



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

FACULTAD DE QUIMICA

CUAUTITLAN

U. N. A. M.

BUSQUEDA DE UN METODO ADECUADO DE CUANTIFICACION DEL GLUCOSIDO CIANOGENICO CONTENIDO EN ALGUNAS VARIEDADES DE FRIJOL MEXICANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :
FELIPE MENDOZA PEREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO:

Presidente: Dr. Jacques Ades Totah

Vocal : M.en C. Abel Siprián Carrasco

Secretario: I.B.Q. Pascasio Vargas Castillo

1^{er} Suplente: Q.F.I. Andrea A. Becerril Osnaya

2^{do} Suplente: Q. Consuelo Yepes Izquierdo

INDICE

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOS

Investigación Cualitativa

Método de Guignard

Investigación Cuantitativa

Método Alcalino

Método Acido

Método Colorimétrico

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

Actualmente se conoce una gran variedad de principios tóxicos en semillas de leguminosas de diferentes especies. En algunos casos tales factores son conocidos desde el punto de vista químico; por ejemplo, se demostró la presencia de ácido cianhídrico, alcaloides, etc., en algunos granos (2,8,29,34).

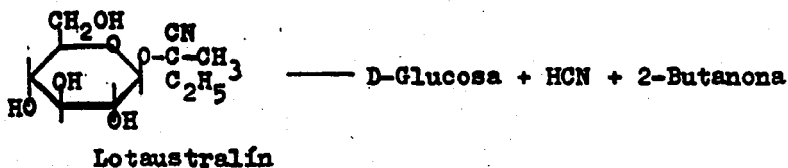
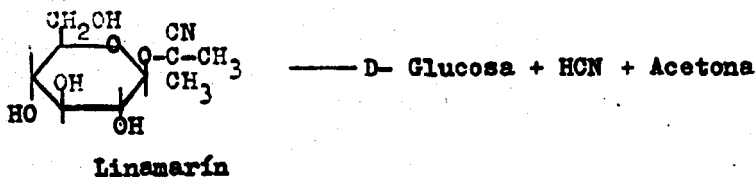
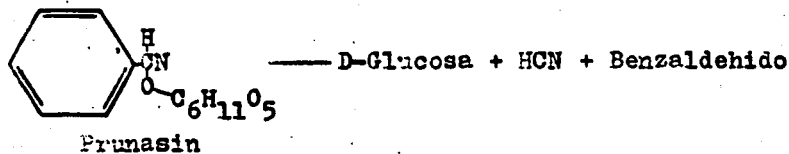
Estos principios resisten el calor, y por lo tanto, al cocinar el material en estudio, no desaparece la toxicidad causada por ellos, a menos que hayan sido extraídos por el agua de cocción (11).

Los glucósidos cianogénicos son un grupo de substancias potencialmente tóxicas que se encuentran en el grupo de las rosáceas. Estos pueden ser definidos químicamente como glucósidos de hidroxinitrilos (cianohidrinas). Los glucósidos cianogénicos liberan ácido cianhídrico al tratarlos con ácidos diluidos a temperaturas elevadas. Sin embargo el fenómeno de cianogénesis, la producción de ácido cianhídrico a partir de estos compuestos, se debe usualmente a la acción de enzimas presentes en los tejidos de las plantas. La acción de estas enzimas es iniciada por la destrucción mecánica de la estructura celular de las plantas (10).

Así una gran variedad de plantas son potencialmente tóxicas debido a la liberación de ácido cianhídrico ocasionada por la hidrólisis enzimática, que se lleva a cabo cuando entran en contacto el glucósido cianogénico y el sistema enzimático. En este sentido se pueden mencionar algunas plantas comunmente consumidas por el hombre y los animales domésticos: la mandioca (yuca), caña de azucar, sorgo y frijol de lima (10,34).

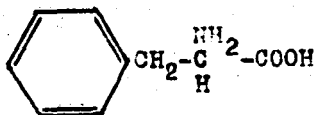
Se ha reportado que el sistema enzimático de emulsina, aislado de almendras, presenta al menos tres actividades enzimáticas sobre los glucósidos cianogénicos. La primera convierte el diglucósido amigdalín en el monoglucósido prunasín (amigdalín liasa), el cual es hidrolizado por la segunda (prunasín liasa) para dar aglicona y glucosa. La tercera actividad cataliza la disociación de la aglicona a cianuro de hidrógeno y benzaldehído (24).

En la siguiente figura se muestra la estructura de algunos glucósidos cianogénicos y sus productos de hidrólisis.

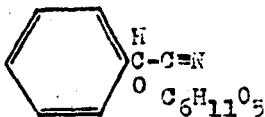


La parte de la planta que contiene el glucósido, así como la cantidad de HCN que se libera por una muestra dada de tejido de la misma son extremadamente variables y por esto se debe hacer un estudio cuidadoso antes de descartar la presencia del compuesto. La proporción de glucósido en una planta, varía con el suelo, clima, localización geográfica así como con la edad de la planta (1).

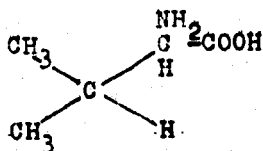
Algunos laboratorios han demostrado en la biosíntesis de los glucósidos un producto precursor de las agliconas de algunos glucósidos cianogénicos. La relación se muestra en la siguiente figura.



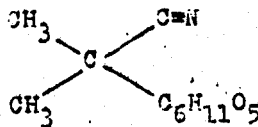
L-Fenilalanina



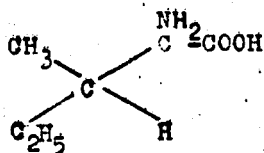
Prunasin



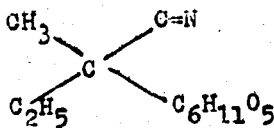
L-Valina



Linamarin

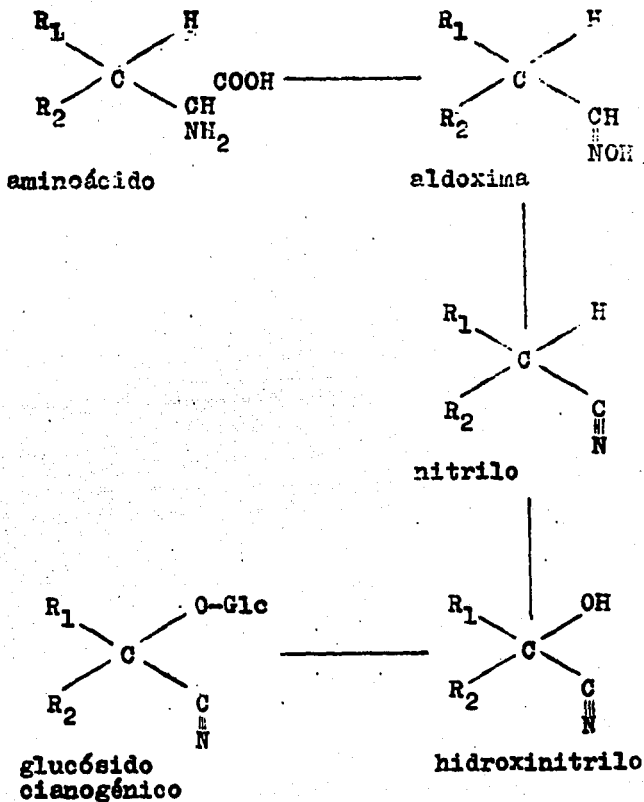


L-Isoleucina



Lotaustralin

El experimento consiste en dar los aminoácidos marcados en uno o más átomos de carbono (^{14}C) a plantas cianogénicas y medir la incorporación del isótopo en la mitad aglicona del glucósido, después de un período de metabolismo. La biosíntesis postulada de los glucósidos se ilustra en la siguiente figura.



