–6.0	Mandelonitrile	Aschhoff & Pfeil (1970) ^a
<i>Prunus laurocerasus</i>	–	60	–	4.20– 4.37	Yes	Yes	–	Mandelonitrile	Gerstner & Kiel (1975)
<i>Prunus serotina</i>	10	55.6	57–59	4.58– 4.63	Yes	Yes	6.0–7.0	Mandelonitrile	Yemm & Poulton (1986)
<i>Prunus lyonii</i>	4.3	50	59	4.75	Yes	Yes	5.5	Mandelonitrile	Xu et al (1986)
<i>Sorghum vulgare</i>	253	180	–	4.5	No	–	5.0–6.0	<i>p</i> -Hydroxymandelonitrile, vanillin cyanohydrin	Seely et al (1966)
<i>Linum usitatissimum</i>	136	82	42	4.5– 4.8	No	No	5.5	Acetone cyanohydrin, 2-butanone cyanohydrin	Xu et al (1988)
<i>Manihot esculenta</i>	163	91.2	16.5	4.7	No	No	5.4	Acetone cyanohydrin, 2-butanone cyanohydrin, 2-pentanone cyanohydrin	Carvalho (1981)
<i>Hevea brasiliensis</i>	7	46	–	–	–	–	5.5	Acetone cyanohydrin, 2-butanone cyanohydrin, mandelonitrile	Selmar (1986)

Nota. Propiedades generales de las enzimas liasas purificadas de varias especies de plantas. Tomado de: E. E. Conn et al., Ciba Foundation Symposium 140 - Cyanide Compounds in Biology. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1988, [En Línea]. Disponible: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470513712>

2.3.3.ii Temperatura de operación. La temperatura puede considerarse un factor en cuanto a la difusión del HCN como en el tiempo necesario para que ocurra la degradación de la amigdalina y la prunasina. La técnica que muchos investigadores adaptan es mediante microdifusión de Conway modificada, Brimer, Abrahamsson, Mlingi y Rosling emplearon este método para determinar el contenido total de cianuro proveniente de la linamarina, glucósido cianogénico encontrado en la yuca [56], también, Arrázola lo usó en el análisis cuantitativo total de cianuro de amigdalina en la especie *Prunus dulcis (Miller)* [3]. El HCN al ser una sustancia de naturaleza volátil tiene la facilidad de pasar a su estado gaseoso en cianuro de hidrógeno a los 26 °C a 1 atm de presión, por lo que los ensayos tienden a realizarse en condiciones ambientales entre los 20°C hasta los rangos recomendados por los autores según sus investigaciones, quienes aconsejan realizar el proceso a esta temperatura como un valor límite permitiendo la volatilización del HCN. Gleadow *et al* realizaron un procedimiento de análisis y cuantificación del contenido de cianuro para cualquier GC, donde establecen una temperatura óptima de 37 °C [57]. La microdifusión desarrollada para las almendras, empleó tres valores para determinar el comportamiento del aumento o disminución de esta variable, en donde se estimó que a mayor temperatura (35°C) mayor cantidad de cianuro se aislaba en el receptáculo de la sustancia [3] .

2.3.3.iii Tiempo de operación. El tiempo requerido para la hidrólisis varía desde la naturaleza de la molécula base hasta las condiciones propuestas para su desarrollo. Gleadow *et al* recomiendan de manera generalizada un lapso de 15 horas para que la totalidad de HCN se desligue del GC establecido, determinando así una finalización de la reacción, Brimer, Abrahamsson, Mlingi y Rosling realizaron ensayos en lapsos de 1 a 22 horas en el caso de la linamarina, Tunçel, Nout y Brimer [58] efectuaron el procedimiento en lapsos de 4 a 22 horas para análisis de amigdalina y prunasina en semillas de albaricoque, obteniendo mayores resultados a 25°C durante 4 horas (Tabla 15). Sin embargo, los autores recomiendan realizar el proceso a 35°C durante 4 h asimilando más el proceso metabólico natural de la planta para generar una mayor eficiencia. Arrázola realizó el procedimiento en un intervalo de tiempo de 12 a 30 horas, recomendando un tiempo máximo de 24 h, donde alcanzó su rendimiento máximo de recuperación de cianuro [3].

Tabla 15.

Propiedades de β -glucosidasas purificadas hidrolizando glucósidos cianogénicos aromáticos

Temperatura ^{°C} /tiempo (h)	Amigdalina ($\mu\text{mol/g}$)		
	NGC	Cianuro total	GC
25/4	12.6	23.8	11.2
25/4	13.0	34.0	21.0
25/22	10.3	16.4	6.1
25/22	10.0	17.2	7.2
35/4	10.9	17.3	6.4
35/4	10.7	14.8	4.1
35/22	11.4	14.7	3.3
35/22	12.8	13.8	1.0

Nota. Evaluación comparativa del comportamiento temperatura/ tiempo de la reacción de Bioactivación de amigdalina y prunasina para el análisis de contenido total de cianuro y amigdalina en semillas de albaricoque. Tomado de: G. Tunçel, M. J. R. Nout, and L. Brimer, “The effects of grinding, soaking and cooking on the degradation of amygdalin of bitter apricot seeds,” *Food Chemistry*, vol. 53, no. 4, pp. 447–451, Jan. 1995, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/0308-8146(95)99841-M.

2.3.3.iv Variables por considerar en la microdifusión. La temperatura, el tiempo y el pH son variables que afectan directamente a la reacción, pero hay otros valores que pueden considerarse si se lleva a cabo la extracción de HCN mediante microdifusión. La concentración del reactivo captador, así como su volumen en el recipiente colector pueden afectar el contenido de cianuro recolectado. La metodología recomendada por Gleadow *et al* menciona el uso de una concentración de soluciones 1 M a 0.1 M aplicando en el vial colector desde 0.1 mL a 1 mL. Las dimensiones del reactor afectan al rendimiento de la difusión, Arrázola menciona que mientras menor sea el tamaño se promueve una mejor difusión [3]. Es bien sabido que las enzimas partícipes se encuentran naturalmente en la almendra, pero la adición externa de enzimas provenientes de microorganismos tales como bacterias y hongos (principales productores), promueve un factor preventivo en caso de que se dé una inactivación de la enzima; sin embargo, si se utiliza in situ un microorganismo productor de enzima, este debe tener afinidad con las condiciones de la reacción así como al sustrato (amigdalina- prunasina) [26].

3. METODOLOGÍA

En esta sección se muestra el procedimiento metodológico realizado para el desarrollo del segundo objetivo, siguiendo condiciones y recomendaciones de diversos autores en el acondicionamiento, preparación y análisis de los diferentes métodos experimentales recopilados en el segundo capítulo, para la determinación de una técnica de extracción apta para la obtención de HCN y benzaldehído, comparando mediante medidas cuantitativas la capacidad de obtención de estos productos y a su vez continuar con el propósito del tercer objetivo.

Es importante mencionar que el desarrollo experimental para este trabajo de grado tuvo limitaciones debido al aislamiento en tiempos de pandemia causada por “la enfermedad del coronavirus del 2019” (COVID-19), por lo tanto, se elaboraron algunos ajustes dependiendo de la disponibilidad en los laboratorios donde se ejerció la práctica experimental.

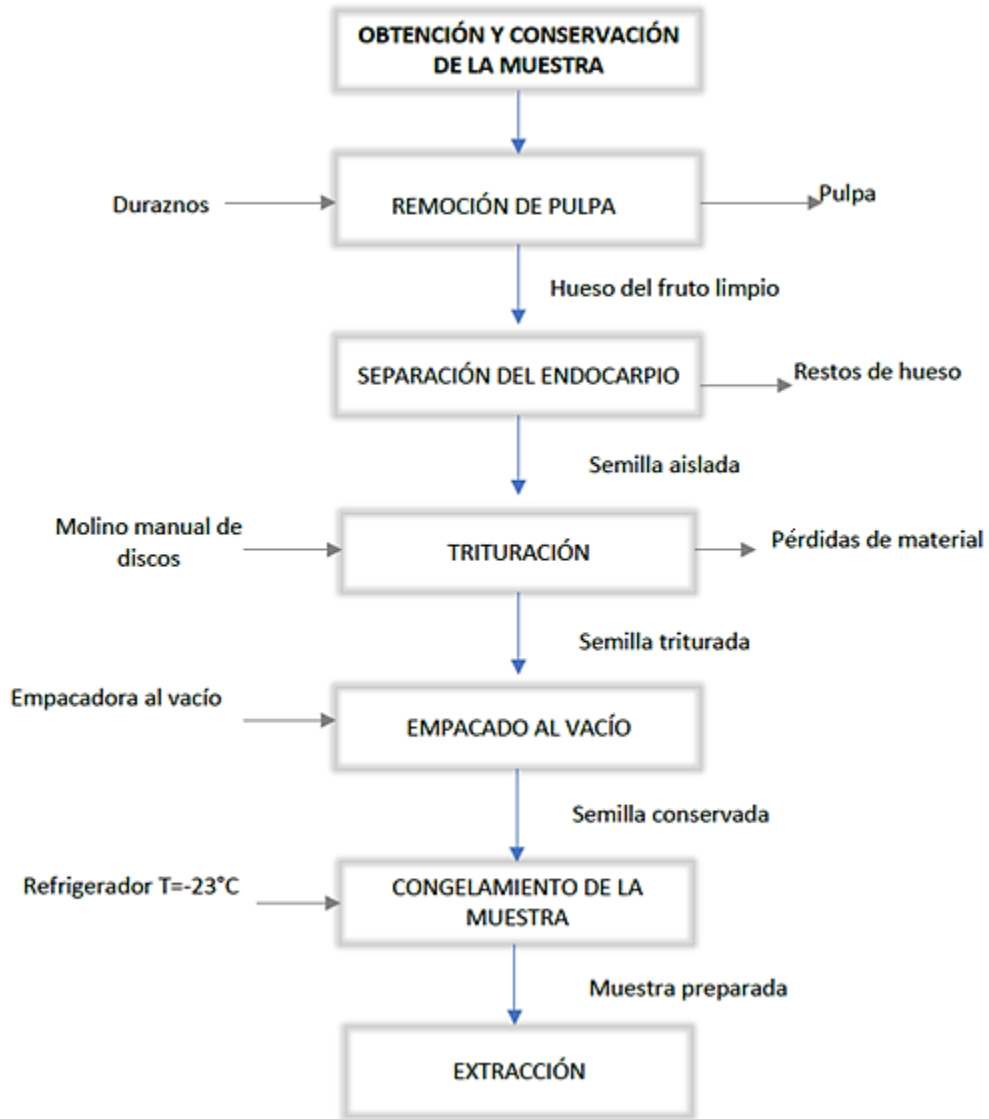
A continuación, se presentan las diferentes etapas del desarrollo metodológico desde la obtención de la muestra hasta la cuantificación de productos. El esquema general puede contemplarse en el ANEXO 28.

3.1 Obtención y conservación de la muestra

Se obtuvieron 26 kg de durazno variedad dorado con la colaboración de C.I Alliance S.A, empresa dedicada al comercio mayorista de alimentos. Se tomaron 13 especímenes aleatoriamente para verificar un peso en promedio de 145 g. Posteriormente, los endocarpios de los duraznos fueron separados del mesocarpio de los frutos y almacenados a 3°C hasta que se consideró pertinente la separación de la semilla (de manera cuidadosa con un martillo) del carozo días antes de la realización de las pruebas experimentales. Una vez listas las semillas se pesaron por unidad (175) pesando en promedio 0.27 g donde se consiguió un peso total de 48.35 g. El material fue llevado a un proceso de trituración a través de un molino manual del que se recuperaron 29.36 g de muestra. Una vez triturada, la muestra es llevada a un empaçado al vacío y congelada a -23°C, esto con el fin de mantener controlada la degradación de los GC y el enranciamiento de las grasas contenidas (Figura 22).

Figura 22.

Diagrama de bloques del proceso de obtención y conservación de la muestra



Nota. Metodología simplificada del tratamiento y adecuación de la materia prima para análisis experimentales posteriores.

3.2 Extracción por el método Soxhlet

Una vez preparada la muestra, se procede a realizar la extracción de los analitos mediante extracción Soxhlet, para ello se pesaron 2 g de muestra para 10 repeticiones empleando como solvente etanol al 100 % de concentración como alternativa al metanol. Se agregaron 50 mL de solvente para cada ensayo en un balón de 100 mL de capacidad situando dos extractores a la vez durante 2 horas a una temperatura de 80 °C. Es importante resaltar que en el transcurso de la realización de los primeros ensayos se presentaron problemas al ajustar las temperaturas, acciones tales que pueden llegar a afectar los resultados finales.

Al finalizar los ensayos se obtuvo un extracto aceitoso de coloración ámbar pálido con un olor ligero a almendras, cada extracto fue almacenado en frascos de vidrio herméticamente sellados hasta sus posteriores tratamientos para titulación y destilación donde la cantidad de extracto obtenida se dividió en partes iguales para realizar los respectivos análisis de obtención de benzaldehído y contenido total de cianuro.

3.2.1 Obtención de benzaldehído mediante destilación

El proceso de obtención del compuesto aromático se divide en dos etapas; en primer lugar, debe realizarse un pretratamiento para la remoción de agua, grasas y otro tipo de sustancias remanentes en la solución extraída anteriormente. Realizado el proceso se procede a situar las muestras en un proceso de destilado para extraer el producto deseado.

3.2.1.i Remoción de sustancias no deseadas. Generalmente, se puede llegar a presentar la oxidación de un pequeño porcentaje de benzaldehído en ácido benzoico; para remover esta sustancia, se aplicaron 20 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio a la mitad de la solución extraída por Soxhlet en un embudo decantador, este método de purificación puede realizarse también con bisulfito o metabisulfito de sodio lo que permite separar el ácido benzoico en solución gracias a una pequeña diferencia de densidades entre el benzaldehído y el eluyente residual [59]. Una vez adicionado se tapa el embudo decantador, se agita y se deja reposar hasta evidenciar una mezcla heterogénea. La capa inferior es removida con cuidado para mantener la solución sobrenadante que contiene el analito donde se deposita en un matraz al cual se le agregan 15g de sulfato de magnesio anhidro con el fin de remover el agua contenida en la solución decantada

anteriormente. Finalmente, dicha solución se filtra y está lista para la ejecución del proceso de destilación.

