

COMPONENTES QUIMICOS DE LA UVA (*Vitis vinifera* L.) Y SU INTERACCION CON SALES DE CIANURO¹

Chemical compounds of grape (*Vitis vinifera* L.) and its interaction with cyanide salts

Claudio Ciudad B.² y Regina Ite D.²

SUMMARY

The possible grape berry contamination with cyanide salts, caused a study to elucidate the conduct and persistence of these compounds in the fruit which was carried out at the Central Laboratory of Contaminants and Foods (La Platina Experimental Station, INIA).

It was proved that the persistence of poison by law of mass action, depend on the cyanide initial concentration chemical activity of reagents and mainly the environmental temperature.

Also was possible to validate that in grapes, organic acids participates in an acid-base reaction giving proton and produce hydrogen cyanide, that should be easily scattered. Other compound like glucose and fructose contain electrophilic carbonyl groups, that react with cyanide to give cyanohydrin.

Both potentialities were submitted to studies, forcing cyanide ion to manifest kinetic decay in: berries, juice, glucose solution 22% and water. All of them at pH 3.7 and 4°C. The objective was to analyse residual cyanide by the Merck method, in different times, from 0 to 150 minutes.

The result showed that the cyanide behaviour is similar in berries, juice and glucose solutions, going through a pseudo first-order reaction, exponential type, as:

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

In a cyanide acid solution, this falled off following a linear regression, as:

$$C = 948 - 0,665t$$

INTRODUCCION

La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, en marzo de 1989, denunció la contaminación intencional de uvas procedentes de Chile con cianuro a un nivel de 0,58 ppm (3 µg/baya).

La gravedad del hecho, y sus posibles implicaciones, motivó a que las autoridades gubernamentales solicitaran al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), la realización de una investigación sobre el efecto del cianuro (CN⁻) en las uvas de

exportación, haciéndose énfasis en la estabilidad del tóxico en el interior de las bayas, debido a que los antecedentes disponibles inducían a pensar que la uva aludida, fue inyectada en algún punto del proceso de adecuación y transporte del producto.

Parte importante de esta investigación se orientó, en sus aspectos básicos, hacia el esclarecimiento de la interacción directa entre las sales de cianuro y los componentes químicos de la uva, lo que significa, que la persistencia del veneno, por ley de equilibrio químico, depende de la concentración inicial de las sales de cianuro, de la actividad química de los reaccionantes con respecto a la capacidad nucleofílica del ion CN⁻, y fundamentalmente, del régimen de temperatura y pH, bajo los cuales de llevan a efecto estas reacciones, los que a su vez, inciden sobre la velocidad de reacción.

¹Recepción de originales: 2 de enero de 1990.

²Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

De aquí que sea necesario conocer previamente, los constituyentes químicos principales de la uva (Cuadro 1), como lo señala Yufera (1979) en la composición representativa de la baya.

CUADRO 1. Composición química representativa de la uva
TABLE 1. Chemical composition of grape

| Constituyentes | Concentración |
|---------------------------------|---------------|
| Agua, % | 76 - 88 |
| Azúcares, % | 9 - 20 |
| Compuestos nitrogenados, % | 0,5 - 1,3 |
| Acidos libres, meq/100 g de uva | 4 - 18 |
| Pectinas, % | 0,2 - 0,5 |
| Cenizas, % | 0,3 - 0,7 |

Existen muchos otros compuestos en proporciones más bajas que también juegan un rol en las propiedades bromatológicas de la uva, como: taninos, pigmentos, esencias, ceras, vitaminas, enzimas, aldehidos, alcoholes, ésteres, etc.

De acuerdo al Cuadro 1, el porcentaje de azúcar alcanza un valor promedio de 20% (20° Brix) en su madurez máxima, siendo los más importantes, por su concentración, la fructosa y la glucosa que suman en conjunto un 95% del total de azúcares de la uva. Según Solomons (1988), estos dos carbohidratos son polihidroxiacetona y aldehido, respectivamente. Contienen grupos carbonilos, químicamente activos, que por su naturaleza electrofílica formarían cianohidrinás con el CN⁻.

Los otros constituyentes que tendrían alta participación en la conducta de las sales de cianuro en el seno de la baya, son los ácidos orgánicos. Según Yufera (1979), la acidez de la uva en su estado de madurez se debe principalmente a los ácidos tartárico, málico y cítrico, que representan el 95% de la totalidad de ellos. El contenido global de estos ácidos en el grano es del orden de 40-180 meq/kg de uva, donde aproximadamente, el 75% se encuentra libre y el resto en forma de sales.