Si los compuestos ilustrados en la figura anterior son los intermediarios, la presencia de éstos - podría ser detectada, sin embargo esto no ha sido posible. La imposibilidad de la detección puede ser debida a que los métodos analíticos empleados no son suficientemente sensibles a cantidades muy pequeñas de los intermediarios. Otras posibilidades son que los intermediarios permanezcan unidos sobre la superficie del sistema enzimático que lleva a cabo la biosíntesis del glucósido cianogénico, o que estas sustancias sean inestables.

La función que los glucósidos cianogénicos - desempeñan en la planta ha sido hasta ahora desconocida. Sin embargo, se les han asignado funciones de reserva - de nitrógeno, precursores para síntesis de proteínas y sustancias que protegen al tejido de la planta. Actualmente se cree que actúan como precursores en la síntesis de asparagina, encontrándose fuertes evidencias de esto último (6).

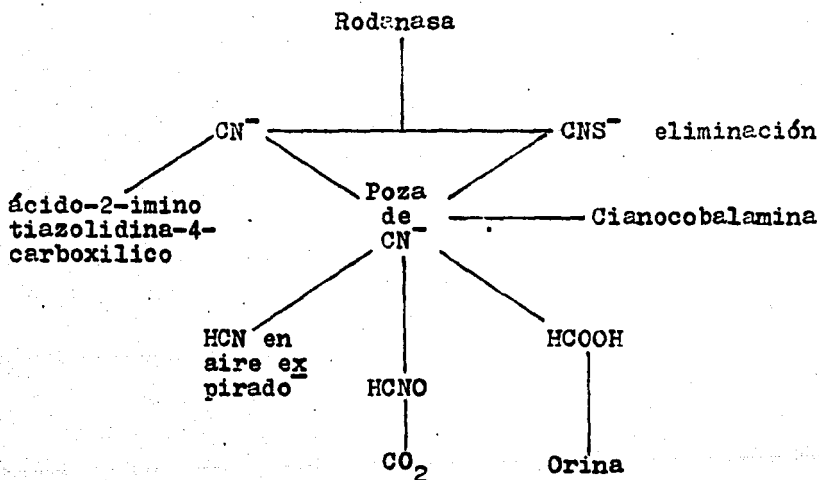
Los efectos que sufren las personas debido al consumo de plantas que contienen el glucósido cianogénico pueden manifestarse como dos formas de intoxicación. La primera puede ser una intoxicación de tipo agudo. Esta se presenta cuando se ingieren cantidades apreciables de ácido cianhídrico, el cual actúa deteniendo la oxidación en las mitocondrias, por inhibición del transporte de electrones del citocromo aa_3 al oxígeno. Los síntomas aparecen rápidamente y son: dolor de cabeza, inconciencia, convulsiones y cesamiento de la respiración como resultado de la parálisis del centro respiratorio en el cerebro. A concentraciones menores se -

pueden presentar los siguientes síntomas: irritación de la garganta, palpitaciones, dificultad en la respiración, lagrimeo, salivación, dolores de cabeza, debilidad de los brazos y piernas, seguidos por colapso y convulsiones (38,40).

La segunda forma de intoxicación es la crónica, manifestándose en bocio y/o ataxia neuropática. Algunos autores sugieren que el efecto es debido a la conversión de cianuro a tiocianato, teniendo éste acción inhibitoria sobre el yoduro (I^-). Sin embargo, los efectos parecen estar complicados por otros factores de la planta (presencia de sustancias con efecto goitrógeno), además del ácido cianhídrico. Algunos estudios en los cuales se administra tiocianato (SCN^-) a ratas, concluyen que debido al marcado incremento en la concentración de tiocianato en plasma, el metabolismo de yoduro en la glándula tiroides es parcial o totalmente bloqueado. En estos mismos estadios se ha observado que el tiocianato es excretado muy lentamente en orina debido a que su velocidad catabólica es lenta. Interpolando los datos anteriores han surgido hipótesis que sugieren que la ingestión prolongada de alimentos que contienen precursores de tiocianato incrementan la concentración de este en plasma y subsecuentemente debe observarse una reducción persistente en el metabolismo de yoduro en la glándula tiroides. Sin embargo esto está en desacuerdo con los elevados valores de metabolismo de yodo marcado radioactivamente encontrado en áreas endémicas de bocio (6,7,14,16,18,26,27,33,47).

El organismo cuenta con mecanismos de detoxificación que le permiten eliminar dosis subletales de

ácido cianhídrico (HCN), parte como tiocianato en la orina, parte como bióxido de carbono y parte como formate, además el HCN puede participar en la formación de otros compuestos en forma mínima (cianocobalamina, colina, metionina, y alantoina); otro camino metabólico de menor importancia es la combinación con cistina para formar el ácido 2-iminotiazilidina-4-carboxílico. Uno de los mecanismos mas empleados por el organismo para la destoxificación de cianuro es la conversión enzimática de este a tiocianato. Este proceso se lleva a cabo en presencia de tiosulfato y se debe a la enzima rodanasa, enzima que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo en cantidades elevadas. De hecho, cabe atribuir la elevada toxicidad de pequeñas dosis de cianuro a la escasa concentración de azufre, que sólo se aprovecha en forma coloidal o de tiosulfato. En la siguiente figura se ilustra el metabolismo de cianuro.



El tratamiento de la intoxicación por cianuro se basa en el hecho de que el ión ferroso Fe^{+2} de la metahemoglobina compite con la citocromo oxidasa por el tóxico; aunque en esta competencia el primero tiene menor afinidad por el cianuro que la segunda, además la presencia de 100 a 1000 veces más metahemoglobina que citocromo oxidasa en el organismo inclina la balanza a favor del ión Fe de la primera. Así la terapéutica de la intoxicación con cianuro consiste en aumentar la concentración de metahemoglobina en el organismo, lo que se logra administrando nitrito de sodio; una vez que la metahemoglobina ha desplazado al cianuro de la citocromo oxidasa, formando la cianometahemoglobina, se administra tiosulfato de sodio por vía intravenosa. El tiosulfato se combina ávidamente con el cianuro, disociándolo de la metahemoglobina y formando tiocianato, un compuesto 200 veces menos tóxico que se elimina por la orina.