3.2.2 Destilación

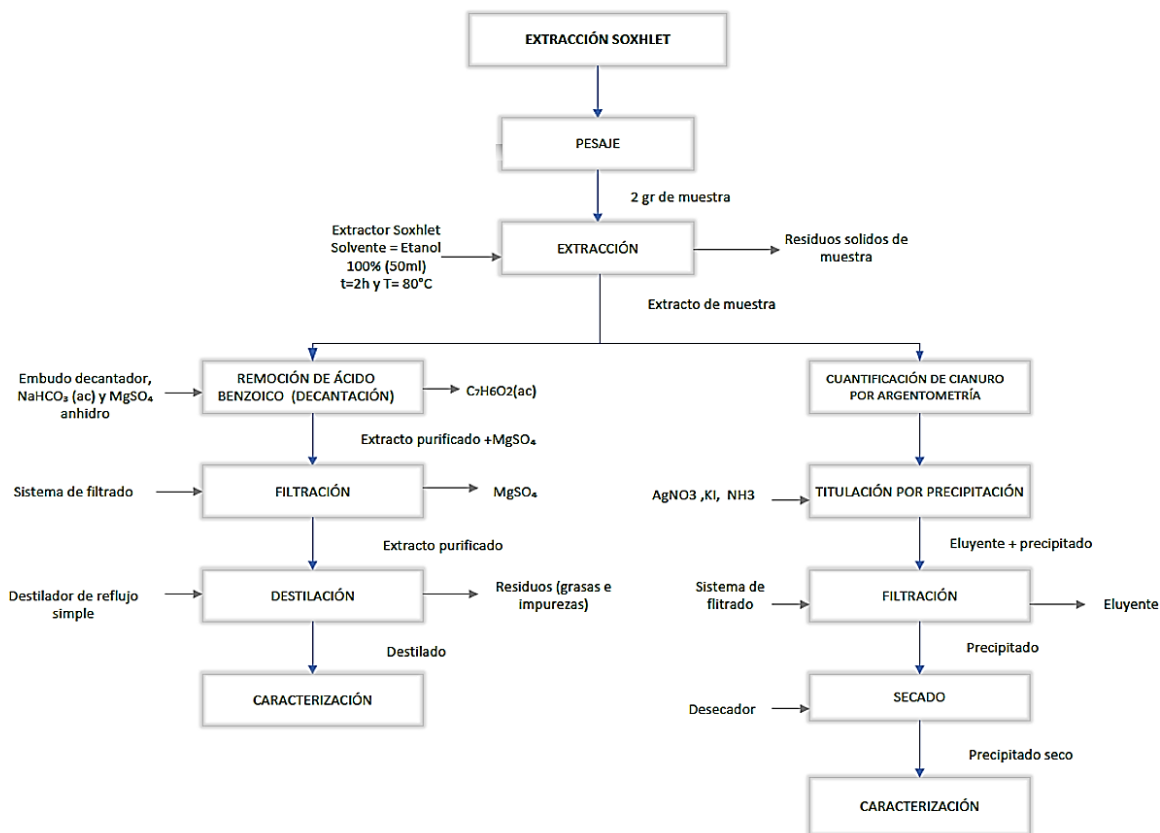
El proceso de destilación que originalmente se planteó implicaba el desarrollo de una destilación al vacío, buscando separar de una manera más completa el agua y las grasas restantes que puede contener la solución filtrada, de igual forma este tipo de destilación previene la oxidación del benzaldehído que se obtiene en el destilado. Sin embargo, pudo realizarse el proceso mediante destilación simple sin complicaciones. El proceso se llevó a cabo para 10 ensayos sucesivos a 85°C durante 1 hora. Con los volúmenes medidos previos a la destilación y en su finalización se procedió a calcular el porcentaje recuperado de destilado para los diez experimentos.

3.2.3 Cuantificación de cianuro mediante titulación argentométrica

El extracto restante obtenido en la extracción Soxhlet fue empleado para el análisis en contenido total de cianuro de las muestras de semilla, para ello, a partir de tres extractos se realizaron pruebas preliminares para determinar un método que se adaptara más a la muestra. Se eligieron dos métodos de titulación: El método de Mohr y el método de Liebig-Denigès donde este último fue seleccionado para caracterizar los ensayos restantes para los extractos mientras que el método de Mohr se usó para caracterizar las muestras por microdifusión. Estos métodos fueron escogidos por su facilidad de manejo y disponibilidad de recursos. A continuación, se puede observar de manera simplificada el proceso realizado (Figura 23).

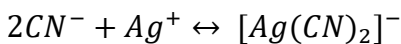
Figura 23.

Diagrama de bloques del proceso de extracción Soxhlet y caracterización de la muestra

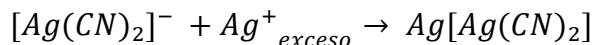


Nota. Metodología simplificada sobre el proceso de extracción y análisis de HCN y benzaldehído empleando extracción Soxhlet.

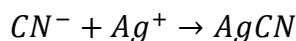
El método de Liebig-Denigès (LD) es una versión mejorada propuesta por George Denigès del método expuesto por Justus Liebig en 1851, [60] mismo investigador acerca del desdoblamiento de la amigdalina proveniente de almendras amargas. El método se basa en una titulación que emplea como agente valorante nitrato de plata en solución acuosa utilizando ioduro de potasio como indicador en medio amoniacal. En el método original, el cianuro contenido en la muestra reacciona con el nitrato de plata formando el ion dicianoargentato:



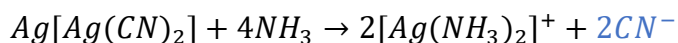
Una vez que las proporciones estequiométricas del ion plata se completan, al agregar dicho ion en exceso permite la formación de una sal muy insoluble denominada dicianoargentato(I) de plata o cianuro doble de plata.



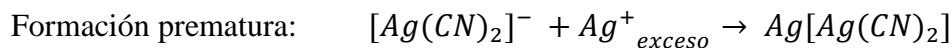
Al formarse el dicianoargentato de plata, se considera el punto final debido a su baja solubilidad, el compuesto precipita visualizando un enturbiamiento en la solución. Esta reacción generalmente es muy lenta y pueden presentarse la formación de cianuro de plata simultáneamente:



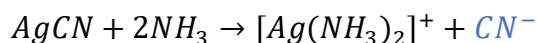
Si la formación del dicianoargentato de plata se produce de manera tardía, los iones participantes tenderán a la formación de cianuro de plata, sal cuya solubilidad en el medio es mucho mayor al producto deseado ($K_{ps}=1.6 \times 10^{-14}$), promoviendo el margen de error al agregar mayor cantidad de iones plata en la solución. EL proceso de titulación debe realizarse paulatinamente y no tomar un punto de decisión final prematuro [61]. El método modificado por Denigès permite una correcta formación del dicianoargentato de plata al realizar este proceso en un medio amoniacal evitando la precipitación de cianuro de plata y la formación prematura del dicianoargentato de plata, ocasionando errores intrínsecos en el análisis en cuanto a contenido de cianuro. El amoníaco reacciona con el dicianoargentato de plata formado prematuramente produciendo iones complejos de diamino argéntico y cianuro:



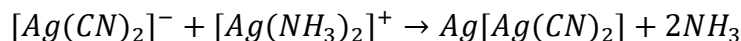
El amoníaco se comporta como un “tampón amoniacal”, lo que impide la síntesis del dicianoargentato de plata de manera temprana con el fin de que se desarrolle de manera correcta la síntesis del ion dicianoargentato [62]:



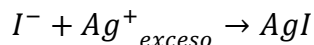
De igual forma, en caso de que se intente formar cianuro de plata, el medio amoniacal reaccionara con esta sal formando ion diamino argéntico dejando libre iones cianuro:



Una vez ocurridas todas estas reacciones, los iones cianuro se agotan en la reacción de formación de dicianoargentato que posteriormente reaccionará con los iones plata en exceso con los iones diamino argénticos formados dando lugar a la correcta síntesis del dicianoargentato (I) de plata:



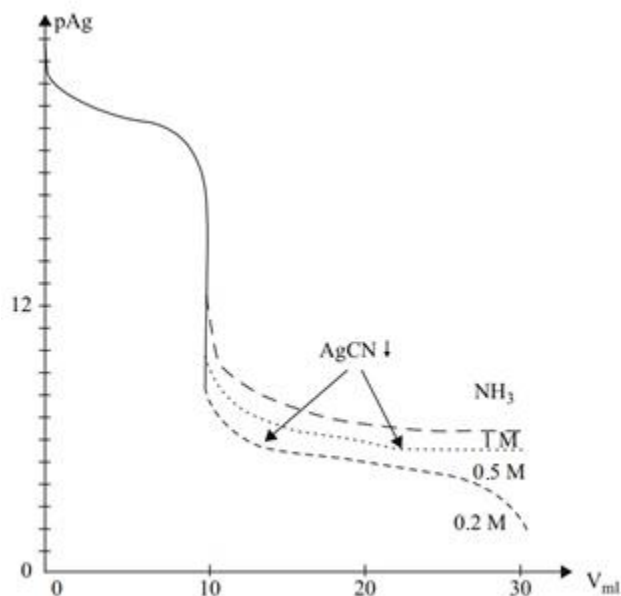
La adición de amoníaco en solución, transformando el medio acuoso original a un medio amoniacal permite actuar al ioduro de potasio como indicador en la valoración a través de la síntesis de yoduro de plata:



El ioduro de plata es una sal cuya coloración suele ser amarillenta, facilitando la visualización del proceso de adición de agente precipitante. La constante de producto de solubilidad del ioduro de plata ($K_{ps}=8.3 \times 10^{-17}$) es mucho menor a la constante del dicianoargentato de plata ($K_{ps}=2.3 \times 10^{-12}$), por lo que precipitará primero el ioduro de plata al adicionar una pequeña proporción en exceso del agente titulante o más específicamente, iones Ag^{+} . Este proceso químico permitirá observar el punto final de la valoración de manera más precisa que en el caso del método original; sin embargo, la concentración de amoníaco agregado, así como la concentración del ion ioduro (I^{-}) son factores muy sensibles que si no se toman con precaución pueden tener consecuencias en cuanto la precipitación de las sales y por consiguiente producir un punto final coincidente con el punto estequiométrico [61]. En la Figura 24 se presenta la curva de titulación del $AgNO_3$.

Figura 24.

Curva de titulación del $AgNO_3$ para el método de Liebig Denigès



Nota. Curva de titulación siguiendo el método de Denigès iones de CN^{-} 0.2 M ($V_0 = 10$ mL) con una solución de 0.1 M de nitrato de plata en presencia de varias concentraciones de NH_3 [63]. Tomado de: J. L. Burgot, *Ionic equilibria in analytical chemistry*, 1ª Ed. Springer-Verlag New York, 2012, [En línea]. Disponible: doi: 10.1007/978-1-4419-8382-4

Ya establecido el método de titulación por precipitación, se procedió a realizar 7 repeticiones para 25 mL de muestra, utilizando una solución de AgNO_3 0.1M como agente precipitante, 0.2 g de KI como indicador, 15 mL de NH_3 2M y agua destilada como diluyente para completar 100 mL, siguiendo la metodología de Williams para la determinación de aniones [40].

Los precipitados resultantes fueron filtrados con ayuda de papel filtro y luego llevados a un desecador para remover la humedad residual. Una vez secos se procedió a pesar el contenido (teniendo en cuenta el peso del papel filtro utilizado para cada repetición) para la correcta caracterización del peso obtenido. En el anexo 27 se pueden encontrar las fórmulas empleadas para la cuantificación de cianuro por determinación gravimétrica.

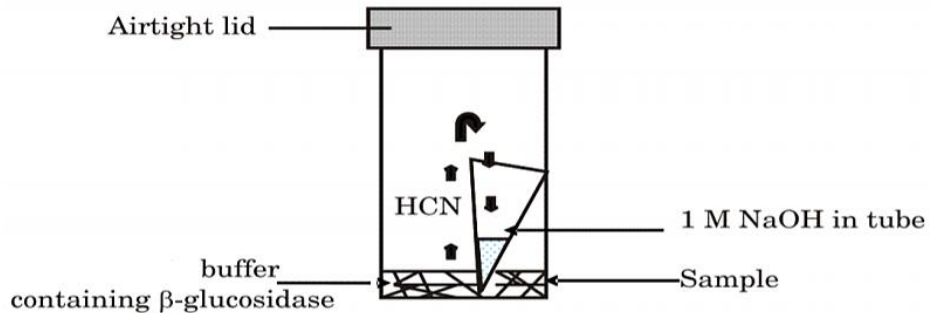
3.3 Microdifusión modificada de Conway

Como segunda técnica de extracción se aplicó una microdifusión modificada de Conway adaptando la naturaleza de la reacción que mantiene el proceso cianogenético de las semillas, lo que evita la formación de productos no deseados. El propósito de esta técnica es la captación de ácido cianhídrico en forma de cianuro de sodio o de potasio a través de la difusión del cianuro de hidrógeno liberado por volatilización desde la muestra insertada en un frasco herméticamente sellado junto con una solución buffer que mantenga el pH ligeramente ácido, hasta un recipiente interno con un agente captador o fijador (KOH o NaOH). La solución resultante puede ser analizada mediante técnicas cromatográficas, espectrofotométricas o por técnicas titrimétricas. “El principal beneficio de la microdifusión es que requiere poca cantidad de muestra y no necesita purificación previa de la muestra ni otros tratamientos especiales” [64].

Se siguió el procedimiento propuesto por Arrázola [3] para la preparación de doce muestras en total. El armado de las cámaras de microdifusión se preparó utilizando frascos de 4.5 cm de diámetro y 6 cm de altura, donde se situaron 0.2 g de almendra triturada junto con 4 mL de solución buffer fosfato ajustada previamente a un pH de 5.5. El vial interno, de 1 cm de diámetro y 3 cm de altura fue introducido con 1 mL de NaOH 0.2M como reactivo captador. El diseño del montaje puede detallarse en la Figura 25.

Figura 25.

Ilustración del montaje para la recolección de CN mediante microdifusión

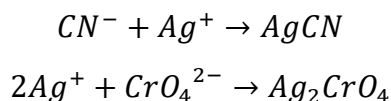


Nota. Artefacto captador de CN, el analito se recoge en forma de cianuro de sodio en solución, donde podrá analizarse posteriormente su concentración. Se puede aplicar soluciones reguladoras de fosfato o citrato según sea el GC del cual se analice el contenido. También puede agregarse enzima adicional junto al buffer si la enzima propia de la muestra se considera inactiva o por cuestiones de otro tipo de análisis en su comportamiento. R. M. Gleadow, N. Bjarnholt, K. Jorgensen, J. Fox, and R. Miller, "Cyanogenic glycosides." Stadium Press LLC, pp.283–310, 2011, [En línea]. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/223138629_CYANOGENIC_GLYCOSIDES

Seis de estos ensayos fueron diferenciados al agregar *Aspergillus niger* como microorganismo productor de enzima β-D-glucosidasa con el fin de evaluar el comportamiento de la cantidad a obtener en la cuantificación de contenido en cianuro total. De estos seis ensayos, a la mitad se le atribuyó un tiempo de operación de 12 horas y al resto 24 horas. Esta misma estimación de tiempo fue asignada para las muestras que no disponían de enzima externa. En el planteamiento original, las muestras se mantendrían a temperatura constante en un baño termostatzado; pero por las limitaciones de tiempo en los laboratorios, se procedió a realizar un calentamiento mediante una plancha eléctrica en un recipiente sellado con termostato manteniendo la difusión a una temperatura entre los 35 a los 38.5°C. Una vez cumplido el tiempo, los viales colectores fueron sellados herméticamente y almacenados a una temperatura de 3°C hasta su respectiva caracterización. Adicionalmente se realizaron dos blancos para cálculos posteriores, su elaboración consta de la adición en el frasco contenedor, 0.7 mL de ácido fosfórico para ajustar el pH a 5.5 con 5 mL de solución de cianuro (1ppm) mientras que al vial colector se agregó 1 mL de NaOH 0.2 M.