Estos tres ácidos, según Cram y Hammond (1963), tienen grupos funcionales carboxílicos que, en medio acuoso, participan en las reacciones ácido-base (Brønsted-Lowry), porque son capaces de donar un protón a una sustancia base que, para el caso que preocupa, son las sales de cianuro.

De acuerdo a este planteamiento, se podría suponer que las sales de cianuro frente a los ácidos de

la uva, generan ácido cianhídrico que es rápidamente disipado en la pulpa o hacia el exterior.

La confrontación experimental de estas dos hipótesis que afectan la estabilidad en sus aspectos cinéticos del CN⁻ en el interior de las bayas, ha sido la preocupación principal de este trabajo.

Además, en forma complementaria, se estudió la cantidad de líquido posible a inyectar en una baya de uva y la calidad del líquido que expele el fruto.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio Central de Contaminantes y Alimentos de la Estación Experimental La Platina (INIA), durante los meses de marzo a julio de 1989, y forma parte de una investigación integral (Proyecto "Interacción uva-cianuro").

Variedades

Para el estudio integral citado, se emplearon tres variedades de uva en madurez de cosecha: Sultana, Ribier y Flame Seedless, que de acuerdo a los propósitos específicos de esta investigación, fueron consideradas en su conjunto.

Análisis físico

Análisis refractométrico del contenido de azúcar de las uvas, utilizando un refractómetro manual marca Atago.

Análisis químico

La muestra en cantidad suficiente, conteniendo CN⁻, se estabilizó a pH 12, se homogeneizó a 15.000 rpm, en presencia de NaOH 0,5N, se diluyó a 100 ml con agua desionizada y se centrifugó a 0°C durante 10 minutos a 27×10^3 g (13.000 rpm).

A la muestra, colocada en una aparato de destilación por arrastre de vapor, recomendado por el método de Merck (1974), se le agregó 20 ml de NaOH 1N y se hizo pasar una corriente de aire con un flujo de 5 a 10 burbujas por segundo. A través del tubo de introducción y aireación, se introdujeron 50 ml del sobrenadante proveniente de la muestra centrifugada y se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico 9M.

Después de calentar 5 a 10 minutos la solución anterior, se hirvió durante 30 minutos con corriente de aire y se continuó con el burbujeo, solamente 15

minutos más. El líquido destilado alcalino, se recibió en un matraz aforado de 100 ml, se lavó el frasco con agua desionizada y se enrasó.

Se sabe que la determinación espectrofotométrica con ácido barbitúrico-piridina es adecuada para un rango de concentración de CN^- que fluctúa entre 0,02 a 2 mg CN^-/lt ; en caso de concentraciones más elevadas, debe diluirse el destilado.

Además, según el contenido de iones CN^- , se reparan 10 a 25 ml de destilado en un matraz aforado de 100 ml y para concentraciones de CN^- superiores a 2 mg de CN^-/lt , se diluye una alícuota del destilado con NaOH 0,2N; por lo tanto, de esta solución diluida se agregan 25 ml en un matraz aforado de 100 ml. Si la alícuota tomada es menor a 25 ml, se debe completar a este volumen con solución NaOH 0,2N. En forma sucesiva se agregan 15 ml de una solución KH_2PO_4 al 15% y 1,5 ml de una solución de cloramina-T al 1%. Después de mezclar durante un minuto, se añade 3 ml de una solución de ácido barbitúrico-piridina; la solución se enrasa y se mezcla. El pH de la solución debe ser alrededor de 6. Transcurridos 20 minutos, se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm y se estima la concentración por comparación con una curva de referencia de KCN.

Soluciones matrices

Para tal efecto se realizó una degradación química del cianuro de potasio en diferentes matrices a 4°C. De acuerdo a la actividad química potencial del CN^- es posible que sufra transformaciones en el interior de la baya, lo que se manifiesta por su desaparición gradual. Para estudiar este efecto se prepararon diferentes matrices y soluciones con actividad química, y se cuantificó el CN^- residual, agregado a diferentes tiempos de incubación por el método Merck (Merck, 1974) como se detalla a continuación.

Zumo de uva. A 10 g de zumo (pH 3,7 y 19,4° Brix), se le adicionaron 2 mg de CN^- y se incubó a 4°C por diferentes tiempos: 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. La reacción zumo de uva- CN^- se detuvo llevando a pH 12 con NaOH 1N.

Bayas. El procedimiento en algunos aspectos, fue diferente al caso anterior. Se utilizaron dos bayas, cada una inyectada con 5 μl de KCN 50%, lo que equivale a inyectar 1 mg de $\text{CN}^-/5$ g de baya. Inmediatamente después de la inyección se incubó a 4°C, por diferentes tiempos: 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos.