La parte crítica del tratamiento es la formación de una cantidad suficiente de metahemoglobina con nitrito, ya que al mismo tiempo se requieren conservar concentración y estructura normal de la hemoglobina para que desempeñe su función respiratoria; en condiciones experimentales se ha protegido a perros contra una dosis 20 veces mayor que la dosis letal media (DL_{50}) si previamente se les ha tratado con nitrito y tiosulfato (36,39).

A N T E C E D E N T E S

A principios del siglo XIX se descubre en los tejidos de especies de *Prunus* la presencia de un glucósido que es capaz de hidrolizarse en ácido cianhídrico y otros productos.

El glucósido puede estar en semillas tales como almendras amargas, frijoles, forrajes, etc. (24). En particular, la teoría de la acción de enzimas sobre el glucósido amigdalín fue enunciado por Durstun y Henry, en ésta la cinética de producción de mandelonitrilo y ácido cianhídrico de amigdalín por la acción de glucosidasa favorece la posibilidad de que tres diferentes enzimas están involucradas, cada una específica para un estado hidrolítico. Tales enzimas son amigdalín liasa, prunasín liasa e hidroxinitril liasa. El desarrollo de la cinética, empleando amigdalín y diferentes concentraciones de la enzima glucosidasa, parece indicar una fase de adaptación de más de una hora antes de que aparezcan cantidades apreciables de ácido cianhídrico, después de lo cual, la concentración se incrementará hasta que se alcance el equilibrio.

La cantidad de cianuro de hidrógeno que se produce por el glucósido puede ser determinado en tres estados:

- El primer estado es la hidrólisis del glucósido cianogénico, en éste se aprovecha el hecho de que este glucósido es hidrolizado a prunasín y glucosa, el prunasín es entonces hidrolizado a mandelonitrilo y glucosa, y finalmente el mandelonitrilo es hidrolizado a benzaldehído y ácido cianhídrico.

Por esto, en el primer estado, la cantidad de amigdalín hidrolizado es equivalente a la glucosa producida. Sin embargo cada mol de glucosa es acompañada por una mol de prunasín, algo del cual es hidrolizado posteriormente a más glucosa y su equivalente molecular de mandelonitrilo. Así, el grado de hidrólisis de amigdalín puede ser calculado a partir del número de moles de glucosa menos el número de moles de mandelonitrilo producidos durante la acción de la enzima. El grado de hidrólisis de prunasín puede ser calculado directamente de la cantidad de mandelonitrilo o glucosa producidos durante la acción de glucosidasa sobre el prunasín puro. Similarmente la hidrólisis enzimática de mandelonitrilo puede ser estimada del HCN producido.

- En cuanto al segundo estado podemos mencionar que la destilación es un paso importante, ya que muchas sustancias que interfieren son eliminadas, además de que con este procedimiento se produce la conversión de cianuro complejo en cianuro de sodio simple el cual puede ser fácilmente medido por titulación o colorimetría.

- En el tercer estado existen multitud de pruebas que pueden ser aplicadas en la determinación de cianuro. La elección de estas dependerá de la concentración de cianuro presente en la muestra y la rapidez en la determinación de cianuro en ésta (4,5,9,12,13,15,17,19,20-22, 25,28,30,32,35,37,38,40-46).

O B J E T I V O S

En el presente trabajo se analizará si la elección de un método de cuantificación tiene efecto en la determinación cuantitativa de cianuro de hidrógeno contenido en una variedad de frijol.

Para este fin se emplearán:

- Técnica Cualitativa. La técnica cualitativa es la sugerida por Guignard. Este método sólo nos ayudará a determinar si una variedad determinada de frijol es capaz de liberar cianuro de hidrógeno como resultado del daño mecánico producido a la semilla, lo cual evidenciará la presencia del glucósido cianogénico y el complejo enzimático amigdalín. En esta determinación sólo se analizará la liberación de cianuro en una categoría de plantas. Las categorías pueden ser:

1. Plantas que tienen el glucósido y la enzima
2. Plantas que tienen sólo el glucósido
3. Plantas que tienen sólo la enzima
4. Plantas que carecen de glucósido y enzima. En esta categoría estarían las semillas que, como resultado de los fumigantes usados para evitar su contaminación, tuvieran cianuro exógeno.

La categoría que nos interesa es la de plantas que tienen el glucósido y la enzima. El que la semilla contenga la enzima y el glucósido cianogénico es una condición sin la cual el fenómeno de cianogénesis no se lleva a cabo en condiciones normales.

- Dos técnicas oficiales, aquellas recomendadas por

la "Association of Official Analytical Chemists", -
A.O.A.C. (35). Estas dos técnicas (ácida y alcalina) -
son volumétricas y difieren en que en la alcalina la de-
terminación es directa, en tanto que en la ácida es por
retroceso. La técnica alcalina es una modificación del -
método de Liebig (Liebig-Donigés), en la cual la deter-
minación se hace en presencia de un agente complejante
(amoníaco).

- Técnica colorimétrica de Aldrige (25). La sensi-
bilidad de esta prueba es mayor que la de las pruebas -
volumétricas, con lo cual se pueden determinar cantida-
des pequeñas de cianuro contenido en el frijol.

INVESTIGACION CUALITATIVA

METODO DEL ACIDO PICRICO

BASE DEL METODO

Los cianuros dan coloración rojo oscuro con la sal alcalina de ácido isopurpúrico en solución de picrato alcalina. En la ausencia de sustancias tales como - aldehidos, acetona y sulfuro de hidrógeno, que dan una - reacción similar, esta prueba es aplicable cuantitativamente. La prueba se puede aplicar a la determinación de 0.08 mg de cianuro en 25 ml con una exactitud del 2%. El color se desarrolla lentamente a temperatura ambiente, - obteniéndose la máxima intensidad en menos de 10 minutos. El color permanece sin alteración después de dos meses.

SOLUCIONES

- 1) Ac. pícrico 1% (p/v, sol. acuosa)
- 2) Carbonato de sodio 10% (p/v, sol. acuosa)

PREPARACION DEL PAPEL REACTIVO

Se prepara sumergiendo tiras de papel filtro - (Whatman No. 1) de 3 x 0.5 centímetros en la solución de ácido pícrico, se dejan secar a temperatura ambiente, - después se humedecen con la solución de carbonato de sodio y nuevamente se dejan secar a temperatura ambiente.

El papel reactivo puede ser preparado cuando - más una semana antes de su uso. Cuando el papel ha permanecido por más de este tiempo, se aconseja humedecer -

las tiras con agua en el momento de introducirlas en las botellas de prueba.

METODO

En una botella de 100 ml de capacidad, con tapón esmerilado, se colocan 10 gramos de la muestra finamente molida, se añaden de 10 a 20 ml de agua destilada y se agita para que toda la muestra quede completamente húmeda; se inserta inmediatamente una tira de papel reactivo en la botella, teniendo cuidado de que la tira no entre en contacto con la muestra ni con las paredes de la botella y se tapa ésta perfectamente con el tapón esmerilado. La botella se lleva a una temperatura de 30-35 °C.

El papel de picrato de sodio, inicialmente amarillo, gradualmente se torna anaranjado y finalmente rojo ó púrpura si los tejidos de la planta contienen glucósido cianogénico. Esta prueba es sensible (una gamma por mililitro) y la rapidez en el cambio de color depende de la cantidad de ácido cianhídrico presente.