3.3.1 Cuantificación de cianuro mediante titulación argentométrica (Método de Mohr)

La caracterización del contenido de cianuro de las muestras tratadas por microdifusión se realizó mediante titulaciones de precipitación de manera similar al método de extracción Soxhlet, pero empleando titulaciones de precipitación por Mohr [59]. El método utiliza cromato de potasio como indicador en el proceso permitiendo ver una coloración rojiza como punto de valoración final, es usado principalmente para el análisis de contenido en halógenos (a excepción del yodo) debido a la selectividad que tienen los iones plata (agente precipitante) con los aniones Cl^- y Br^- principalmente. Los iones CN^- interactúan con los iones Ag^+ formando cianuro de plata ($K_{ps}=1.6 \times 10^{-14}$) mientras que el K_2CrO_4 añadido como indicador, es disociado en medio acuoso donde los iones cromato (CrO_4^{2-}) reaccionan con los iones Ag^+ para conformar precipitado de cromato de plata:



La constante de producto de solubilidad del cromato de plata ($K_{ps}=1.3 \times 10^{-12}$) es mayor a la del analito, por lo que el AgCN precipita eventualmente. El punto final es alcanzado en la formación de Ag_2CrO_4 denotando una coloración rojo-anaranjado por exceso de iones plata añadidos en la valoración, dando a entender que la concentración de iones cianuro es nula al completar las proporciones estequiométricas en la formación de cianuro de plata. El método de Mohr es aplicable solo a disoluciones donde su pH comprende valores entre 6.5 y 10.5 [61], [63] que pueden ajustarse para medios alcalinos con ácido acético o en caso de medios ácidos suele aplicarse carbonato de calcio o sodio [59].

Las muestras recogidas de los viales colectores de cada montaje de microdifusión se llevaron a analizar junto con los dos blancos preparados, donde se recogieron los precipitados y se analizaron por gravimetría para calcular la cantidad de cianuro total contenida en 100 g de muestra. Posteriormente, se realizó una verificación en contenido de cianuro del eluyente sobrante para tres ensayos mediante colorimetría con el fin de determinar si el cianuro total fue recogido mediante la precipitación de cianuro de plata o si se presentaron cantidades pertinentes en la solución sobrante; las muestras tratadas por colorimetría fueron analizadas empleando un fotómetro Nova 60 el cual permitió revisar la concentración del analito respectivo.

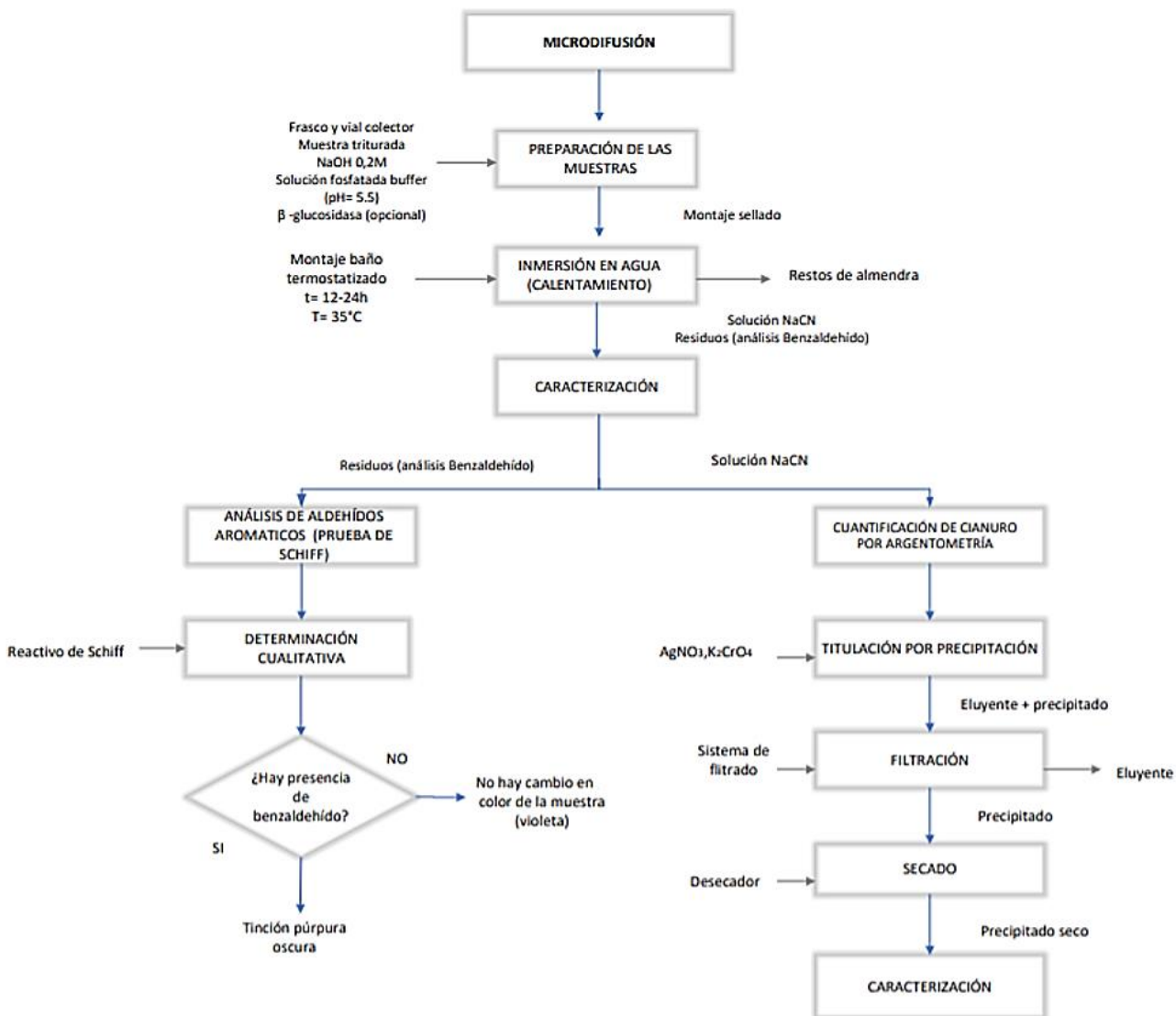
El procedimiento realizado puede observarse de manera abreviada en la Figura 26, mientras que el análisis por colorimetría es explicado detalladamente en el Anexo 28.

3.3.2 Caracterización cualitativa para presencia de benzaldehído mediante prueba de Schiff

Una vez realizada la microdifusión, se recogieron las soluciones sobrantes de los montajes para determinar presencia de aldehídos aromáticos a través 2 gotas de reactivo de Schiff, lo cual permitió verificar la presencia de benzaldehído en las muestras cuando estas se tornan con una coloración púrpura oscura.

Figura 26.

Diagrama de bloques del proceso de microdifusión y caracterización de la muestra



Nota. Metodología simplificada sobre el proceso de extracción y análisis de HCN y benzaldehído empleando microdifusión modificada de Conway.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados basados en la metodología planteada y descrita en el tomo anterior se clasifican desde la técnica que implica su aislamiento, derivándose en las distintas técnicas analíticas tanto cualitativas como cuantitativas desarrolladas y recomendadas para la obtención de HCN y benzaldehído desde la hidrólisis enzimática de la amigdalina y prunasina. Las ilustraciones, fórmulas y procedimientos adicionales se encuentran en el apartado de anexos.

4.1 Extracción Soxhlet

4.1.1 Cuantificación de cianuro por gravimetría

A partir de los siete ensayos realizados mediante determinación gravimétrica, se obtuvieron en promedio 209.25 mg de cianuro/100 g de muestra seca mediante la extracción previa del analito por el método Soxhlet. Los datos se pueden observar en la Tabla 16.

Tabla 16.

Reproductibilidad del ensayo por valoración gravimétrica para análisis en contenido de cianuro en semillas de durazno

Muestra	CN mg/100g muestra seca
1	50.68
2	348.91
3	182.22
4	297.21
5	219.02
6	206.34
7	160.33
Media	209.25
Desviación estándar	96.28

Nota. Resultados del ensayo para 7 repeticiones empleando valoración gravimétrica por Liebig-Denigès expresando la concentración en miligramos de cianuro por cada 100 g de muestra

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede observar que existe una variación considerable entre cada repetición, esto puede deberse a diversos factores. El pretratamiento dado a la muestra fue correcto, pero, el tiempo de disposición prolongado entre el desarrollo de los ensayos pudo afectar a los resultados en sí; también, muchos autores que han experimentado el cuantificar, ya sea un glucósido cianogénico o una sustancia derivada al mismo -en la mayoría de los casos el contenido en cianuro- han descrito que una causa de error importante es en la obtención de la muestra de tipo vegetal, Briese y Couch, en su trabajo para la preservación de plantas cianogénicas para análisis químicos [65], es la dificultad de obtener una mezcla homogénea para varios ejemplares, que seguidamente serán comparados sin reconocer la pérdida considerable de ácido cianhídrico. Autores como Chaouali *et al* [66] y Tanaka *et al* [67], desarrollaron investigaciones para almendras amargas provenientes del albaricoque, durazno, níspero japonés y otros frutos de hueso, donde obtuvieron un alto porcentaje de error.

El contenido en cianuro detectado mediante determinación gravimétrica a través de una extracción Soxhlet previa, mantiene un valor aproximado al de la bibliografía consultada. Las semillas se encuentran clasificadas como almendras amargas, por lo que pueden asemejarse al valor determinado por Arrázola para este tipo de almendras mediante la misma técnica de cuantificación (217.8 mg de CN/100 g de muestra seca) [3]. En investigaciones más específicas sobre el análisis del contenido de amigdalina y directamente del cianuro total para partes del fruto, se constata entre el rango ponderado de (142-341.29) mg CN/100 g de muestra seca. Este dato se puede encontrar expresado en ppm de amigdalina (25000-60000) para la especie *Prunus persica (L.) Batsch* en el manual de constituyentes fitoquímicos de hierbas (GRAS) y otras plantas económicas de James Duke [68]. También, Funes determinó el contenido de ácido cianhídrico de las semillas de diferentes frutos de especie *Prunus*, incluyendo diversas variedades de durazno [51], quien obtuvo un rango entre (180-260) mg de CN/100 g de muestra seca empleando determinación gravimétrica.

4.1.2 Destilación por reflujo simple

En cuanto a la determinación de benzaldehído en las muestras extraídas por Soxhlet mediante destilación simple, se obtuvo un porcentaje de recuperación en el destilado por debajo de lo esperado. En la Tabla 17 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 17.

Reproductibilidad del ensayo por destilación simple para determinación de benzaldehído en semillas de durazno

Muestra	Extracto (Soxhlet) mL	Destilado mL	Recuperación (%)
1	25	8.20	32.8%
2	25	8.20	32.8%
3	25	7.20	28.8%
4	20	4.85	24.3%
5	20	2.80	14.0%
6	20	7.40	37.0%
7	19	8.70	45.8%
8	23	4.90	21.8%
9	23	4.75	21.1%
10	20	6.00	30.0%
Media			28.8%
Desviación estándar			0.09

Nota. Resultados del ensayo para 10 repeticiones empleando Destilación simple expresando el valor recuperado en el destilado en porcentaje

En la experimentación se llegó a obtener en promedio un 28.8 % de recuperación de destilado. Esta solución obtenida está conformada por agua y benzaldehído, en el transcurso de la operación de separación, se observó que la primera sustancia en condensarse fue agua, donde posteriormente en el transcurso de 30 minutos aproximadamente se presentó una solución homogénea incolora con un ligero aroma dulce, confirmando la presencia de benzaldehído en el destilado. Los resultados generados en investigaciones sobre el aislamiento de este compuesto desde la amigdalina a partir de diferentes especies han obtenido un porcentaje alto; Remaud *et al* [69], realizaron estudios sobre el benzaldehído contenido en aceite de almendras amargas extraído de semillas de albaricoque. En su metodología, logran extraer de estas semillas benzaldehído con el

97 % de pureza, que posteriormente recurrieron a un análisis isotópico por resonancia magnética nuclear, técnica de gran precisión para este tipo de sustancia. Terada y Yamamoto [70], lograron obtener de varios extractos de albaricoque japonés porcentajes de recuperación del 80.8 % al 99.1%.

Según los resultados alcanzados, es de considerarse como causa del bajo valor resultante en la recuperación de benzaldehído, la presencia de oxígeno en el equipo. Es factible el hecho que durante el tiempo ejercido en el montaje, la mayoría del aldehído experimentara un proceso de oxidación transformándose en ácido benzoico situado junto con las grasas remanentes de la muestra, por ello, es de vital importancia el uso de una destilación al vacío para evitar este tipo de inconvenientes, aunque no fue posible el uso de este tipo de montaje por limitaciones imprevistas [69], [71].

4.2 Microdifusión

4.2.1 Cuantificación de cianuro por gravimetría

La caracterización de ácido cianhídrico en términos de cianuro total por determinación gravimétrica para los seis ensayos adaptados por microdifusión sin adición enzimática externa presenta los siguientes resultados (ver Tabla 18). Los datos obtenidos, fueron agrupados de tal forma que se evidencia el contenido recolectado sin tener en cuenta la clasificación por tiempo, estimando el valor general resultante de 30.99 miligramos de cianuro/ 100 g de muestra seca.

El análisis colorimétrico adicional, fue realizado tomando el sobrenadante de 3 ensayos diferentes de las muestras ya caracterizadas por gravimetría. De las muestras tomadas, se observaron valores muy pequeños para la concentración remanente de cianuro en este tipo de muestras cuyos datos resultantes para las muestras asignadas fueron de 0.1, 1.1, y 1.5 partes por millón (ppm) visualizados en el fotómetro. Las lecturas observadas evidencian que gran cantidad de cianuro fue retenido por la precipitación ejecutada previamente, por lo tanto, se deduce un correcto funcionamiento de la separación del analito.

Tabla 18

Reproductibilidad del ensayo por valoración gravimétrica para análisis en contenido de cianuro en semillas de durazno

Muestra	CN mg/100g muestra
1	12.62
2	83.43
3	25.10
4	22.70
5	22.25
6	19.84
Media	30.99
Desviación estándar	26.05

Nota. Resultados del ensayo para 6 repeticiones empleando valoración gravimétrica por el método de Mohr expresando la concentración en miligramos de cianuro por cada 100 g de muestra

Los datos generados para la caracterización de cianuro provenientes por microdifusión, si son comparados con los obtenidos por el método de extracción Soxhlet puede observarse una gran diferencia en la concentración caracterizada, siendo aproximadamente siete veces más pequeña. Teniendo en cuenta los parámetros de manipulación de la materia prima, al igual que las observaciones de la concentración promedio evaluada en la técnica precedente, puede reflejarse una variación considerable en los valores de la concentración para las repeticiones asignadas (no tan elevada como la evidenciada en la Tabla 16).

Además de las posibles pérdidas de la manipulación de la muestra, se estima que el volumen y concentración de hidróxido de sodio añadido en los ensayos pudo ser causante de la poca concentración de cianuro captada; sin embargo, para la profundización de los resultados se precisa amplificar la experimentación para llegar a una conclusión más contundente, ya que otros parámetros como el dimensionamiento del montaje, y el tamaño de partícula recomendado fueron realizados según la bibliografía investigada.