Después de la inyección la reacción entre la uva y el CN^- se detuvo homogenizando con NaOH 1N hasta pH 12.

Solución ácida de glucosa (19,4° Brix, pH 3,7). A 10 g de esta solución se le adicionaron 2 mg de CN^- y se incubó a 4°C por diferentes tiempos: 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. La reacción fue detenida con NaOH 1N hasta alcanzar pH 12.

Solución acuosa ácida (pH 3,7). A 10 g de esta solución se le adicionaron 2 mg de CN^- y se incubó a 4°C en condiciones similares a las anteriormente descritas. No fue necesario homogenizar ni centrifugar estas dos últimas soluciones.

Degradación de cianuro de potasio en bayas de uva a 0°C durante 14 días. Se inyectaron 8 bayas de un racimo de uva Ribier, con 5 μl de KCN 50% y se almacenaron en cámara fría a 0°C durante 14 días. Finalizado este período fueron analizadas por el método Merck (1974), para detectar el CN^- residual.

Cantidad de volumen a inyectar en una baya

Obviamente, la concentración inicial de CN^- presente en la matriz depende del volumen que acepte la baya en su interior. De acuerdo a esta premisa, se probaron diferentes tipos de jeringas con sus respectivas agujas, para determinar el volumen aceptado por la baya.

RESULTADOS Y DISCUSION

Capacidad de la baya de uva.

Con respecto a la utilización de diferentes tipos de jeringas, los resultados indican que fue imposible inyectar grandes volúmenes de soluciones, sin que se alterase la estructura física de la baya de uva, por lo tanto, sólo fue dable inyectar fracciones de mililitros con la ayuda de microjeringas con una capacidad máxima de 10 μl .

Esto indujo a inyectar soluciones de CN^- en volúmenes no superiores a 5 μl , los que, aparentemente, no afectaban la estructura de la baya y, a su vez, permitían en cierta forma, que la solución se mantuviera en el interior de la baya. Incluso se pudo observar que una vez inyectada la máxima dosis (5 μl de solución de KCN al 50%), a una baya con 20° Brix de azúcar, al retirar la aguja, salía al exterior una gota de 7 μl con una concentración de 4° Brix. Esto significa que parte del CN^- , por lo menos, pudo haber salido hacia el exterior mezclada con el zumo.

Asimismo, demuestra que, desde el punto de vista físico, una baya es un compartimiento inexpandible y no sólo eso, sino que posee una presión positiva (presión de turgor) que trata de impedir la entrada intencional de líquidos a través de su membrana. El experimento permitió hipotetizar que, al enfrentarse la solución de CN⁻ y el zumo, se producen intercambios de solutos en la interfase de contacto. El CN⁻ se difundiría hacia el interior de la pulpa de uva, pasando por las células y espacios intercelulares. Esta aseveración se hace evidente cuando se inyectan bayas con azul de metileno, ya que el pigmento difunde a través de la pulpa del fruto.

Estabilidad del CN⁻ en diferentes matrices

Al someter una concentración inicial de 1.000 µg de CN⁻ en 5 g de matriz, ya sea baya, zumo, glucosa 22% y agua, en condiciones igualitarias de pH y temperatura, se produjo una desaparición de las sales de cianuro.

Efecto de la acidez sobre el cianuro. La concentración del CN⁻, en medio acuoso acidulado (pH 3,7) y a una temperatura de 4°C, declinó en forma gradual y constante hasta los 150 min, tal como se observa en la Figura 1, de acuerdo a la regresión lineal:

$$C = 948,28 - 0,665t$$

donde:

C = µg CN⁻/5 g de matriz
t = minutos

En este caso particular, la única alternativa posible, es la formación de ácido cianhídrico, el cual pasa a la atmósfera, volatilizándose.

Estos resultados confrontados a los altos contenidos de ácidos libres que posee la uva (40 a 180 mg/kg) avalan la hipótesis, que, por lo menos, una parte del CN⁻ se degrada en esta forma.