INVESTIGACION CUANTITATIVA

METODO ALCALINO

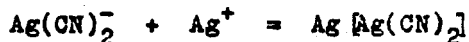
BASE DEL METODO

Para la discusión de este método se harán algunas consideraciones previas y después se demostrará que en la modificación del método de Liebig (Liebig-Denigés) se incrementa la sensibilidad en la determinación de cianuro con respecto al método original.

Considérese la siguiente reacción:



resulta en la formación de un complejo muy estable; el ión dicianoargentato. Casi coincidiendo con el punto de equivalencia estequiométrico de la titulación el ión plata (Ag^+) de la solución reacciona con $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ para formar la sal ligeramente soluble de $\text{Ag}_2\text{Ag}(\text{CN})_2$ de acuerdo con la siguiente reacción:



La turbidez resultante imparte a la solución señales del punto final de la titulación. La coincidencia del punto final y el punto de equivalencia se puede calcular de la siguiente manera:

La concentración de cianuro presente en el punto final de la titulación considerando la ausencia del precipitado de $\text{Ag}_2\text{Ag}(\text{CN})_2$ será



en el punto de equivalencia



de la primera y segunda ecuación

$$[\text{CN}^-]^3 \sqrt{2 [\text{Ag}(\text{CN})_2^-]} = K_c \quad \text{y} \quad [\text{Ag}(\text{CN})_2^-] = C$$

$$[\text{CN}^-] = \sqrt[3]{10^{-19.7} C}$$

$$[\text{CN}^-] = 10^{-6.56} \sqrt[3]{C} \quad (1)$$

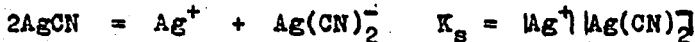
La concentración de ión cianuro en la cual empieza a aparecer el precipitado de plata es



del ión plata, o sea en el punto final, cuando AgCN está a punto de precipitar



La reacción global es



reordenando la constante de equilibrio de la ecuación anterior tenemos

$$K = K_s^2 / K_c$$

mediante este valor se puede determinar la concentración de cianuro en la cual empieza a aparecer el precipitado

$$K = [Ag^+] [Ag(CN)_2^-]$$

$$K_c = [Ag^+] [CN^-]^2 / [Ag(CN)_2^-]$$

combinando las dos últimas ecuaciones tenemos

$$[CN^-] = K_c / K [Ag(CN)_2^-]$$

$$[CN^-] = 10^{-8.6} C$$

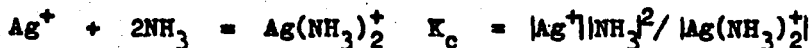
$$[CN^-] = 10^{-4.3} C \quad (2)$$

Comparando las ecuaciones (1) y (2) se observa que para un valor dado de C, la concentración de cianuro (no considerando precipitado), es menor que la concentración de cianuro en la cual empieza a aparecer el precipitado, esto quiere decir que antes de alcanzar el punto de equivalencia o sea a $[CN^-] = 10^{-6.56} \sqrt[3]{C}$, empezará a existir el precipitado cuando $[CN^-] = 10^{-4.3} C$, por lo que no se puede determinar de un modo preciso el punto final de la titulación.

Si ahora consideramos la modificación a este método, se podrá conocer de una manera más precisa el punto de equivalencia.

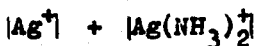
La presencia de un quelante (agente complejante), que forme un complejo soluble de plata, reduce la -

concentración efectiva de ión Ag^+ libre y de esta manera retarda su precipitación. Tal agente complejante puede ser amoníaco (NH_3):



Para producir un precipitado, la concentración de ión plata libre debe exceder $10^{-11.4} / [\text{Ag}(\text{CN})_2^-]$.

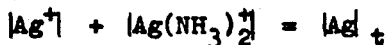
El complejo de cianuro es del orden de 10^{13} veces más estable que el complejo amino, de tal manera que este tiene poco efecto sobre el primero. Como primera aproximación, la concentración de ión plata que puede ser disponible para la complejación de cianuro es:



en el punto de equivalencia,

$$[\text{Ag}^+] \frac{1}{4} = 10^{-6.56} \sqrt[3]{\text{Ag}(\text{CN})_2^-}$$

esta concentración de plata es asumiendo ausencia de precipitación. Por lo tanto



$$[\text{Ag}^+] + [\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+] = 10^{-6.56} \sqrt[3]{\text{Ag}(\text{CN})_2^-}$$

como la concentración de ión plata, para la precipitación es $10^{-11.4} / [\text{Ag}(\text{CN})_2^-]$ podemos considerar que

$$[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+] = 10^{-6.56} \sqrt[3]{\text{Ag}(\text{CN})_2^-} \quad (3)$$

la concentración de ión amonio requerido para detener -
la precipitación hasta que el punto de equivalencia es -
alcanzado puede entonces ser calculada.

De la K_c para el complejo amina tenemos

$$[\text{NH}_3] = |\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+| / |\text{Ag}^+| 10^{-7.15}$$

de esta última ecuación junto con la (3)

$$[\text{NH}_3] = 10^{-6.56} \sqrt[3]{|\text{Ag}(\text{CN})_2^-| 10^{-7.15} |\text{Ag}(\text{CN})_2^-| / 10^{-11.4}}$$

la formación de precipitado es cuando

$$|\text{Ag}^+| = 10^{-11.4} / |\text{Ag}(\text{CN})_2^-|$$

la concentración del complejo amina será entonces

$$|\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+| = 10^{-4.25} / |\text{Ag}(\text{CN})_2^-| (0.25)^2$$

donde 0.25 es la concentración de NH_3 que comunmente se
emplea en condiciones experimentales. Reordenando la úl-
tima ecuación tenemos

$$|\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+| = 3.514 \times 10^{-6} / |\text{Ag}(\text{CN})_2^-|$$

la concentración de plata disponible será

$$|\text{Ag}^+| + |\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+| = 3.54 \times 10^{-6} / |\text{Ag}(\text{CN})_2^-|$$

por lo que

$$pAg = -\log(3.54 \times 10^{-6} / Ag(CN)_2^-)$$

El punto final de la titulación está ahora -
considerablemente después del punto de equivalencia, es-
to es a

$$pAg = -\log(10^{-6.86} \sqrt[3]{Ag(CN)_2^-})$$

Para restaurar el status quo, se puede adicio-
nar un anión el cual forme una sal de plata más insolu-
ble que el cianuro de plata, como por ejemplo el ión io-
duro (I^-), el cual forma una sal de plata de producto de
solubilidad 10^{-16} .