4.2.1.i Comparación de cianuro obtenido al adicionar enzima externa en la inoculación de *A. niger*. Los resultados afines a la comparación de la adición de *Aspergillus niger* como productor de enzima “auxiliar” en el proceso degradativo no fueron muy prometedores demostrando una disminución de aproximadamente la mitad del proceso sin adición. Los resultados fueron agrupados sin tener en cuenta el tiempo de operación en la microdifusión (ver Tabla 19).

Tabla 19.

Reproductibilidad del ensayo por valoración gravimétrica para análisis en contenido de cianuro en semillas de durazno para muestras con y sin adición de enzima externa por inoculación de A. niger

Muestra	Sin β-glucosidasa	Con β-glucosidasa
1	12.62	39.99
2	83.43	15.06
3	25.10	27.15
4	22.70	7.88
5	22.25	1.17
6	19.84	0.66
Media	30.99	15.32
Desviación estándar	26.05	15.61

Nota. Resultados del ensayo para 6 repeticiones empleando valoración gravimétrica por el método de Mohr expresando la concentración en miligramos de cianuro por cada 100 g de muestra para ensayos con y sin añadidura de β -glucosidasa.

Acorde a lo observado al retirar los viales contenedores en las muestras que fueron asignadas para la inoculación del microorganismo, se evidenció la ausencia del hongo filamentoso concluyendo un ambiente no apto para la proliferación de este. De este inconveniente, se deduce que el microorganismo, a pesar de compartir una temperatura óptima de crecimiento (35° - 37° C) [72], con la temperatura óptima de la reacción, y aportar como fuente de nutrientes glucosa (como fuente de carbono) desplegada de la amigdalina y prunasina en proceso de degradación, presentó una inhibición en su crecimiento por la interacción con el cianuro de hidrógeno liberado al poseer una respiración celular aerobia. El cianuro inhibe la enzima citocromo c- oxidasa, enzima cuya función principal es la producción de Adenosín trifosfato (ATP) en las mitocondrias, interfiriendo con la respiración celular de los organismos hasta causar la muerte [73]. Se infiere que una posible

pérdida de concentración se da por la transformación de cianuro en tiocianato por acción del metabolismo del hongo al intentar detoxificar la toxina por la enzima mitocondrial rodanasa [74]. Adicional a este inconveniente, es posible que la concentración de glucosa generada afectara al metabolismo del hongo teniendo consecuencias en su crecimiento [75].

De las observaciones anteriores se concluye que la adición de *Aspergillus niger* como productor de enzima adicional en la reacción de hidrólisis enzimática no es viable a menos que la enzima sea extraída previa a su adición en la cámara de microdifusión.

4.2.1.ii Comparación de cianuro obtenido al adicionar enzima externa por inoculación de *A. niger* durante 12 y 24 h. En la Tabla 20 pueden visualizarse los datos agrupados por los tiempos estimados para la hidrólisis para ensayos con y sin adición del inóculo.

Tabla 20.

Reproductibilidad del ensayo por valoración gravimétrica para análisis en contenido de cianuro en semillas de durazno para muestras con y sin adición de enzima externa por inoculación de A. niger para 12 y 24 horas

Muestra	Tiempo			
	12 horas	12 horas (E+)	24 horas	24 horas (E+)
1	12.62	39.99	22.70	7.88
2	83.43	15.06	22.25	1.17
3	25.10	27.15	19.84	0.66
Media	40.39	27.40	21.60	3.24
Desviación estándar	37.80	12.46	1.54	4.03

Nota. Resultados del ensayo para 3 repeticiones empleando valoración gravimétrica por el método de Mohr expresando la concentración en miligramos de cianuro por cada 100 g de muestra para ensayos con y sin añadidura de β -glucosidasa.

Teniendo en cuenta el tiempo establecido para la difusión del ácido cianhídrico, respectivamente de 12 y 24 horas, se obtuvo una mayor concentración a 12 horas para ambos tipos de ensayos; los ensayos realizados por el metabolismo propio de la semilla (proceso autoenzimático), y los ensayos a los que se les inoculó *Aspergillus niger* como fuente productora de enzima externa (representados con una E+), se presenta una disminución de concentración al comparar los resultados ponderados que tienen enzima adicional contra los datos resultantes que se realizaron vía autoenzimática; dando a entender que la adición por este método no es viable como se explica en la Tabla 19. Se observa que, a 12 horas, la concentración para ambos casos [12 horas y 12 horas (E+)] su concentración es mayor a la obtenida por 24 horas. Este comportamiento puede ser explicado en parte por las pérdidas consecuentes de la manipulación del material por el tiempo prolongado desde la preparación de la materia prima hasta su aplicación en la extracción y caracterización. No obstante, se puede presentar el caso de la influencia de la temperatura y la microbiota originada en la cámara de microdifusión al alcanzar un punto límite en la hidrólisis de la amigdalina y prunasina complementándose con la interferencia provocada por el metabolismo del microorganismo utilizado para ambas categorías de tiempo. Se observa un comportamiento similar en la investigación realizada por Tunçel *et al* [58] quien deduce el decremento particular de la concentración de cianuro al superar un determinado tiempo de operación por la presencia microbiana interferente en el medio.

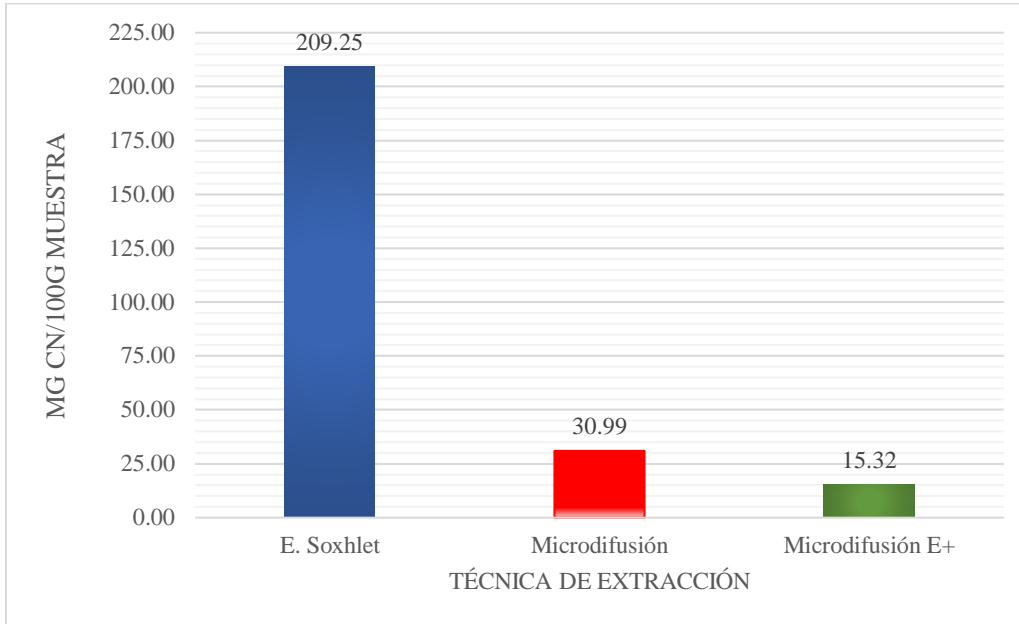
Considerando este imprevisto, no acudido principalmente por disponibilidad de tiempo, el crecimiento de estos grupos de microorganismos no deseados en los ensayos, pueden ser analizados mediante ensayos microbiológicos tales como una coloración de Gram o microfiltración debido a que la mayoría de microorganismos capaces de degradar cianuros son bacterias pertenecientes al género *pseudomonas* [74],[76].

4.2.2 Caracterización cualitativa para presencia de benzaldehído

Al aplicar la prueba de Schiff para los 12 ensayos correspondientes a la microdifusión, no se encontró un cambio de coloración de rosa pálido a un púrpura oscuro, por lo que se considera una ausencia de benzaldehído para estas muestras (ver Anexos 22 y 23) caso contrario a la realización de esta misma prueba para las muestras generadas en el proceso de destilación (ver Anexo 24) por lo que se deduce una total oxidación del benzaldehído a ácido benzoico.

Figura 27.

Comparación de los valores promedio de la concentración de ácido cianhídrico expresado en mg de cianuro por 100 gramos de muestra para las técnicas empleadas.



Nota. Gráfico de barras sobre las medias obtenidas en los diferentes ensayos caracterizados para cuantificación de cianuro total de las muestras extraídas por extracción Soxhlet, Microdifusión con y sin adición de enzimas externas producidas por la inoculación de *Aspergillus niger* representado como Microdifusión E+.

En la Figura 27 se tiene en cuenta la concentración de HCN en mg de cianuro por cada 100 gramos de muestra seca resultante para los ensayos realizados en este trabajo, en la cual, la extracción Soxhlet presenta mejores resultados a comparación de las otras dos implicaciones para la técnica de microdifusión tanto como por la vía autoenzimática de las semilla, como para microdifusión modificada al adicionar el hongo filamentoso.

5. CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones necesarias para el desarrollo adecuado de la hidrólisis enzimática de la amigdalina y prunasina, así como la conservación y preparación de la muestra junto con las técnicas más empleadas para la extracción de glucósidos cianogénicos y caracterización de ácido cianhídrico y benzaldehído proveniente de la amigdalina y prunasina, a partir de una recopilación bibliográfica que abarca como foco central los glucósidos cianogénicos proveniente de plantas del género *Prunus*.

El valor obtenido para la determinación gravimétrica de cianuro previa a la aplicación de extracción Soxhlet en las semillas de durazno es similar a lo reportado por investigaciones consultadas que trabajaron con variedades de almendras amargas y ejemplares de semillas de durazno, en un rango de 142 a 341 mg de CN/100 g de muestra.

La concentración determinada mediante gravimetría a través de la separación de HCN por microdifusión fue 7 veces menor a la concentración definida por determinación gravimétrica empleando extracción Soxhlet.

La adición de *Aspergillus niger* como productor de enzima adicional en la microdifusión interfirió con la reacción de hidrólisis enzimática de la amigdalina y prunasina disminuyendo la concentración a comparación de las muestras que tuvieron un proceso sin la adición de este microorganismo.

Los tiempos empleados en la microdifusión para las 12 muestras en total, presentaron mayor concentración a 12 horas que a 24 horas en un rango de 35-38.5°C a un pH de 5.5.

La técnica propuesta para la obtención de benzaldehído por extracción Soxhlet previa no alcanzó los rangos estimados de recuperación, donde se esperaba obtener entre un 80.8 a un 99.1 % según investigaciones consultadas para el aislamiento de este compuesto.

En la microdifusión no se evidenció la presencia de benzaldehído a través de la prueba de Schiff para presencia de aldehídos aromáticos, por tal motivo no se procedió a realizar métodos de cuantificación posteriores.

De las dos técnicas de extracción realizadas en este proyecto, se evidenciaron mejores resultados para los dos productos de interés teniendo en cuenta la concentración obtenida a través de extracción Soxhlet a comparación de la técnica de microdifusión.

La elaboración de este proyecto permitió un acercamiento al aprovechamiento de la semilla de durazno como fuente importante de ácido cianhídrico y benzaldehído, brindándole un valor agregado y simultáneamente disminuyendo la generación de residuos que puedan repercutir al ambiente; promoviendo la continuación de investigaciones posteriores para el aislamiento y separación de estas sustancias y brindar un beneficio tanto a nivel científico como industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Departamento Nacional de Planeación (Documento CONPES 3874), “Política Nacional Para La Gestión Integral De Residuos Sólidos,” Bogotá D.C, Colombia: DNP, Nov. 2016, [En Línea]. Disponible: https://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/e-book_rae_/contenido_2_3.html [Acceso: Ago. 29, 2020].
- [2] J. Poulton, “Cyanogenesis in plants,” *Biological Reviews*, vol. 5, no. 2, pp. 126–141, 1990, [En Línea]. Disponible doi: 10.1111/j.1469-185X.1930.tb00896.x.
- [3] G. Arrázola, “Análisis de glucósidos cianogénicos en variedades de almendro : implicaciones en la mejora genética Tesis Doctoral,” 2002, [En Línea]. Disponible: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3219/1/Arrazola-Paternina-Guillermo.pdf>
- [4] D. Miranda, G. Fischer, and C. Carranza, *Los frutales caducifolios Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo en Colombia*, vol. Primera edición. 2013.
- [5] J. A. Timana and D. Urbano, “Caracterización de labores culturales y estado fitosanitario del cultivo de durazno prunus pérsica en el municipio de Palestina Huila,” 2013.
- [6] Desmond R. Layne and Daniele Bassi, *The Peach Botany, Production and Uses*, vol. 1 Ed. 2008, [En Línea]. Disponible: https://catalog.library.vanderbilt.edu/discovery/fulldisplay/alma991043334615903276/01VAN_INST:vanui [Acceso: feb.02,2021].
- [7] “Melocotón - Propiedades del Melocotón.”, [En Línea].Disponible: <https://alimentos.org.es/melocoton> [Acceso Feb. 05, 2021].
- [8] L. Pagliaricci, *Producción del duraznero en la Región Pampeana, Argentina*, Primera edición. 2012.
- [9] F. R. Mena Alanoca, “Extracción y caracterización del aceite crudo de la semilla de durazno (Prunus pérsica),” La Paz, Bolivia, 2015.
- [10] “FAOSTAT.” [En Línea]. Disponible: <http://www.fao.org/faostat/es/?#compare> [Acceso Feb. 07, 2021].
- [11] “Encuesta nacional agropecuaria (ENA).” [En Línea]. Disponible: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/encuesta-nacional-agropecuaria-ena#anexos> [Acceso Feb. 07, 2021].

- [12] W. Bromer *et al.*, *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 28. Vienna: Springer Vienna, 1970, [En Línea]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-211-74019-4>
- [13] A. Vingut, “El ácido cianhídrico a través de la historia,” Publicacions del Seminari Pere Mata de la Universitat de Barcelona, 1999, [En Línea]. Disponible: <http://ramc.cat/wp-content/uploads/2017/02/Publicacions83.pdf>
- [14] E. E. Conn *et al.*, *Ciba Foundation Symposium 140 - Cyanide Compounds in Biology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1988, [En Línea]. Disponible: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470513712>
- [15] E. E. Conn, “Cyanogenic compounds,” 1980. [En Línea]. Disponible: www.annualreviews.org.
- [16] N. Bjarnholt and B. L. Møller, “Hydroxynitrile glucosides,” *Phytochemistry*, vol. 69, no. 10. Pergamon, pp. 1947–1961, Jul. 01, 2008, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/j.phytochem.2008.04.018.
- [17] D. Selmar, “Biosynthesis of Cyanogenic Glycosides, Glucosinolates and Non-Protein Amino Acids,” in *Annual Plant Reviews*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018, pp. 92–181, [En Línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0425>.
- [18] J. Vetter, “Plant Cyanogenic Glycosides,” Springer, Dordrecht, 2017, pp. 287–317, [En Línea]. Disponible: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-94-007-6464-4_19.
- [19] M. Zagrobelny, S. Bak, and B. L. Møller, “Cyanogenesis in plants and arthropods,” *Phytochemistry*, vol. 69, no. 7. Pergamon, pp. 1457–1468, May 01, 2008, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.019.
- [20] D. Ganjewala, S. Kumar, A. Devi, and K. Ambika, “Advances in cyanogenic glycosides biosynthesis and analyses in plants: A review,” *Szegediensis, Acta Biologica*, vol. 54, no. 1, pp. 1–14, 2010, [En Línea]. Disponible: <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>.
- [21] P.M. Dey and J.B. Harborne, *Plant Biochemistry*. Elsevier, 1997.
- [22] A. V. Morant *et al.*, “ β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense,” *Phytochemistry*, vol. 69, no. 9. Phytochemistry, pp. 1795–1813, Jun. 2008, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/j.phytochem.2008.03.006.