Efecto de la glucosa sobre el cianuro. Al enfrentar CN⁻ con una solución de glucosa 22% acidulada, simulando el zumo de uva, a pH 3,7 y 4°C (Figura 1), se produjo un cambio sustancial en la conducta del CN⁻, en lo que respecta a la velocidad de decaimiento, siendo máxima en sus minutos iniciales de acuerdo al ajuste de los datos a una curva exponencial del tipo:

$$C_t = C_o e^{-kt}$$

donde:

C_t (concentración a tiempo t) = ug CN⁻/5 g matriz
C_o (concentración inicial) = µg CN⁻/5 g matriz
t (tiempo transcurrido) = minutos
k (constante de decaimiento) = 10,8 x 10⁻³(min⁻¹)

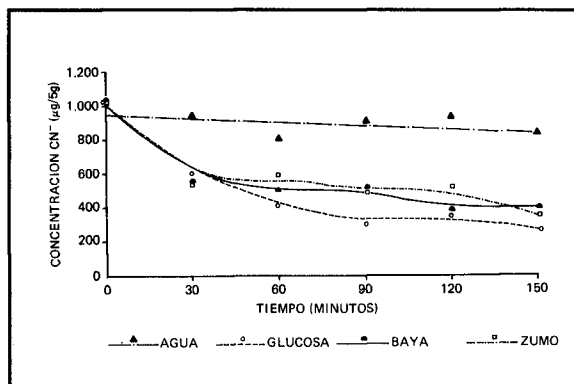


FIGURA 1. Cinética de degradación de CN⁻ en diferentes matrices a pH 3,7 y 4°C.

FIGURE 1. Kinetic degradation of cyanide in different matrices at pH 3.7 and 4°C.

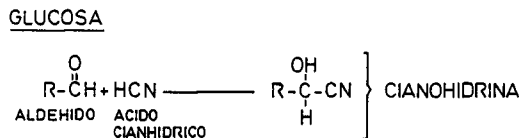
Esta ecuación indica que el CN⁻ reacciona con glucosa para formar cianohidrinás, en un sistema donde la concentración de la glucosa no influye, por su exceso en 361 veces, constituyendo así una reacción de pseudo primer orden, en la que la velocidad de decaimiento del CN⁻, depende solamente de su concentración, y que, experimentalmente, sigue una curva exponencial con las características señaladas.

$$dC/dt = -kC$$

donde:

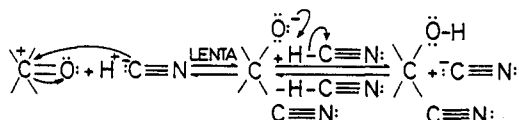
C = concentración
t = tiempo
k = constante de decaimiento.

Según Cram y Hammond (1963), el grupo carbonilo activo de la glucosa, frente al cianuro de hidrógeno, bajo determinadas condiciones, puede formar un compuesto de adición llamado cianohidrina:



La adición del CN^- en este caso es lenta porque el cianuro de hidrógeno es un nucleófilo débil. Pero cuando esta reacción se hace en presencia de cianuro de potasio, o cualquiera otra base que pueda generar iones CN^- , se produce un notable aumento en la velocidad de la reacción (Labworth, 1903, citado por Solomons, 1988).

Una vez que la adición del CN^- ha tomado lugar, el ataque se hace autocatalítico, el átomo de oxígeno del alcóxido, fuertemente básico, remueve el protón del cianuro de hidrógeno, dejando libre el ion CN^- que participa en el ataque nucleofílico (Solomons, 1988):



Interacción uva y cianuro. Al hacer reaccionar el CN^- y la uva, ya sea directamente en el zumo o inyectado en el interior de las bayas, y analizar el CN^- residual a través del tiempo, predominó la cinética, que corresponde a la formación de cianohidrininas, representada por curvas exponenciales, sin descartar, también, que una parte del CN^- se pudo volatilizar por acción de los ácidos de la uva.

La distinta trayectoria observada en las curvas exponenciales, de igual tipo a la de glucosa, se expresa a través de las constantes de decaimiento;

donde:

$$k \text{ (para bayas)} = 6,92 \times 10^{-3} (\text{min}^{-1})$$

$$k \text{ (para zumo)} = 6,16 \times 10^{-3} (\text{min}^{-1})$$

En general, las tres curvas exponenciales (bayas, zumo y glucosa), matrices que tienen como factor común poseer grupos carbonilos electrofílicos activos, se diferenciaron en sus respectivas constantes de decaimiento, siendo distinta la que corresponde a la matriz de glucosa acidulada.

Degradación de cianuro de potasio en bayas de uva a 0°C durante 14 días. La uva inyectada con una concentración de 960 μg de CN^- y guardada a 0°C durante 14 días, mostró una concentración final de 1 $\mu\text{g}/5 \text{ g}$ (Figura 2). La ecuación de decaimiento estuvo representada por una ecuación exponencial, donde: $k = 0,34 \times 10^{-3} (\text{min}^{-1})$ que es aproximadamente, 20 veces inferior a la constante de

decaimiento a 4°C. Esto significa que el proceso es fuertemente afectado por la temperatura a la cual ocurren las reacciones.