Para producir precipitación en el punto de e -
quivalencia, la concentración de ión plata disponible -
debe ser

$$[Ag^+] = 10^{-6.86} \sqrt[3]{Ag(CN)_2^-}$$

por lo que

$$[Ag^+] + [Ag(NH_3)_2^+] = 10^{-6.86} \sqrt[3]{Ag(CN)_2^-}$$

como

$$[Ag^+] < [Ag(NH_3)_2^+]$$

podemos despreciar la concentración de ión plata con -
respecto al complejo de plata, por lo tanto

$$[Ag(NH_3)_2^+] = 10^{-6.86} \sqrt[3]{Ag(CN)_2^-}$$

puesto que

$$[\text{NH}_3] = 0.25 \text{ M}$$

la concentración de plata es

$$[\text{Ag}^+] = 10^{-12.8} \sqrt[3]{\text{Ag}(\text{CN})_2}$$

la concentración de ión ioduro que se requiere es

$$[\text{I}^-] = K_s(\text{AgI}) / [\text{Ag}^+]$$

$$[\text{I}^-] = 10^{-3.2} / \sqrt[3]{\text{Ag}(\text{CN})_2}$$

SOLUCIONES

- 1) Hidróxido de sodio (0.5 g NaOH / 20 ml H₂O)
- 2) Hidróxido de amonio 6N
- 3) Ioduro de potasio 5% (p/v, sol. acuosa)
- 4) Nitrato de plata 0.02N
- 5) Silicona 50% (v/v, sol. alcohólica)

METODO

El dispositivo utilizado se muestra en la -
figura 1a. Se maceran de 10 a 20 gramos de la muestra y
se colocan en el matraz Kjeldahl con 200 ml de agua, se
mezcla y se deja por al menos dos horas (la autólisis -
se debe llevar a cabo con el aparato completamente co -
nectado para destilación). Se recolectan de 150 a 160 ml
de destilado en el matraz que contiene la solución de -
hidróxido de sodio y se diluye a 250 ml. Se toman ali -

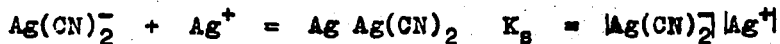
cuotas de 100 ml y se le adicionan 8 ml de hidróxido de amonio y 2 ml de la solución de ioduro de potasio. La mezcla se titula con la solución de nitrato de plata, utilizando una bureta de 10 ml. El punto final de la titulación es fácilmente reconocido por la turbidez permanente de la solución. El punto final es más fácilmente observado cuando se emplea un fondo negro.

La modificación a éste método se ilustra en la fig. 1b. La muestra (de 10 a 20 g) se coloca en el matraz de tres bocas con 200 ml de agua y se le adicionan 0.5 ml de antiespumante (silicona o 2-octanol). Se recolectan en el matraz que contiene la solución de hidróxido de sodio de 150 a 160 ml de destilado, y se sigue el mismo procedimiento de la técnica original, empezando con la dilución a 250 ml.

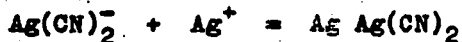
METODO ACIDO
BASE DEL METODO

El cianuro de hidrógeno se recolecta en una solución conteniendo nitrato de plata en exceso en medio ácido, la solución así obtenida y en la cual se forma un precipitado, se filtra en un crisol de Gooch, preparado con asbesto. El filtrado se titula con una solución de tiocianato de amonio, utilizando alumbre férrico como indicador.

Los equilibrios que se tienen son los siguientes



Al poner el destilado de cianuro de hidrógeno en contacto con la solución de plata en exceso se tienen los siguientes equilibrios:



la concentración total de plata y cianuro es

$$|\text{Ag(I)}|_t = |\text{Ag}^+| + |\text{Ag}(\text{CN})_2^-|$$

$$|\text{CN(I)}|_t = |\text{CN}^-| + 2|\text{Ag}(\text{CN})_2^-|$$

para el exceso de ión plata (Ag^+)

$$|\text{Ag(I)}|_t - |\text{CN(I)}|_t = |\text{Ag}^+_{\text{exceso}}|$$

$$|\text{Ag(I)}|_t - |\text{CN(I)}|_t = |\text{Ag}^+| - |\text{Ag}(\text{CN})_2^-| - |\text{CN}^-| = |\text{Ag}^+_e|$$

$$|\text{Ag}^+| - 10^{-16}/|\text{Ag}^+| - 10^{-11.2}/|\text{Ag}^+| = |\text{Ag}^+_e|$$

el segundo término de esta ecuación lo podemos considerar despreciable con respecto al tercero, por lo que

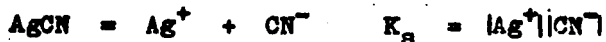
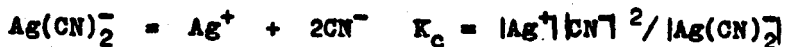
$$|\text{Ag}^+| - 10^{-11.2}/|\text{Ag}^+| = |\text{Ag}^+_e|$$

$$|\text{Ag}^+|^2 - |\text{Ag}^+||\text{Ag}^+_e| - 10^{-11.2} = 0$$

con esta ecuación podemos verificar que $|\text{Ag}^+_e|$ es suficiente para asegurar la precipitación del cianuro como $\text{Ag}|\text{Ag}(\text{CN})_2^-|$.

La presencia de ácido nos asegura que el complejo de plata formado sea destruido y se forme el precipitado de AgCN , de esta manera asegurando que no haya presente ión cianuro. Los equilibrios correspondientes son





la constante de equilibrio global es

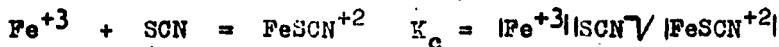
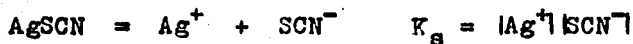
$$K = \frac{[\text{HCN}]}{[\text{H}^+][\text{Ag}(\text{CN})_2^-]}$$

reordenando la ecuación anterior llegamos a la siguiente relación

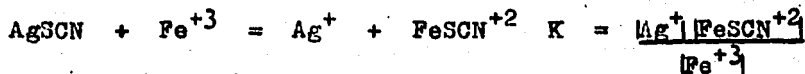
$$K = K_c / K_a K_s = 10^{-5}$$

esta ecuación nos indica que el equilibrio global está desplazado a la derecha, o que la concentración del complejo de plata es muy pequeña, estando la mayoría del ión cianuro en forma de precipitado.

El exceso de plata se titula con tiocianato de potasio, utilizando alúmbre férrico amoniacal como indicador. Los equilibrios que se establecen son los siguientes



el equilibrio global es



donde

$$K = K_s / K_c = 10^{-9.9}$$

esta última constante nos indica que en presencia de iones plata la reacción global está desplazada hacia la formación de AgSCN . Una vez que el ión plata haya desaparecido de la solución, o sea en el punto de equivalencia, el tiocianato que añadimos en exceso formará el complejo de tiocianato férrico (FeSCN^{+2}), que impartirá el color rojo a la solución.

SOLUCIONES

- 1) Nitrato de plata 0.02N
- 2) Acido nítrico concentrado
- 3) Tiocianato de potasio 0.02N
- 4) Alumbre férrico (sol. acuosa saturada)

METODO

El dispositivo utilizado se muestra en la fig. 1a. Se maceran de 10 a 20 gramos de la muestra y se colocan en el matraz Kjeldahl con 200 ml de agua, se mezcla y se deja por al menos dos horas. Se recolectan de 150 a 160 ml de destilado en el matraz que contiene 20 ml de la solución de nitrato de plata, acidificada con 1 ml de ácido nítrico. Cuando han pasado 150 ml de destilado, se filtra a través de un crisol de Gooch, lavando el matraz y el crisol con pequeñas cantidades de agua y se titula el exceso de nitrato de plata con la solu -

ción de tiocianato de potasio, utilizando alúmbre férri-
co como indicador.