- [23] “(R)-Amygdalin | C₂₀H₂₇NO₁₁ - PubChem.”, [En Línea]. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/656516> [Acceso Feb. 16, 2021].
- [24] “Prunasin | C₁₄H₁₇NO₆ - PubChem.” <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119033#section=3D-Conformer>, [En Línea]. Disponible: [Acceso Feb. 16, 2021].
- [25] J. del Cueto, B. L. Møller, F. Dicenta, and R. Sánchez-Pérez, “β-Glucosidase activity in almond seeds,” *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 126, pp. 163–172, Mayo 2018, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/j.plaphy.2017.12.028.
- [26] A. Ahmed, F. U.-H. Nasim, K. Batool, and A. Bibi, “Microbial β-Glucosidase: Sources, Production and Applications Amer,” *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, vol. 5, no. 1, pp. 31–46, 2017, [En Línea]. Disponible: doi: 10.12691/jaem-5-1-4.
- [27] J. Dijksterhuis and H. Wösten, “Development of *Aspergillus niger*,” *Studies in Mycology*, vol. 74, pp. 1–93, Mar. 2013, [En Línea]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/journal/studies-in-mycology/vol/74/suppl/C>.
- [28] C. K. Campbell, “Forms of Aspergillosis,” in *The Genus Aspergillus*, Springer US, 1994, pp. 313–319.
- [29] “4IIG: Crystal Structure Of Beta-glucosidase 1 From *Aspergillus Aculeatus* In Complex With D-glucose.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4IIG> (Acceso Feb. 25, 2021).
- [30] P. Sanz, “Los cianuros como veneno en la toxicología forense Cyanides like poison in forensic toxicology,” *Gaceta internacional de ciencias forenses, ISSN-e 2174-9019, N° 33 (Octubre-Diciembre), 2019, págs. 44-80*, no. 33, pp. 44–80, 2019, [En Línea]. Disponible: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7118926&info=resumen&idioma=ENG>. [Acceso: Feb. 20, 2021].
- [31] A. v Ramírez, “Cyanide toxicity. Bibliography research of its effects in animals and man,” Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2010, [En Línea]. Disponible: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37919769011>. [Acceso: Feb. 20, 2021]
- [32] “Hydrogen cyanide | HCN - PubChem.”, [En Línea]. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/768> [Acceso Feb. 20, 2021].
- [33] J. González Rodríguez, “Planta de Producción de ácido cianhídrico,” 2017.

- [34] C. Saux and D. Transición, “Executive Business School,” Executive Business School, 2012. Acceso: Feb. 20, 2021. [En Línea]. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323627686006>.
- [35] P. Medicinales Aromáticas, “Boletín Latinoamericano y del Caribe de,” *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 5, no. 5, pp. 100–106, 2006, Acceso: Feb. 20, 2021. [En Línea]. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85650505>.
- [36] F. Aguilar and J. Gabriel, “Síntesis verde de benzaldehído por oxidación de estireno mediante el catalizador Cu-MOF-74 obtenido bajo condiciones sostenibles,” Universidad Autónoma Metropolitana (México). Unidad Azcapotzalco. Coordinación de Servicios de Información., 2018. Acceso: Feb. 20, 2021. [En Línea]. Disponible: <http://zaloamati.azc.uam.mx/handle/11191/6720>.
- [37] J. A. Castillo Vargas, “Estructura y propiedades de compuestos orgánicos oxigenados y su incidencia en el eje agropecuario-ambiental,” Apr. 2020, [En Línea]. Disponible: doi: 10.22490/notas.3496.
- [38] “Benzaldehyde | C6H5CHO - PubChem.”, [En Línea]. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzaldehyde> (Acceso Feb. 20, 2021).
- [39] J. O. Alamilla Pérez and A. U. Trejo González, “Obtención de un Catalizador Oxidativo (Pentóxido de Vanadio / Óxido de Zinc) para la Esterificación de Aldehídos.”, Sep. 2017, [En Línea]. Disponible: <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/22728>. [Acceso: Feb. 22, 2021]
- [40] J. Williams, *Handbook of Anion Determination*, 1° Ed. Elsevier, 1979.
- [41] D. Suarez Ospina and Y. Morales Hernández, “Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas.”, *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, vol. 4, 2018.
- [42] V. Gomis Yagües, “Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución,” 2008, Acceso: Feb. 22, 2021. [Online]. Disponible: <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/8248>.
- [43] G. Arrázola, R. Sánchez, F. Dicenta, and N. Grané, “Art Content of the cyanogenic glucoside amygdalin in almondRG,” *Agronomía Colombiana*, vol. 30, p. 6, 2012, [En Línea]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/333982839>.

- [44] G. Kuroki, P. A. Lizotte, and J. E. Poulton, "Catabolism of (R)-Amygdalin and (R)-Vicianin by Partially Purified β -Glycosidases from *Prunus serotina* Ehrh. and *Davallia trichomanoides*," *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, vol. 39, no. 3–4, pp. 232–239, 1984, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1515/znc-1984-3-405.
- [45] G. Arrázola, N. Grané, M. L. Martín, and F. Dicenta, "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*, vol. 42, no. 1, pp. 23–30, 2013.
- [46] I. F. Bolarinwa, C. Orfila, and M. R. A. Morgan, "Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially- available in the UK," *Food Chemistry*, vol. 152, pp. 133–139, Jun. 2014, [En Línea]. Disponible:doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.002.
- [47] I. Boháčová, S. Procházková, and R. Halko, "Separation and determination of amygdalin and unnatural neoamygdalin in natural food supplements by HPLC-DAD," *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, vol. 36, no. 10, pp. 1445–1452, Oct. 2019, [En Línea]. Disponible:doi: 10.1080/19440049.2019.1650962.
- [48] A. Radoičić, R. Petronijević, F. Andrić, Ž. Tešić, and D. Milojković-Opsenica, "Development and validation of high-performance thin-layer chromatographic method for determination of amygdalin," *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, vol. 40, no. 5–6, pp. 297–303, Apr. 2017, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1080/10826076.2017.1298032.
- [49] J. Lee, G. Zhang, E. Wood, C. Rogel Castillo, and A. E. Mitchell, "Quantification of amygdalin in nonbitter, semibitter, and bitter almonds (*prunus dulcis*) by UHPLC-(ESI)QqQ MS/MS," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 32, pp. 7754–7759, Aug. 2013, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1021/jf402295u.
- [50] N. Zhang, Q. A. Zhang, C. X. Wei, and X. H. Fan, "Aqueous two-phase system for the extraction of amygdalin from the debitterized water of apricot kernels," *CYTA - Journal of Food*, vol. 17, no. 1, pp. 527–535, Jan. 2019, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1080/19476337.2019.1609586.
- [51] J. A. Funes, "Estudio composición química de la semilla y de los aceites de semilla de frutos de especie *Prunus*..." 1978.

- [52] M. P. Angarita Ruiz, “Obtención de aceite esencial de semilla de durazno por método soxhlet y arrastre de vapor,” Fundación Universidad de América, Nov. 2019. Acceso: Mar. 23, 2021. [Online]. Disponible: <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7713>.
- [53] M. Ruíz and F. García, “Extracción de amigdalina a partir de semillas de *Prunus persica* L. ‘durazno’ e hidrólisis enzimática enterobacteriana,” *Repositorio URP*, p. 9, 2018, [En Línea]. Disponible: <http://repositorio.urp.edu.pe/handle/URP/2019>.
- [54] W. Feng, M.-Y. Ding, and R. Zheng, “Isolation and Quantitation of Amygdalin in Apricot kernel and *Prunus tomentosa* Thunb by HPLC with solid-Phase extraction,” *Journal of Chromatographic Science*, vol. 43, 2005, [En Línea]. Disponible: <https://academic.oup.com/chromsci/article-abstract/43/7/383/384427>.
- [55] J. C. Amaya-Salcedo, O. E. Cárdenas-González, and J. A. Gómez-Castaño, “Solid-to-liquid extraction and HPLC/UV determination of amygdalin of seeds of apple (*Malus pumila* Mill): Comparison between traditional-solvent and microwave methodologies,” *Acta Agronomica*, vol. 67, no. 3, pp. 381–388, 2018, [En Línea]. Disponible: doi: 10.15446/acag.v67n3.67186.
- [56] L. Brimer, M. Abrahamsson, N. Mlingi, and H. Rosling, “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*, vol. 62, no. 2, pp. 239–242, Jun. 1998, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/S0308-8146(97)00152-0.
- [57] R. M. Gleadow, N. Bjarnholt, K. Jorgensen, J. Fox, and R. Miller, “Cyanogenic glycosides.” Stadium Press LLC, pp. 283–310, 2011, Acceso: Mar. 25, 2021, [En Línea]. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/223138629_CYANOGENIC_GLYCOSIDES.
- [58] G. Tunçel, M. J. R. Nout, and L. Brimer, “The effects of grinding, soaking and cooking on the degradation of amygdalin of bitter apricot seeds,” *Food Chemistry*, vol. 53, no. 4, pp. 447–451, Jan. 1995, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/0308-8146(95)99841-M.
- [59] A. Vogel, *Vogel - A Text-Book Of Practical Organic Chemistry*, 5^oEd. 1989.
- [60] J. Liebig, “Verfahren zur Bestimmung des Blausäuregehaltes der medicinischen Blausäure, des Bittermandel-und Kirschchlorbeerwassers,” *Annalen der Chemie und Pharmacie*, vol. 77, no. 1, pp. 102–107, Jan. 1851, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1002/jlac.18510770108.

- [61] R. Belcher, “Gilbert H. Ayres, Quantitative Chemical Analysis, 2nd Edn,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 45, no. 1, 1969, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1016/s0003-2670(00)89411-8.
- [62] G. Gliorio, “Metodo di Liebig-Denigés: Argentometria | ‘Ripetiamo Insieme: ACF1, #9.1.’” , [En Línea]. Disponible <https://www.youtube.com/watch?v=-Mcwt97X3NI&list=LL&index=7&t=185s> [Acceso Apr. 12, 2021].
- [63] J. L. Burgot, *Ionic equilibria in analytical chemistry*, 1ª Ed. Springer-Verlag New York, 2012.
- [64] F. Biancucci, A. González, A. Pérez, A. Ridolfi, and G. Strobl, “Manual de procedimientos analíticos para laboratorios de baja complejidad.,” Ginebra, 2007.
- [65] R. Briese and J. Couch, “Preservation of cyanogenetic plants for chemical analysis,” *Journal of Agricultural Research*, vol. 57, no. 2, pp. 81–107, Jul. 1938, [En Línea]. Disponible: <https://books.google.com.co/books?id=TYVMqbwZM80C&pg=PA493&lpg=PA493&dq=Reinhold+R.+Briese&source=bl&ots=ZYv8zEd9u-&sig=ACfU3U1bYu7uvM3Cg-SwIxYIZIdbLTmpBA&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiN5fKo9pfwAhUYElkFHb9CBsIQ6AEwDXoECBEQAw#v=onepage&q=Reinhold%20R.%20Briese&f=false>. [Acceso: Apr. 11, 2021]
- [66] N. Chaouali *et al.*, “Potential Toxic Levels of Cyanide in Almonds (*Prunus amygdalus*), Apricot Kernels (*Prunus armeniaca*), and Almond Syrup,” vol. 2013, 2013, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1155/2013/610648.
- [67] T. Tanaka *et al.*, “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*, pp. 1–7, 2020, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1080/19440049.2020.1778186.
- [68] J. A. Duke, *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. CRC Press, 2001.
- [69] G. Remaud, A. A. Debon, Y. L. Martin, G. G. Martin, and G. J. Martin, “Authentication of Bitter Almond Oil and Cinnamon Oil: Application of the SNIF-NMR Method to Benzaldehyde,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, no. 10, pp. 4042–4048, 1997, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1021/jf970143d.

- [70] H. Terada and K. Yamamoto, “Simultaneous Determination of Cyanogenic Glycosides, Benzaldehyde and Benzoic Acid in Processed Japanese Apricot by High Performance Liquid Chromatography.,” *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, vol. 33, no. 2, pp. 183–188, Apr. 1992, [En Línea]. Disponible: doi: 10.3358/shokueishi.33.183.
- [71] W. L. F. Armarego and C. L. L. Chai, *Purification of laboratory chemicals*. 2003.
- [72] E. Schuster, N. Dunn-Coleman, J. Frisvad, and P. van Dijck, “On the safety of *Aspergillus niger* - A review,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, no. 4–5, pp. 426–435, 2002, [En Línea]. Disponible: doi: 10.1007/s00253-002-1032-6.
- [73] R. Bhattacharya and S. J. S. Flora, “Cyanide Toxicity and its Treatment,” 2009.
- [74] J. E. Pedregosa, “Degradación bacteriana de cianuro y compuestos nitrogenados tóxicos,” Córdoba, 2016.
- [75] I. Reyes, M. Gonzáles, and F. López, “Análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido,” *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 12, no. 1, pp. 41–56, 2013.
- [76] D. A. Dzombak, R. S. Ghosh, and G. M. Wong-Chong, *Cyanide in water and soil: Chemistry, risk, and management*. 2005.
- [77] “Extracción sólido-líquido (Soxhlet) | De Química.”, [En Línea]. Disponible: <https://www.dequimica.info/extraccion-solido-liquido> [Acceso Jul. 06, 2021].
- [78] M. Abdalbasit, A. Gasmalla, R. Yang, and X. Hua, “Extraction of rebaudioside-A by sonication from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf and decolorization of the extract by polymers,” [En Línea]. Disponible: doi: 10.1007/s13197-015-1717-3.
- [79] F. Cabrera Escribano, “Experimentación en Síntesis Orgánica.”, [En Línea]. Disponible: <http://personal.us.es/gdegonzalo/uploads/Docencia/Qu%C3%ADmica%20Org%C3%A1nica%20II/QOII%20Pr%C3%A1cticas%20Manual%20alumnos%202014-15.pdf> [Acceso May 09, 2021].
- [80] “Test cianuros | 109701.”, [En Línea]. Disponible: https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Cyanide-Test,MDA_CHEM-109701#documentation [Acceso May 09, 2021].

GLOSARIO

Ácido cianhídrico: es un líquido incoloro a 20°C, con ligero olor a almendras amargas; en fase gaseosa es conocido como cianuro de hidrógeno, se le considera un ácido débil caracterizado por su estructura lineal conformado por un grupo nitrilo o cianuro unido a un hidrógeno. Tiene un punto de ebullición de 26°C lo cual permite muy fácilmente su paso al estado gaseoso. Algunas industrias utilizan compuestos de cianuro en procesos de síntesis para la fabricación de plásticos, papel, telas, gomas, fotografía y plaguicidas. Actualmente, su principal aplicación se basa en la recuperación de metales preciosos.