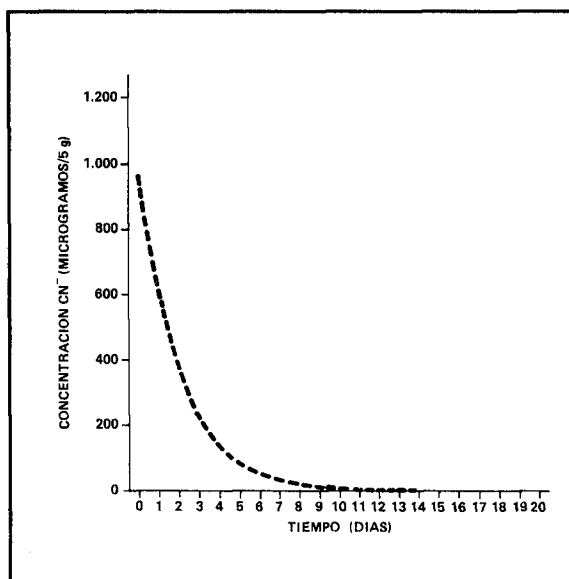


FIGURA 2. Curva de decaimiento del cianuro en uva a 0°C.

FIGURE 2. Decay curve of cyanide in table grapes at 0°C.

CONCLUSIONES

- Intencionalmente es posible contaminar bayas de uva en concentraciones de solución no superiores a 1 mg de CN^- por 5 g de fruta, utilizando KCN como fuente contaminante.
- Las sales de cianuro en contacto con pulpa o zumo de uva reaccionan siguiendo dos vías degradativas (la formación de ácido cianhídrico y formación de cianohidrininas), que se manifiestan cinéticamente a través de dos posibles mecanismos de reacción, uno lineal y otro exponencial. Experimentalmente, el efecto de la glucosa, baya y zumo de uva sobre el CN^- , se manifestó de forma exponencial, en ecuaciones del tipo

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

- La cinética exponencial significa que el CN^- , en un ataque nucleofílico sobre los azúcares de la uva, genera cianohidrininas, reacción autocatalítica influenciada fuertemente por la temperatura.
- Estos estudios cinéticos permiten inferir que sólo bajo condiciones ambientales conocidas, es posible predecir la concentración de cianuro residual en el interior de las bayas de uva.

RESUMEN

La posible contaminación de bayas de uva con sales de cianuro, motivó que el Laboratorio Central de Contaminantes y Alimentos de la Estación Experimental La Platina (INIA), realizara un estudio tendiente a dilucidar el comportamiento y persistencia de este tóxico en la fruta.

En dicho estudio se comprobó que la persistencia del veneno por equilibrio químico, depende de la concentración inicial del CN⁻, actividad química de los reaccionantes y, fundamentalmente, de la temperatura bajo la cual se llevan a cabo estas reacciones.

También se pudo validar que, al revisar los constituyentes químicos activos de la uva, se distinguen, ácidos orgánicos, que en medio acuoso participan en reacciones del tipo ácido-base transfiriendo un protón, transformando el KCN en HCN, que sería rápidamente disipado en la pulpa. Azúcares, que contienen grupos carbonilos electrofílicos, que reaccionan con el CN⁻ para dar compuestos de adición llamados cianohidrinás.

Constituyentes de la uva, como los ácidos orgánicos y los azúcares, fueron sometidos a estudio, al forzar al ion CN⁻ a manifestar su cinética de degradación en: bayas, zumo, solución glucosa 22% y agua, todos a pH 3,7 y 4°C, midiéndola además, a diferentes tiempos, de 0 a 150 minutos.

Los resultados indican que el CN⁻, en solución ácida, decae en forma lineal de acuerdo al siguiente modelo:

$$C = 948 - 0,665t$$

El CN⁻ tiene una conducta similar en bayas, zumo y glucosa ácida y presenta una cinética que obedece a una reacción de pseudo primer orden, del tipo:

$$C_t = C_o e^{-kt}$$

ecuación que con respecto a la lineal (formación de ácido cianhídrico), demuestra la formación de cianohidrinás.

LITERATURA CITADA

CRAM, D.J. y HAMMOND, G.S. 1963. Química Orgánica. Primera Ed. McGraw. Hill Book, New York, EE.UU. 166 p.

MERCK, E. 1974. Cyanide. Frankfurter St. 250 D-6100. Darmstadt, Germany.

SOLOMONS, T.W.G. 1988. Organic Chemistry. Fourth Edition. Wiley John Willey & sons. New York EE.UU. 760 p.

YUFERA, E.P. 1979. Química Agrícola III Alimentos. Primera Ed. Alhambra S.A. Madrid, España. 295 p.