La modificación a este método se ilustra en la
fig. 1b. La muestra se coloca en el matraz de tres bocas
con 200 ml de agua y se le adicionan 0.5 ml de antiespu-
mante (silicona ó 2-octanol). En el matraz que contiene
la solución de nitrato de plata se recolectan de 150 a -
160 ml de destilado y se sigue el mismo procedimiento de
la técnica original empezando con la dilución a 250 ml.

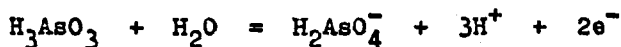
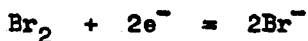
METODO COLORIMETRICO

BASE DEL METODO

El cianuro se determina por conversión de este a bromuro de cianógeno con solución de bromo saturada



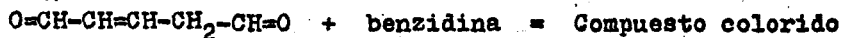
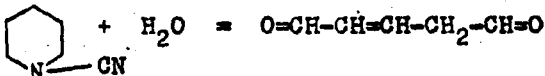
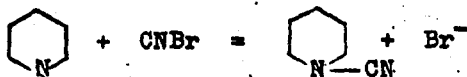
El exceso de bromo se elimina de la solución - con el ácido arsenioso, el cual en medio ácido establece el siguiente equilibrio



La reacción global es



El bromuro de cianógeno (CNBr) formado reacciona con la mezcla de piridina y benzidina



El pigmento es estable por lo menos 30 minutos entre 15 y 20 °C, y el cual sigue la ley de Beer-Lambert entre el límite de 0.2-2 microgramos de ión cianuro.

SOLUCIONES

1) Solución patrón de cianuro. Disolver 1.25 g de cianuro de potasio en 500 ml de agua. Esta solución se estandariza con nitrato de plata 0.01 N, y se ajusta la solución para que 1 ml contenga 1 mg de ión cianuro.

2) Solución trabajo de cianuro. Diluir 10 ml de la solución patrón de cianuro a 1 litro con agua, y a su vez se diluyen 10 ml de esta solución a 100 ml con agua (1 ml = 1 microgramo de ión cianuro). Esta solución se prepara en el momento de usarse.

3) Acido acético 2N.

4) Agua de bromo (sol. saturada)

5) Acido arsenioso 2% (p/v, sol. acuosa)

6) Piridina 60% (v/v, sol. acuosa)

7) Benzidina. Se disuelven 5 g de hidrocloreuro de benzidina en 100 ml de agua, conteniendo 2 ml de ácido clorhídrico concentrado. Esta solución se prepara en el momento de usarse.

METODO

Curva de calibración. Se miden las cantidades apropiadas de la solución trabajo de cianuro, de tal manera que se cubra el rango de 0 a 2 mg. Cada solución se trata como sigue:

Se diluye con agua a 2 ml, se acidifica con ácido acético 2N, se adicionan 2 ml de agua de bromo, se

mezcla y se añaden 0.2 ml de la solución de ácido arsenioso. Se pasa una corriente de aire a través de la boca de los tubos para remover cualquier residuo de bromo. Aparte se mezclan 3 ml de la solución de piridina con 0.6 ml de la solución de benzidina, se adiciona esta mezcla a cada tubo y se diluye a 10 ml con agua destilada. Se tapa el tubo (con una canica) y se mezcla, la mezcla debe permanecer en la obscuridad de 25 a 30 minutos entre 15 y 20 °C.

Se mide la densidad óptica de cada solución - contra el blanco (solución que no contiene cianuro) en - una celda de 1 cm empleando una longitud de onda de 520 nanómetros. Se construye una gráfica que relacione densidad óptica y el número de microgramos de cianuro. Una curva de calibración típica se muestra en la figura 4.

Tratamiento de la muestra. Se transfieren 2 ml de la muestra, ajustada por dilución (si esto fuera necesario) de tal manera que no contenga más de 2 µg de cianuro y se trata como se describió en curva de calibración, comenzando con la acidificación. La cantidad de cianuro se determina por medio de la ecuación obtenida mediante el análisis de regresión (mínimos cuadrados) de la curva de calibración.

RESULTADOS

ENSAYO CUALITATIVO

Se examinaron 75 muestras que corresponden a - 45 variedades diferentes de frijol. Los resultados obtenidos al determinar la presencia de glucósidos cianogénicos por el método de Guignard se muestra a continuación

Phaseolus vulgaris	Cianuro	Oxalato de calcio
1. Alubia	(-)	(+)
2. Alubia grande	(-)	(+)
3. Alubia negra	(-)	(+)
4. Apetito blanco	(-)	(+)
5. Azibush	(-)	(+)
6. Bayo	(-)	(+)
7. Bayo gordo	(-)	(+)
8. Bayocote higuerrillo	(-)	(+)
9. Bayocote negro	(-)	(+)
10. Bayocote rojo	(-)	(+)
11. Bayocote tinto	(-)	(+)
12. Cacahuata	(-)	(+)
13. Canario	(-)	(+)
14. China	(-)	(+)
15. Coconita	(-)	(+)
16. Delicias	(-)	(+)
17. Ejote canario	(-)	(+)
18. Esparza	(-)	(+)

19. Flor de mayo	(-)	(+)
20. Garbancillo	(-)	(+)
21. Garbancillo blanco	(-)	(+)
22. Higuerrillo	(-)	(+)
23. Jamapa	(-)	(+)
24. Mantequilla	(-)	(+)
25. Moro	(-)	(+)
26. Negro	(-)	(+)
27. Negro querétaro	(-)	(+)
28. Negro veracruz	(-)	(+)
29. Pasilla	(-)	(+)
30. Payo	(-)	(+)
31. Pinto	(-)	(+)
32. Pinto (ojo de liebre)	(-)	(+)
33. Popular	(-)	(+)
34. Puebla	(-)	(+)
35. Rosita	(-)	(+)
36. Rosado	(-)	(+)
37. San Francisco	(-)	(+)
38. Soya	(-)	(+)
39. Vaquita	(-)	(+)

Phaseolus coccineus

1. Acalete	(-)	(+)
2. Ayocote	(-)	(+)

Phaseolus acutifolius

1. Esmonite	(-)	(+)
-------------	-----	-----

Phaseolus lunatus

1. Comba	(+)	(-)
2. Patashete (híbrido)	(+)	(-)
3. Patashete (negro)	(+)	(-)

Como se observa en los resultados anteriores - solo en tres variedades se detectó la presencia de cianuro. Los resultados obtenidos se pueden tomar como confiables, ya que para una misma variedad se examinaron diferentes muestras de procedencia distinta. Esto asegura un mejor muestreo, lo que implica una mejor estimación de la presencia de cianuro en una variedad determinada.