Benzaldehído: es una sustancia aromática conformada por un grupo aldehído conocido por ser el aldehído aromático más sencillo; tiene una gran importancia a nivel industrial gracias a su amplia gama de aplicaciones: disolvente industrial; saborizante de alimentos; en la industria farmacéutica; como intermediario en la elaboración de perfumes y tintes además de reactivo clave en la síntesis de ácido benzoico.

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

Biorrefinería: es una estructura enfocada a la producción de energía y productos químicos aplicando residuos de carácter agrícola, agroindustrial u orgánico como materia prima buscando valorizar y aprovechar dichos residuos mediante su conversión empleando diferentes procesos tecnológicos.

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.

Carozo: el carozo o hueso es una parte constituyente de los frutos drupáceos que, en el crecimiento del fruto presenta una contextura carnosa hasta la maduración del fruto donde adquiere dureza y rigidez. Junto con la semilla forman el endocarpio del fruto cuya función es la protección de la simiente.

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

Cromatografía (HPLC): la cromatografía líquida de alta resolución es un tipo de cromatografía en columna por el cual ingresa el analito en un sistema disolvente (fase móvil), dicha fase móvil circula por una columna cromatográfica en donde está situada la fase estacionaria en un flujo definido. Este arreglo permite la separación de los componentes del analito en base a la interacción de éstos con la fase móvil y la fase estacionaria

Destilación al Vacío: es un método de separación basado en la diferencia de los puntos de ebullición de las sustancias componentes de una mezcla homogénea a presión reducida.

Economía circular: sistema de aprovechamiento de recursos donde impera la reducción de los elementos, en la industria química consiste en el máximo aprovechamiento de un material, valorizando sus aplicaciones y usos para la producción de energía y diversos productos químicos.

Endocarpio: es la capa más interna del pericarpio que junto con la semilla forman una película. Su consistencia y estructura varían según la naturaleza de la fruta.

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

Extracción Soxhlet: es un método de extracción sólido-líquido que usa un solvente líquido para retirar componentes más solubles de la mezcla. En este lavado se pueden extraer componentes en los cuales la solubilidad del solvente extractante es baja y están conformados por una mezcla homogénea.

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.

Mesocarpio: es la capa intermedia del fruto situada entre en endocarpio y el epicarpio, la cual es la parte de la fruta que es consumida habitualmente por los seres vivos.

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

Patrón primario: es un compuesto con alto índice de purificación usado en volumetría como material de referencia para métodos analíticos.

Pericarpio: es la parte del fruto que recubre la semilla y es la transformación de las paredes del ovario del fruto.

Prunus: es el género de árboles y arbustos pertenecientes a la familia *Rosaceae*, algunos de ellos son los cerezos, ciruelo, duraznero y el almendro. Es el subgénero dentro del género *Prunus* conocidos por ser árboles frutales y con floraciones en comienzos de primavera.

Punto de decisión final: es un término usado para valoraciones de química analítica, el cual indica el punto donde la última gota del titulante hace contacto con la reacción con un indicador y este presenta un cambio visible en la reacción dando a conocer la finalización del método de valoración al agotarse las cantidades estequiométricas de los reactantes.

Punto de equivalencia: se refiere al punto de equivalencia como el punto donde las proporciones estequiométricas de dos o más sustancias participantes en un proceso de valoración química, se igualan llegando a reaccionar exactamente.

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.

Rosaceae: familia de gran número de plantas leñosas y herbáceas donde se encuentra la mayoría de las especies de frutas de consumo masivo caracterizadas por su importancia en la jardinería y en la industria cosmética.

Sustrato: es un medio sólido e inerte usado como material orgánico, inorgánico o sintético necesario para el crecimiento de un organismo.

Titulaciones por precipitación argentometría: las precipitaciones argentométricas, se basan en la formación de sales poco solubles en el medio empleado. La mayoría de las titulaciones, se realizan por medio de una solución de nitrato de plata, usado como patrón primario y titulante con el fin de interceder con aniones tales como bromuro, cianuro, cloruro, tiocianato, yoduro, entre otros, que se encuentran en una determinada muestra.

Valoración gravimétrica: es un método cuantitativo que permite determinar la cantidad proporcionada de un elemento presente en una muestra eliminando las sustancias presentes no deseadas convirtiendo el componente objetivo en un compuesto de composición definida que sea susceptible a pesarse.

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.

ANEXOS

ANEXO 1.

SELECCIÓN DE LA VARIEDAD DEL DURAZNO

Identificación de la materia prima a tratar



Nota. Fotografía de selección de materia prima provista por la empresa C.I Alliance

ANEXO 2.

MORFOLOGÍA DE LA VARIEDAD DEL DURAZNO DORADO

Endocarpio y mesocarpio del durazno seleccionado



Nota. Fotografía de la parte interna del durazno mostrando el mesocarpio y epicarpio

ANEXO 3.

FRUTO DEL DURAZNO CON EL MESOCARPIO Y ENDOCARPIO

Perspectiva visual de la morfología del durazno



Nota. Vista superior y frontal del endocarpio de durazno dorado.

ANEXO 4.
REMOCIÓN DE PULPA

Primera etapa de separación para el aislamiento de la semilla



Nota. Endocarpios removidos del fruto del durazno.

ANEXO 5.

SEMILLA DEL DURAZNO AISLADA

Selección y separación de semillas de durazno en buen estado



Nota. Semilla del durazno la cual se usó como materia prima para la obtención del ácido cianhídrico y benzaldehído.

ANEXO 6.

DETERMINACIÓN DEL PESO DE LA SEMILLA DE 175 DURAZNOS

Registro de masa por unidad (semilla)



Nota. Fotografía de determinación del peso de 157 semillas del durazno dorado y anotación de datos para posterior uso y cálculos.

ANEXO 7.
TRITURACIÓN DE LA MUESTRA

Reducción del tamaño de partícula a partir de trituration



Nota. Para la trituration de la muestra se usó un molino manual con discos.

ANEXO 8.
CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Empacado al vacío de la materia prima



Nota. Se realizó un proceso de empacado al vacío a la muestra, posteriormente se congelo a temperaturas a -23°C .

ANEXO 9. PESO DE MUESTRA

Medición en gramos de la muestra triturada



Nota. Peso de la muestra para el proceso de extracción Soxhlet.

ANEXO 10.

PROCESO DE EXTRACCIÓN SOXHLET

Preparación del montaje Soxhlet



Nota. Montaje del proceso de extracción Soxhlet en serie.

ANEXO 11.
MUESTRA EXTRAÍDA

*Primeros resultados del extracto deseado por extracción
Soxhlet*



Nota. Extracto asentado en la cámara de extracción

ANEXO 12.

ENVASADO DE MUESTRAS

Clasificación y almacenamiento de muestras



Nota. Almacenamiento de las muestras obtenidas por extracción Soxhlet

ANEXO 13.

PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARTE 1

Remoción de ácido benzoico de las muestras

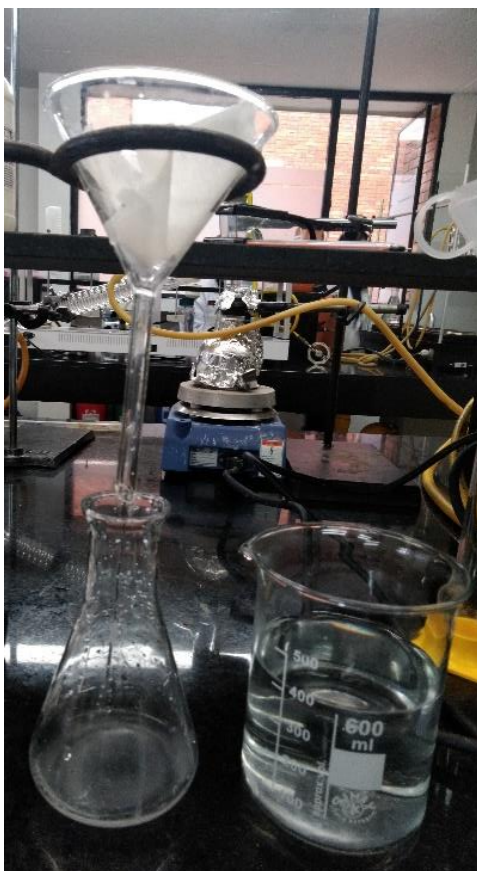


Nota. Separación de otras sustancias por decantación.

ANEXO 14.

PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARTE 2

Remoción de agua y etanol de las muestras



Nota. Filtración para remoción de agua de la solución a destilar.

ANEXO 15.
DESTILACIÓN DEL BENZALDEHÍDO

Preparación del montaje para destilación



Nota. Destilación por reflujo simple para la obtención del benzaldehído.

ANEXO 16.

RECUPERADO DE LA DESTILACIÓN

Almacenamiento de muestras (benzaldehído)

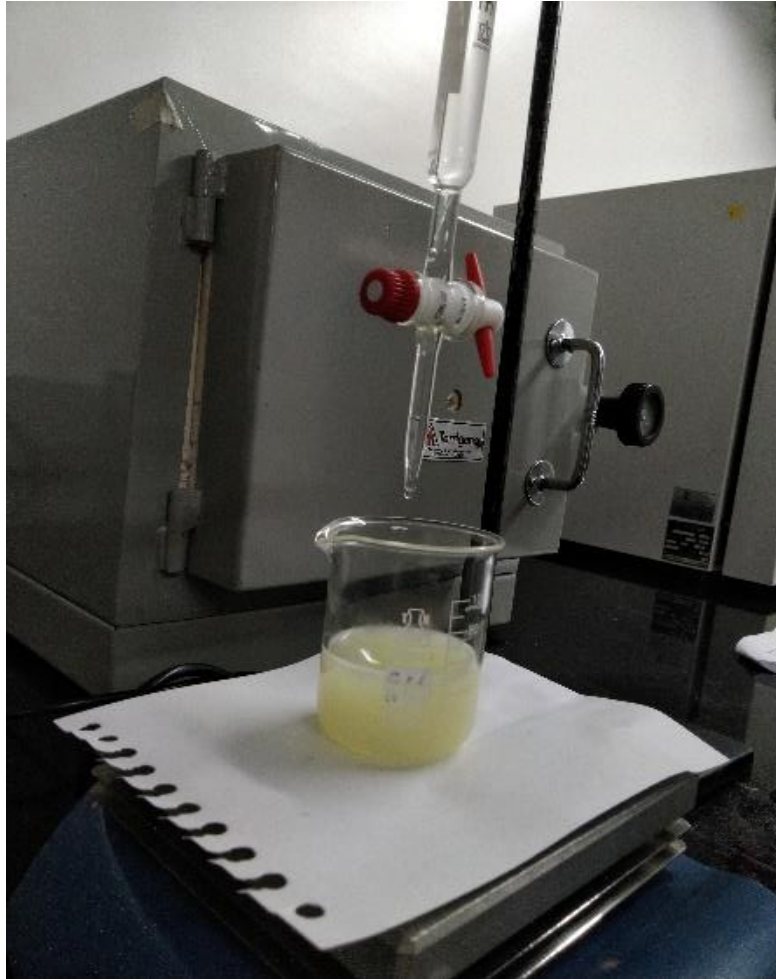


Nota. Solución recuperada de la destilación por reflujo simple

ANEXO 17.

CUANTIFICACIÓN DE CIANURO POR ARGENTOMETRÍA

Volumetría de precipitación para análisis de cianuro



Nota. Titulación por precipitación usando AgNO_3 , KI , NH_3 obteniendo un eluyente más un precipitado (método Liebig-Denigès)

ANEXO 18.

SECADO PARA CUANTIFICACIÓN DE CANTIDAD DE CIANURO

Dsecación al vacío del precipitado obtenido



Nota. Precipitado seco de titulaciones realizadas por el método de Liebig-Denigès en un desecador y posteriormente hace su respectivo pesaje.

ANEXO 19.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA FRASCOS Y VIAL COLECTOR

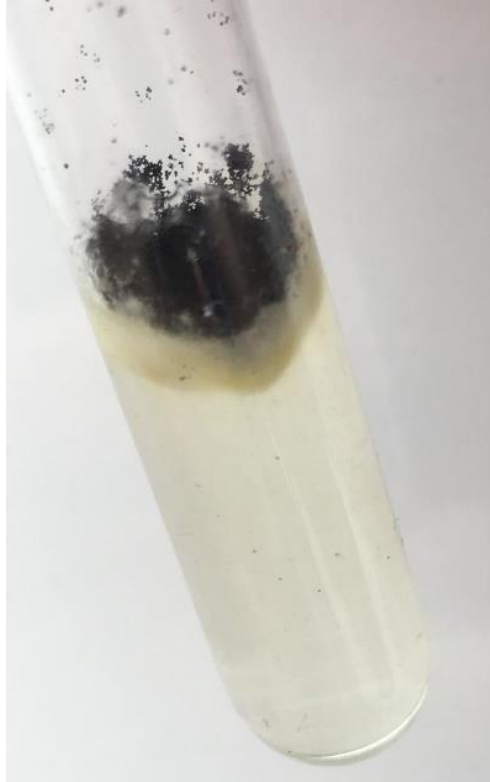
Montaje de microdifusión de Conway modificada-



Nota. Montaje realizado para la microdifusión

ANEXO 20.
INOCULACIÓN DEL HONGO *A. NIGER* USADO COMO PRODUCTOR DE ENZIMA
ADICIONAL

Cepa de Aspergillus niger inoculada



Nota. Inoculación del hongo *A. niger* como microorganismo productor de enzima β -glucosidasa.

ANEXO 21.

INMERSIÓN DE LAS MUESTRAS EN AGUA

Preparación del baño termostático para pruebas de microdifusión



Nota. Montaje baño termostático con una temperatura de 35°C y un tiempo de 12-24 horas con enzima externa y sin enzima.

ANEXO 22.