También se determinó la presencia de oxalato de calcio. Por los resultados obtenidos podemos sugerir la existencia de correlación entre la presencia de cristales de oxalato de calcio y el contenido de glucósidos cianogénicos. En tres de la cuarenta y cinco variedades probadas, en las cuales se detectó la presencia de glucósidos cianogénicos, carecen (por observación microscópica de la cáscara de frijol) de los cristales, en tanto que las variedades que muestran ausencia de cianuro presentan grandes cantidades de cristales de oxalato de calcio.

ENSAYO CUANTITATIVO

Los resultados de la investigación cuantitativa se presentan a continuación:

- En un ensayo preliminar se empleó la técnica sugerida por la A.O.A.C (método alcalino), mencionada antes y la modificación a ésta.

Los resultados de este ensayo preliminar son:

Tabla I

Variedad de frijol	Miligramos de HCN/100 g de frijol	
	Técnica sugerida A.O.A.C.	Técnica modificada A.O.A.C.
Comba	14.20	14.12
Patashete ¹	8.10	9.45
Patashete ²	11.30	10.85

Los resultados son el promedio de cinco diferentes destilaciones.

¹Variedad negra

²Variedad híbrida

- Para el estudio comparativo se utilizó la variedad de patashete híbrida. Los resultados de cada técnica con el respectivo análisis estadístico, se presentan en la tabla II. En la primera columna se muestra el peso -

promedio de frijol empleado en cinco diferentes experimentos, en las columnas dos y tres se da la desviación y el error estandar respectivamente, de la determinación. En la tercera columna se dan los miligramos de ácido cianhídrico obtenidos en cinco diferentes experimentos, esta cantidad corresponde a los miligramos de HCN contenidos en el peso de frijol promedio indicado en la primera columna. En las columnas cinco y seis se da la desviación y el error estandar de esta determinación. En la columna siete se reporta la cantidad, en miligramos de ácido cianhídrico, contenida en cien gramos de frijol, obtenida en cinco diferentes destilaciones. En las columnas ocho y nueve se da el error y la desviación estandar respectivamente, de este resultado.

En la tabla III se muestra el análisis de significancia de todas las combinaciones posibles entre los métodos oficiales y las modificaciones, y por otra parte entre las diferentes técnicas. Para este análisis se empleó la prueba de Student (t), la prueba de F (F) y la de Man Whitney (U):

En la tabla IV se muestra el análisis de significancia de los datos de la tabla III. Como se observa en ningún caso la P fue menor al nivel de significancia escogido (0.05), por lo que la elección de el método para la determinación de cianuro contenido en la muestra es independiente de la cantidad de éste en la misma.

En la figura 3 se muestra el contenido de cianuro de hidrógeno por 100 gramos de frijol, determinado por las diferentes técnicas empleadas.

D I S C U S I O N

En los antecedentes se mencionó que la determinación cuantitativa de cianuro depende de tres estados químicos posibles. Las dificultades en la determinación de cianuro se presentan en los dos primeros estados, puesto que existen muchas técnicas para la determinación de cianuro libre (no glucosídico).

El primer estado presenta una hidrólisis o autólisis (por enzima endógena), así la efectividad del mismo está limitada por la posibilidad de una hidrólisis incompleta y la formación concomitante de amoniaco y amidas. Esto se debe posiblemente a la variación en la actividad de la enzima endógena, y a los largos periodos de incubación necesarios para la hidrólisis del glucósido, con lo que probablemente se incurre en errores a reacciones laterales que pueden secuestrar el cianuro liberado y por esto minimizado. Se ha detectado actividad de rodanasa y cianoalanina sintetasa en mandioca, y estas pueden causar la pérdida de cianuro durante los largos periodos de incubación usados en los métodos autolíticos de ensayo (12). El aislamiento de cianuro del subtrato, una vez que se ha llevado a cabo la autólisis del glucósido cianogénico, es una operación tediosa susceptible de artefactos.

En el presente trabajo se analizó el producto obtenido, después de haber pasado por los dos primeros estados, es decir autólisis y la separación del producto del subtrato.

No obstante lo mencionado al inicio de esta -

discusión acerca de las dificultades que presentan los - dos primeros estados, pensamos que bajo las mismas con - diciones de obtención de cianuro (tiempo de incubación y cantidades similares de muestra) en las diferentes técni - cas, la comparación de la precisión de estas en la deter - minación de cianuro libre debe evidenciar alguna dife - rencia (si la hay) en cuanto a la sensibilidad de los - métodos empleados.

La manera en la cual analizamos el cianuro no - dicerne el cianuro unido (glucosídico) del cianuro li - bre (no glucosídico), unicamente determinamos la canti - dad total obtenida después de la autólisis (por enzima - endógena) y separación del cianuro por arrastre con va - por.

No obstante lo tedioso que pueda resultar el - método de extracción (destilación por arrastre con va - por), la importancia de éste debe ser enfatizada, ya que este paso no solo aísla cianuro de muchas interferencias sino que resulta en la conversión de muchos complejos de cianuro en compuestos simples facilmente medibles por - pruebas colorimétricas o de titulación. En particular - las pruebas colorimétricas son sensibles a la capacidad amortiguadora de la muestra, por ejemplo, la reacción co - lorida con piridín-pirazolona es reproducible en un ran - go de pH de 3 a 8, por lo que una capacidad amortiguado - ra significativa, definitivamente disminuye el rango de pH efectivo. Por esto la destilación es necesaria para - aislar compuestos que tienen capacidad amortiguadora.

Por otra parte, todos los cianuros simples con la fórmula general $M(CN)_x$, donde M es el metal y x repre - senta el número de grupos CN^- y los complejos de cianuro

de cinc, cadmio, níquel y plata son fácilmente destilados por cualquiera de los procedimientos descritos. En general se logra una recuperación de cianuro mayor a 95% cuando se realizan obtenciones de cianuro añadido al sistema de destilación.

Existen complejos, como los ferri y ferrocianuros, que requieren un mayor tiempo de destilación, sin embargo, cualquier método de este tipo producirá una recuperación elevada de cianuro libre.

Los cobalticianuros son los compuestos de cianuro más estables encontrados, por lo que aún en periodos largos de destilación, la recuperación de cianuro de estos compuestos es mínima.

Los resultados obtenidos demuestran que las diferencias entre las técnicas con sus modificaciones y entre las diferentes técnicas no son estadísticamente significativas, sin embargo, haciendo un análisis de cada técnica en particular, nos conduce a la elección del método adecuado para la mejor determinación de cianuro de hidrógeno.

Podemos ennumerar algunas de las características que una técnica debe presentar para que pueda ser adoptada:

1. Que sea fácilmente reproducible.
2. Que sea específica para la determinación de un compuesto en particular.
3. Que sea de fácil ejecución.
4. Que sea de bajo costo.
5. Que sea lo suficientemente sensible.

Con respecto al Método Cualitativo podemos decir que tiene alto grado de sensibilidad, es de bajo cos

to y de fácil ejecución, aunque se ha descrito que el sulfuro de hidrógeno, acetona y aldehidos dan una reacción similar (41).