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS AROMÁTICOS

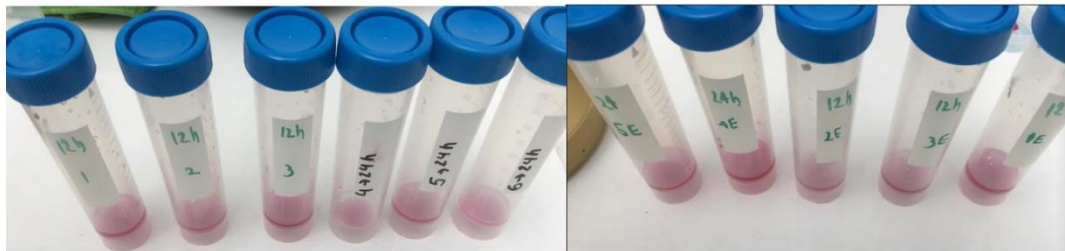
Comparación de resultados positivos contra negativos (Prueba de Schiff)



Nota. Determinación cualitativa de benzaldehído por prueba de Schiff, comparando resultados positivos para destilación (vial derecho) con resultados negativos (vial izquierdo) para microdifusión

ANEXO 23.
CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS AROMÁTICOS
(MICRODIFUSIÓN)

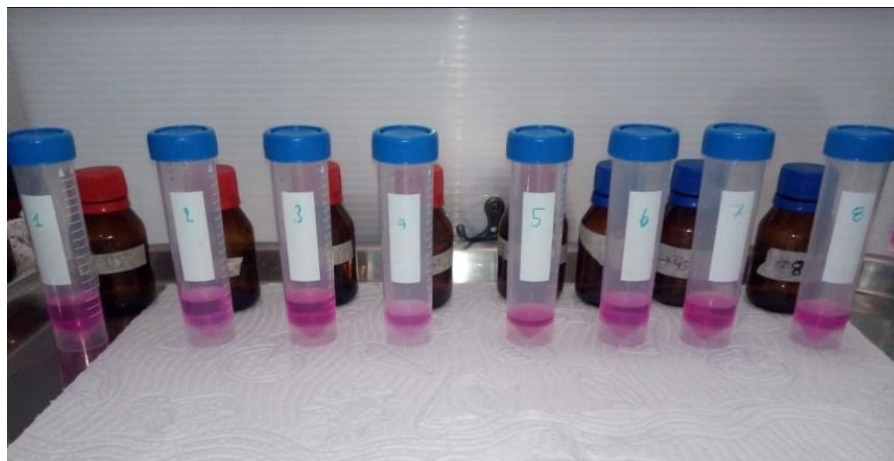
Evaluación cualitativa de benzaldehído en muestras tratadas por microdifusión



Nota. Determinación cualitativa de benzaldehído por prueba de Schiff, resultados negativos para ensayos por microdifusión con enzima (derecha) y sin enzima (izquierda).

ANEXO 24.
CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS AROMÁTICOS
(DESTILACIÓN)

Evaluación cualitativa de benzaldehído en muestras tratadas por destilación

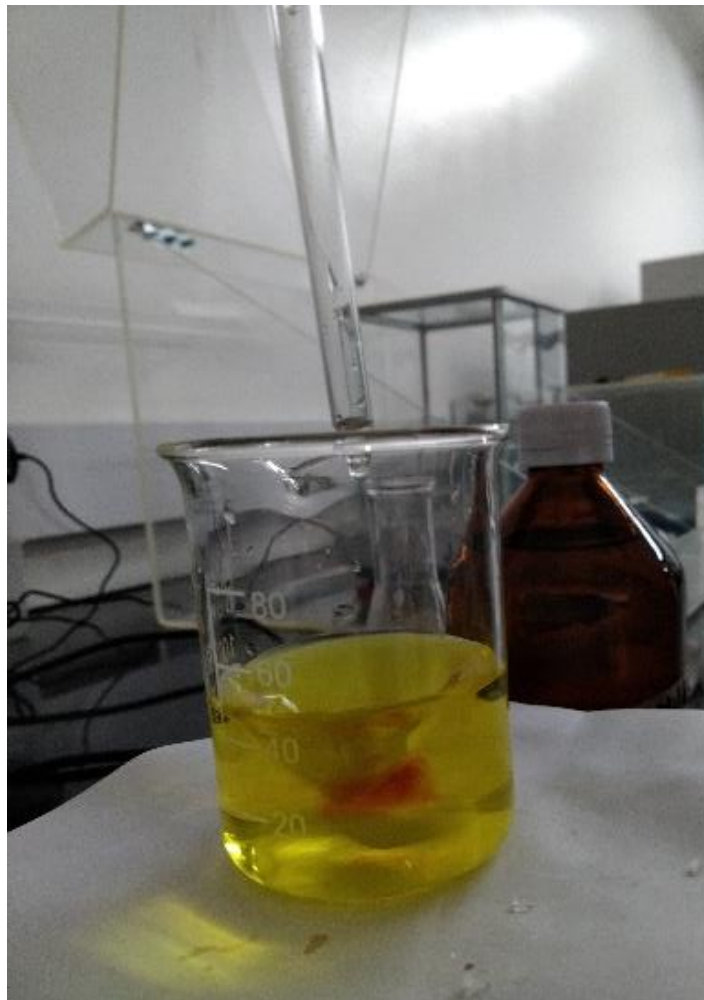


Nota. Determinación cualitativa de benzaldehído por prueba de Schiff, positivos para destilación.

ANEXO 25.

CUANTIFICACIÓN DE CIANURO POR ARGENTOMETRÍA

Volumetría por precipitación para análisis de cianuro (Mohr)



Nota. Titulación por precipitación usando el método de Mohr usando AgNO_3 como patrón primario (agente precipitante) y usando K_2CrO_4 como indicador.

ANEXO 26.

SECADO PARA CUANTIFICACIÓN DE CANTIDAD DE CIANURO

Muestras de precipitado secadas por desecación al vacío (Mohr)

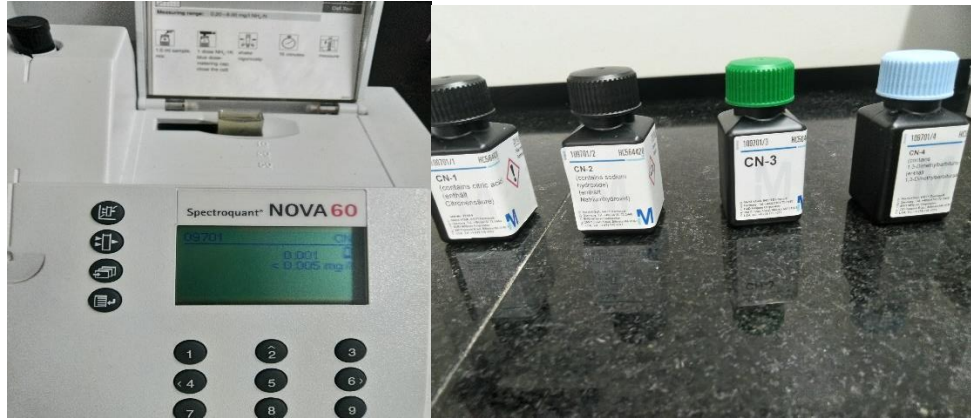


Nota. Precipitado seco de titulaciones realizadas por el método de Mohr.

ANEXO 27.

MÉTODO ADICIONAL COLORIMETRÍA PARA CIANURO.

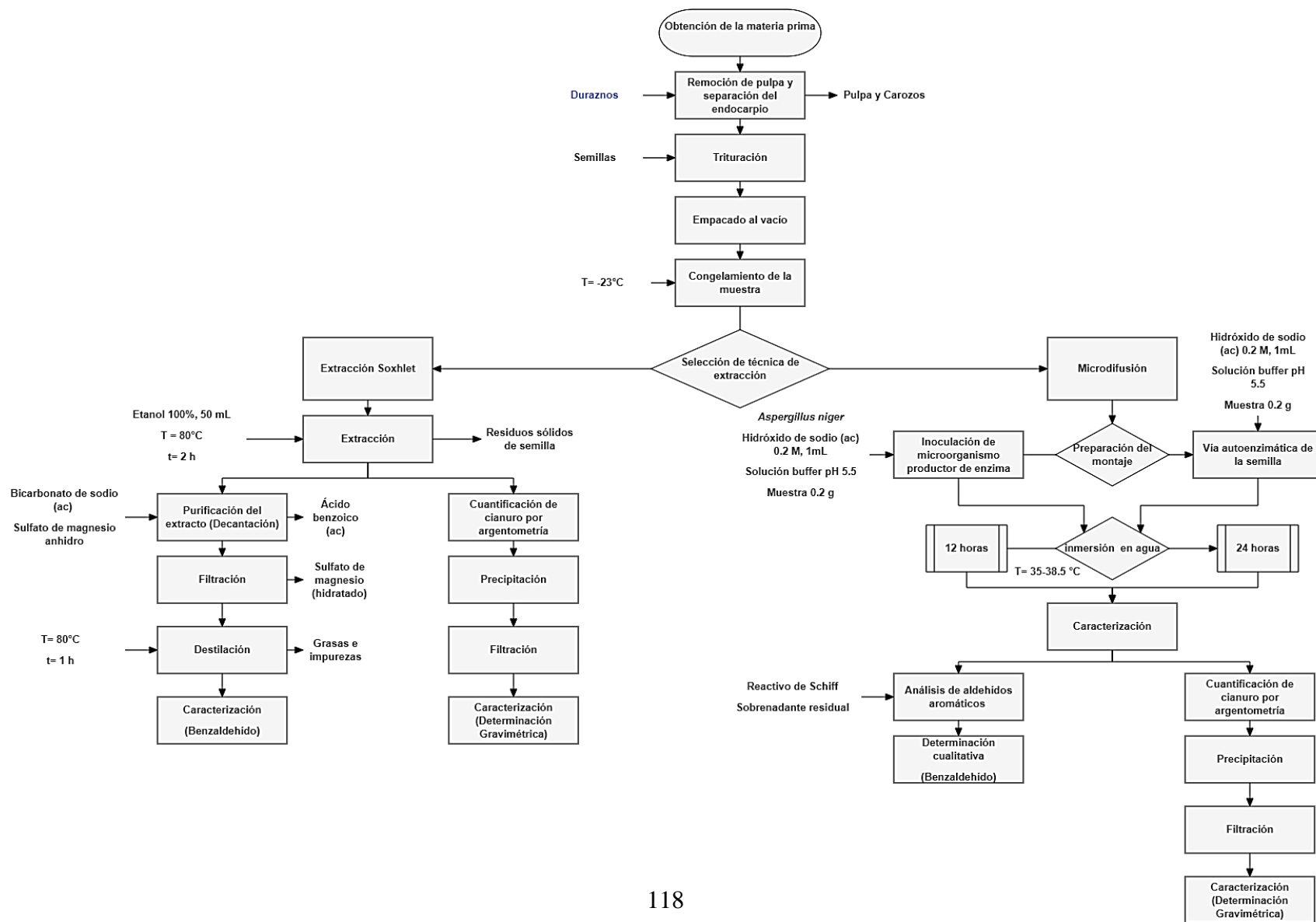
Colorimetría por fotómetro NOVA 60



Nota. Uso de un fotómetro UV-VIS para análisis colorimétrico de eluyente de las pruebas argentométricas empleadas por el método de Mohr (1 triplicado) con el fin de verificar presencalidad de cianuro.

ANEXO 28

ESQUEMATIZACIÓN DEL PROCESO METODOLÓGICO GENERAL



ANEXO 29
FÓRMULAS PARA EL CÁLCULO DE LOS RESULTADOS POR
VALORACIÓN GRAVIMÉTRICA PARA CIANUROS

Ecuación 1

$$mg_{CN} = P_c * F_g * 1000$$

Donde:

P_c : Masa del precipitado resultante en gramos

F_g : Factor gravimétrico (masa molar del cianuro/ masa molar de la sal resultante) [60]

Ecuación 2

$$C_{dis} = \frac{mg_{CN}}{g_{AgNO_3}}$$

Donde:

mg_{CN} : Miligramos de cianuro calculados en la Ecuación 1

g_{AgNO_3} : Concentración de la disolución de nitrato de plata expresada en gramos (16,987 g $AgNO_3$)

Ecuación 3

$$\frac{mg_{CN}}{100g_{muestra}} = \left[\frac{P_n * C_{dis} * f}{P_i} \right] * 100$$

Donde:

P_n : Gramos netos de nitrato de plata en disolución gastados

C_{dis} : Concentración de la disolución de nitrato de plata expresada en miligramos de CN⁻ por gramo de disolución de nitrato de plata

f : Factor debido a la recuperación estimada en la técnica (solo para microdifusión) del 89.5%

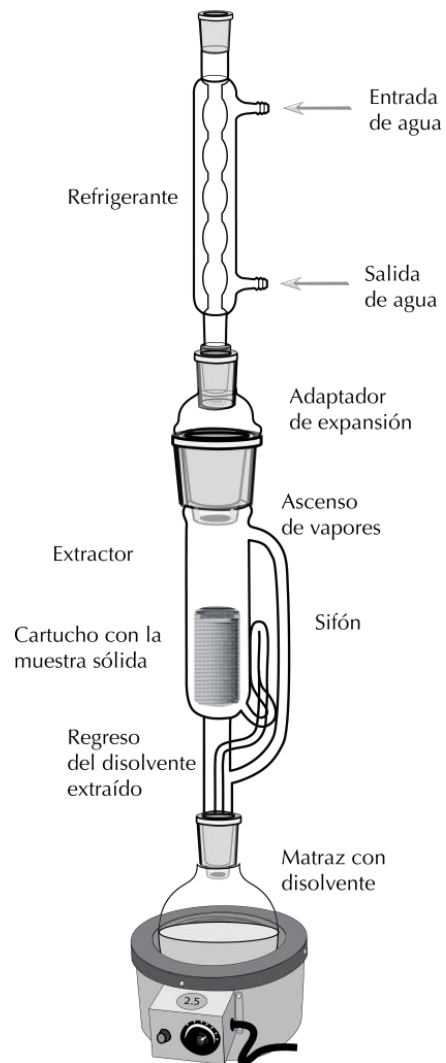
P_i : Peso de la muestra en gramos

ANEXO 30

ILUSTRACIÓN DEL EQUIPO SOXHLET

Diseño conceptual del extractor

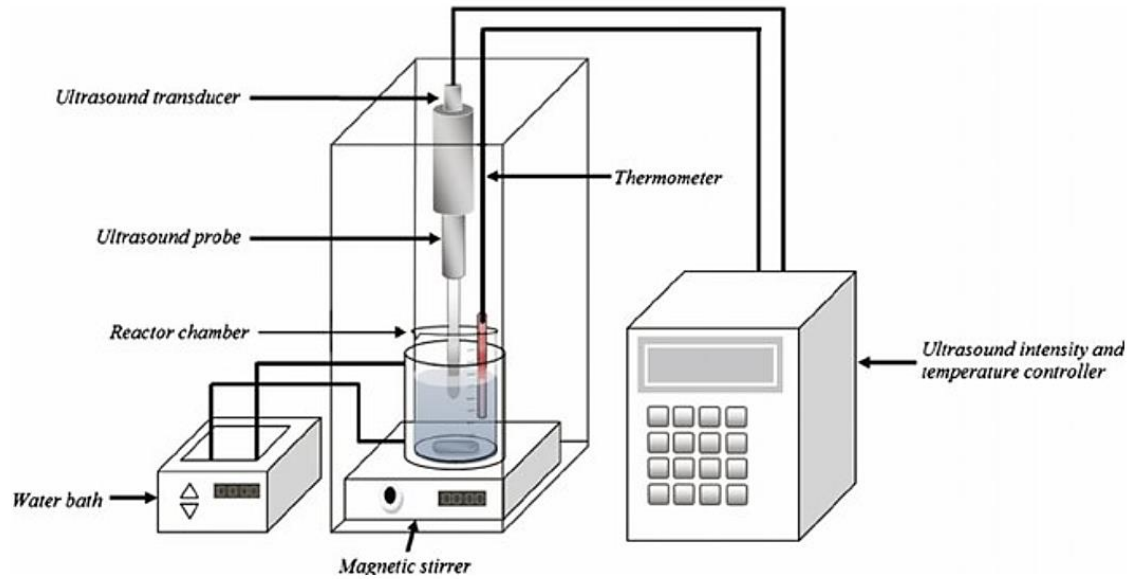
Soxhlet



Nota. Diseño básico de un montaje de extractor Soxhlet. [77]

ANEXO 31
ILUSTRACIÓN DEL MONTAJE DE EXTRACCIÓN
ULTRASÓNICA

Diseño conceptual del extractor ultrasónico

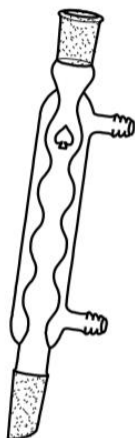


Nota. Diseño básico de un montaje de extracción ultrasónica [78]

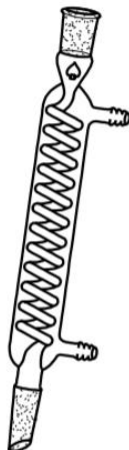
ANEXO 32

ILUSTRACIÓN DEL MONTAJE PARA EXTRACCIÓN POR REFLUJO SIMPLE

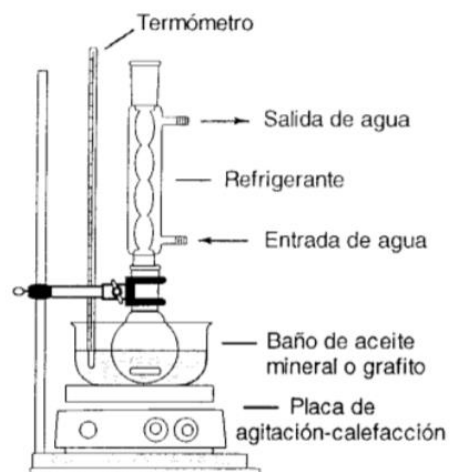
Diseño conceptual de un extractor de reflujo simple



Refrigerante
de Bolas



Refrigerante
de Serpentín



Nota. Diseño básico de un montaje de extractor de reflujo simple [79]

ANEXO 33.

PROCEDIMIENTO PARA EL DESARROLLO DE PRUEBAS POR COLORIMETRÍA PARA ANÁLISIS DE CIANUROS

Test de cianuros por colorimetría (guía)

Supelco

1.09701.0001

Spectroquant®
Test Cianuros

CN⁻

para determinación de cianuro libre y fácilmente liberable

1. Método

Los iones cianuro, con un agente clorante, forman cianuros de clorógeno, que reacciona con ácido 1,3-dimetilbarbitúrico dando un colorante violeta (reacción de Körny) **exenta de piridina**. Este colorante se determina fotométricamente.

El procedimiento corresponde a DIN 38405-13 y es análogo a ISO 6703, EPA 335.2, APHA 4500-CN E y ASTM D2036-09 D.

2. Intervalo de medida y número de determinaciones

Cubetas mm	Intervalo de medida mg/l de CN	Número de determinaciones
50	0,0020 - 0,1000	
20	0,005 - 0,200	100
10	0,010 - 0,500	

Datos de programación para determinados fotómetros / espectrofotómetros, ver www.signaldrich.com/photometry.

3. Campo de aplicaciones

El test determina solamente iones cianuro (cianuro libre). Para la determinación de cianuro fácilmente liberable es necesaria una disgregación de la muestra (ver apartado 6).

Materiales de las muestras:

Aguas subterráneas y superficiales
Aguas potables y minerales
Aguas industriales
Aguas residuales y de infiltración

El test **no es adecuado** para agua de mar.

4. Influencia de sustancias extrañas

Esta se comprobó de forma individual en soluciones con 0,25 y con 0 mg/l de CN. Hasta las concentraciones de sustancias extrañas indicadas en la tabla la determinación todavía no es interferida. Los valores entre paréntesis son válidos para muestras que fueron disgregadas según el apartado 6. No se han controlado efectos acumulativos; sin embargo, éstos no pueden ser excluidos.

Concentración de sustancias extrañas en mg/l o en %					
Ag ⁺	10 (10)	Pb ²⁺	100 (250)	Pb ²⁺	100
Al ³⁺	100	Ni ²⁺	0,1	PO ₄ ³⁻	1000
Br ⁻	0,1	Pb ²⁺	1000	SCN ⁻	0,05
Ca ²⁺	1000	Pb ²⁺	1000	SO ₄ ²⁻	1000
Ca ²⁺	100	NH ₄ ⁺	1000	Zn ²⁺	100
Cr ³⁺	100	NO ₂ ⁻	0,01 (2,5)		Na ₂ SO ₄
Cu ²⁺	5 (10)	NO ₃ ⁻	10		

Interfieren todos los oxidantes y reductores.

* ensayado con tenacetos y reductores.

5. Reactivos y auxiliares

Tener en cuenta las advertencias de peligro que se encuentran en los diferentes componentes del envase!

Los reactivos del test son utilizables hasta la fecha indicada en el envase si se conservan cerrados entre +15 y +25 °C.

Contenido del envase:

1 frasco de reactivo CN-1
1 frasco de reactivo CN-2
1 frasco de reactivo CN-3
1 frasco de reactivo CN-4
1 dosificador venta
1 AutoSelector

Otros reactivos y accesorios:

MQuant® Tiras indicadoras universales pH 0 - 14, art. 109535
Sodio hidróxido en solución 1 mol/l Titrapur®, art. 109137
Ácido sulfúrico 0,5 mol/l Titrapur®, art. 109072
MQuant® Test Cianuros, art. 1.15048
Intervalo de medida 1 - 30 mg/l de CN
Cianuros - solución patrón Certipur®, 1000 mg/l de CN, art. 119533
Cubetas vacías 16 mm con tapa roscada (25 unidades), art. 114724
Termoreactor
Pipetas para volúmenes de pipeteo de 5,0 y de 10 ml
Cubetas rectangulares 10, 20 y 50 mm (2 unidades de cada tipo), art. 114946, 114947 y 114944
Cubetas semicirculares 50 mm (2 unidades), art. 173502

6. Preparación

Al usar por primera vez **substituir la tapa roscada del frasco de reactivo CN-1 por el dosificador verde**.

Mantener **verticalmente** el frasco de reactivo y en cada dosificación **agitar el cursor en el dosificador hasta el tope**. Antes de cada dosificación poner cuidado en que el cursor esté completamente sacado.

Acabada la serie de mediciones, **cerrar el frasco de reactivo de nuevo con la tapa roscada**, ya que la absorción de humedad del aire perjudica el funcionamiento del reactivo.



- Análisis las muestras inmediatamente después de la toma de muestras.
- El valor del pH debe encontrarse en el intervalo 4,5 - 8,0. Si es necesario, ajustar con solución de hidróxido sódico o con ácido sulfúrico.

- Disgregación para determinación de cianuro fácilmente liberable (igafas protectoras):

Muestra preparada	10 ml	Pipetear en una cubeta vacía.
Reactivo CN-1	1 dosis	Añadir y agitar brevemente la cubeta firmemente cerrada.

Calentar la cubeta 30 minutos a 120 °C en el termoreactor precalentado. Dejar enfriar a temperatura ambiente la cubeta cerrada en un soporte para tubos de ensayo.

¡NO refrigerar con agua fría!

Agitar la cubeta antes de abrir.

Reactivo CN-2	3 gotas**	Añadir inmediatamente después de abrir con cuidado, cerrar firmemente la cubeta y mezclar.
---------------	-----------	---

El valor del pH debe encontrarse en el intervalo 4,5 - 8,0.

Comprobar con tiras indicadoras universales.

Si es necesario, ajustar el pH con reactivo CN-2.

**Mantener el frasco verticalmente durante la adición del reactivo!

- Comprobar el contenido de cianuros con el test Cianuros MQuant®. Las muestras con más de 0,500 mg/l de CN⁻ deben diluirse con agua destilada antes de la disgregación.
- Filtrar las muestras turbias.

7. Técnica

Muestra preparada (5 - 30 °C)	5,0 ml	Pipetear en un tubo de ensayo**.
Reactivo CN-3	1 microcuchara verde rasa (en la tapa del frasco CN-3)	Añadir y agitar brevemente.

Reactivo CN-4	1 microcuchara azul rasa (en la tapa del frasco CN-4)	Añadir y agitar vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente .
---------------	---	---

Dejar en reposo 10 minutos (tiempo de reacción), luego introducir la muestra de medición en la cubeta rectangular y medir en el fotómetro.

** Se recomienda utilizar cubetas vacías que pueden cerrarse con tapas roscadas. Así se evitan pérdidas de gas.

Para la medición en la cubeta de 50 mm deben duplicarse el volumen de la muestra y las cantidades de los reactivos CN-3 y CN-4 (esto es válido solamente para la muestra de medición, no para la disgregación descrita en el apartado 6). En su lugar puede usarse la cubeta semicircular art. 173502.

Notas sobre la medición:

- Ciertos fotómetros exigen una muestra en blanco (agua destilada sin reactivos).
- En caso de utilizarse la cubeta de 50 mm se recomienda medir contra una muestra en blanco de preparación propia (preparación como la muestra de medición, pero con agua destilada en lugar de la muestra) para asegurarse de esta manera la exactitud. Configurar el fotómetro para medición de muestra en blanco.

Configurar el fotómetro para la medición del blanco.

- Para la medición fotométrica las cubetas deben estar limpias. Si es necesario, limpiarlas con un paño seco y limpio.
- Las turbideces después de acabada la reacción dan como resultado valores falsamente elevados.
- El valor del pH de la solución de medición debe encontrarse en el intervalo 5,0 - 8,0.
- El color de la solución de medición permanece estable 20 minutos después de transcurrido el tiempo de reacción antes indicado. (En caso de 30 minutos el valor de medición habría disminuido en un 3 %, si caso de 60 minutos en un 7 %.)

8. Aseguramiento analítico de la calidad

Se recomienda antes de cada serie de mediciones.

Para comprobar el sistema fotométrico de medición (reactivos del test, dispositivo de medición, manipulación) y el modo de trabajo puede usarse una solución patrón de cianuros diluida de 0,250 mg/l de CN⁻.

Mediante adición de patrón se pueden determinar las interferencias dependientes de la muestra (efectos de matriz).

Notas adicionales, ver bajo www.gm-test-kits.com.

Certificados de calidad y foto para kits de test de Spectroquant®, véase el sitio web. Allí se indican todos los datos de control de producción que se han obtenido según ISO 8466-1 y DIN 38402 A31.

- 9. Notas
- Carrier de nuevo inmediatamente los frascos tras la toma de los reactivos.
- Podrá pedirse información sobre los procedimientos de eliminación en www.digposal-test-kits.com.

Merkel GmbH, 82271 Geretsried, Germany

tel. +49 (0)89 172 2440

www.digposal-test-kits.com/photometry

9949 Merano, Deutschland, 400 Rue des Bains

Bellevue, WA 98005, USA, tel. +1 425 713 4321

Supelco Analytical GmbH, 9949 Merano, Deutschland

2139 West 40th, St. John's, Toronto, ON M8B 1K6

Phone: +1 416 291 4321



Nota. Manual de instrucciones para análisis colorimétrico de cianuro para el fotómetro NOVA 60 [80]

ANEXO 34.

DATOS DE LA MATERIA PRIMA

Peso en gramos de las semillas		Peso en gramos de las semillas	
1	0.32	52	0.33
2	0.29	53	0.30
3	0.29	54	0.33
4	0.24	55	0.31
5	0.31	56	0.31
6	0.11	57	0.31
7	0.29	58	0.28
8	0.33	59	0.30
9	0.29	60	0.19
10	0.31	61	0.15
11	0.19	62	0.26
12	0.30	63	0.25
13	0.32	64	0.26
14	0.22	65	0.21
15	0.26	66	0.23
16	0.29	67	0.28
17	0.29	68	0.29
18	0.22	69	0.32
19	0.27	70	0.29
20	0.29	71	0.25
21	0.20	72	0.26
22	0.27	73	0.29
23	0.27	74	0.20
24	0.25	75	0.34
25	0.23	76	0.26
26	0.23	77	0.29
27	0.29	78	0.21
28	0.20	79	0.27
29	0.26	80	0.27
30	0.27	81	0.22
31	0.20	82	0.30
32	0.25	83	0.27
33	0.30	84	0.23
34	0.04	85	0.27
35	0.27	86	0.25
36	0.28	87	0.26
37	0.29	88	0.29
38	0.33	89	0.31
39	0.29	90	0.27
40	0.26	91	0.30
41	0.26	92	0.25
42	0.23	93	0.17
43	0.22	94	0.27
44	0.21	95	0.23
45	0.31	96	0.31
46	0.27	97	0.07
47	0.25	98	0.31
48	0.29	99	0.26
49	0.26	100	0.35
50	0.31	101	0.29
51	0.27	102	0.28

Peso en gramos de las semillas	
103	0.22
104	0.28
105	0.30
106	0.28
107	0.28
108	0.30
109	0.35
110	0.25
111	0.21
112	0.26
113	0.27
114	0.34
115	0.32
116	0.32
117	0.30
118	0.34
119	0.29
120	0.20
121	0.31
122	0.23
123	0.25
124	0.22
125	0.32
126	0.35
127	0.26
128	0.28
129	0.21
130	0.31
131	0.26
132	0.23
133	0.30
134	0.27
135	0.30
136	0.20
137	0.29
138	0.27
139	0.26

Peso en gramos de las semillas	
140	0.29
141	0.25
142	0.30
143	0.28
144	0.32
145	0.24
146	0.31
147	0.25
148	0.26
149	0.27
150	0.21
151	0.34
152	0.24
153	0.30
154	0.26
155	0.66
156	0.20
157	0.42
158	0.32
159	0.25
160	0.33
161	0.34
162	0.11
163	0.55
164	0.50
165	0.42
166	0.39
167	0.20
168	0.24
169	0.17
170	0.26
171	0.07
172	0.27
173	0.07
174	0.18
175	0.17

Media	0.27
D. estándar	0.07005871
CV	25.89%

Nota. Peso unitario de las semillas utilizadas para la fabricación de la muestra

ANEXO 35

RECOMENDACIONES

Se aconseja disminuir el tiempo de preparación de la materia prima, así como evitar su manipulación tanto como sea posible para prevenir alteraciones al contenido de ácido cianhídrico por su volatilidad y al benzaldehído por su reactividad con el oxígeno.

Se sugiere implementar mayor cantidad de materia prima para la extracción de amigdalina - prunasina por extracciones de tipo alcohólico, así pueden obtener muestras que presenten mayor homogeneidad reduciendo el error y variabilidad experimental a la hora de caracterizar el contenido de cianuro.

Se recomienda la extracción previa de la enzima si se trata de un microorganismo o cualquier tipo de material de origen, para evitar la interferencia que pueda generarse entre el HCN a captar a través de métodos como ultracentrifugación o cromatografía de intercambio iónico.

Se aconseja profundizar en los tiempos de microdifusión considerando la temperatura óptima, así como el pH requerido, permitiendo entender mejor el comportamiento de la reacción para este tipo de muestras. Además de permitir complementar la razón de la disminución de la concentración de cianuro por tiempos prolongados.

Es recomendable aplicar destilación al vacío para la obtención de benzaldehído, seguido de una caracterización en lo posible de gran precisión tal como un análisis por resonancia magnética nuclear, espectroscopía de masas de relación isotópica o cromatografía líquida de alta resolución como técnicas recomendadas por la bibliografía revisada.