El método alcalino es una técnica de fácil ejecución, sensible en la determinación de concentraciones de cianuro mayores a 1 mg/ml; sin embargo el análisis por este método esta sujeto a diversas interferencias:

- Los sulfuros, iones de metales pesados, ácidos grasos y otros compuestos orgánicos los cuales afectan la titulación con nitrato de plata.

- Los tiocianatos, cianatos, glicina, urea y otras sustancias que pueden hidrolizarse para formar cianuros bajo condiciones analíticas.

- Sustancias que contribuyen al color o turbidez, esto afecta la titulación y el desarrollo de color.

- Agentes oxidantes que probablemente destruyan parte del cianuro durante su manipulación, particularmente durante el estado de destilación.

El método ácido que presenta cierta ventaja sobre el método alcalino, es una valoración por retroceso en la cual todo el cianuro es precipitado en exceso de nitrato de plata, y después el nitrato residual es a su vez titulado con reactivo de tiocianato; por esto, en las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la técnica, se favorece la casi completa precipitación del cianuro, con lo que el método es más preciso en la determinación del mismo.

El método colorimétrico es el más sensible de los métodos cuantitativos, ya que determina concentraciones que van de 0.2 hasta 2 microgramos. Las causas de e-

rror en los resultados por este método pueden ser:

- Presición de los aparatos
- Química de la reacción colorimétrica
- Influencia del tiempo.
- Presencia de un reactivo colorido
- Impurezas de los reactivos

La selección de métodos colorimétricos debe hacerse con gran precaución ya que algunos de estos no son específicos en la cuantificación de sustancias determinadas, por ejm., se ha reportado la presencia de ácido siálico en semillas de plantas, sin embargo, los métodos empleados no eran específicos y lo que en realidad determinaban era ácido quinínico, el cual muestra propiedades similares a aquellas del ácido siálico (31).

Por otra parte la prueba es particularmente sensible a variaciones en la concentración de sales. Por esto es esencial aislar estas sales, de tal manera que la concentración de las mismas sea controlada.

En cuanto a la elección entre el método oficial (alcalino ó ácido) y el modificado (en cualquiera de sus variantes), podemos mencionar que la destilación por arrastre de vapor presenta mayores ventajas que la técnica oficial, ya que en esta encontramos diversas objeciones:

- La formación de una gran cantidad de espuma lo que hace necesario la adición de altas concentraciones de antiespumante (2-octanol ó silicona).

- El calentamiento directo de la muestra puede producir sustancias que interfieren con la determinación de cianuro.

- Requiere mayor tiempo para recuperar el cianuro

de hidrógeno, y en algunas ocasiones es necesario dete -
ner la destilación antes de recolectar la cantidad de -
destilado indicado en la técnica, debido a la intensa -
formación de espuma, aún en presencia de el antiespumante.

CONCLUSIONES

- Se recomienda la alcalinización de la muestra con solución de hidróxido de sodio, de tal manera que tenga un pH aproximado de 12-13. En la figura 2 se muestra la relación del contenido de cianuro con respecto al pH y se observa que a medida que el pH disminuye mayor es la pérdida de cianuro como cianuro de hidrógeno.

- Dependiendo del tipo de muestra a tratar se pueden utilizar diferentes métodos para eliminar sustancias que interfieren con la cuantificación de cianuro (42,43,44).

- El método de titulación se puede usar con muestras con una concentración de cianuro mayor a 1 mg/lit. El método colorimétrico es utilizable solo cuando la concentración de cianuro es menor a 1 mg/lit.

- Dependiendo del contenido de saponinas en la muestra, se recomienda el uso de antiespumantes (silicona ó 2-octanol). El uso de estos no tiene efecto sobre la cantidad de cianuro contenido en la muestra.

Método	gm frijol	S_x^2	SE_x	mg HCN	S_y^2	SE_y	mg HCN %	S_z^2	SE_z
Acido ¹	11.10	0.78	0.38	1.10	0.12	0.15	9.78	5.40	1.03
Acido ²	10.56	0.33	0.26	1.11	0.03	0.08	10.50	1.65	0.57
Alcalino ¹	10.56	0.37	0.27	1.19	0.01	0.06	11.32	0.45	0.30
Alcalino ²	10.15	0.04	0.09	1.10	0.00	0.03	10.86	0.35	0.26
Colorimétr ₁	10.18	0.64	0.36	1.14	0.01	0.59	11.19	0.30	0.24

¹Técnica Oficial
²Técnica Modificada

Tabla II. En esta tabla se muestra el análisis estadístico de las determinaciones de HCN obtenidas en los diferentes métodos. En la columna 7 se reporta la cantidad de ácido cianhídrico por 100 - gramos de frijol.

Método	F	t	p	U	p
Acido ¹					
Acido ²	3.27	0.25	>0.05		
Alcalino ¹					
Alcalino ²	1.29	1.41	>0.05		
Acido ¹					
Colorimétrico	17.85			25	>0.05
Acido ²					
Colorimétrico	5.46	2.18	>0.05		
Alcalino ¹					
Colorimétrico	1.50	0.63	>0.05		
Alcalino ²					
Colorimétrico	1.15	2.18	>0.05		
Acido ²					
Alcalino ²	4.71	0.55	>0.05		
Acido ¹					
Alcalino ²	15.4			25	>0.05
Alcalino ¹					
Acido ²	3.63	1.20	>0.05		
Alcalino ¹					
Acido ¹	11.87			25	>0.05

¹Técnica Oficial
²Técnica Modificada

Tabla III. En esta se muestra el análisis de significancia de todas las combinaciones posibles

Método	Alcalino ²	Acido ¹	Acido ²	Alcalino ¹	Colorimétrico
Alcalino ²		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
Acido ¹	>0.05		>0.05	>0.05	>0.05
Acido ²	>0.05	>0.05		>0.05	>0.05
Alcalino ¹	>0.05	>0.05	>0.05		>0.05
Colorimétrico	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	

¹Técnica oficial

²Técnica modificada

Tabla IV. Tabla que muestra el resultado del análisis estadístico de las diferentes técnicas. Los resultados obtenidos son estadísticamente no significativos - ya que la p es mayor del 5 %.

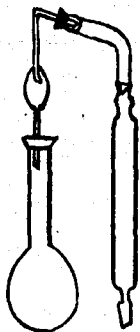


Figura 1a. Dispositivo recomendado por la A.O.A.C.

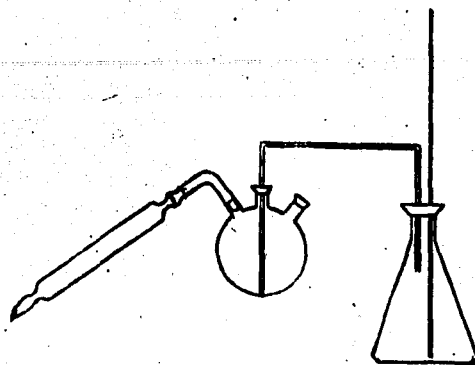


Figura 1b. Dispositivo utilizado en la modificación.

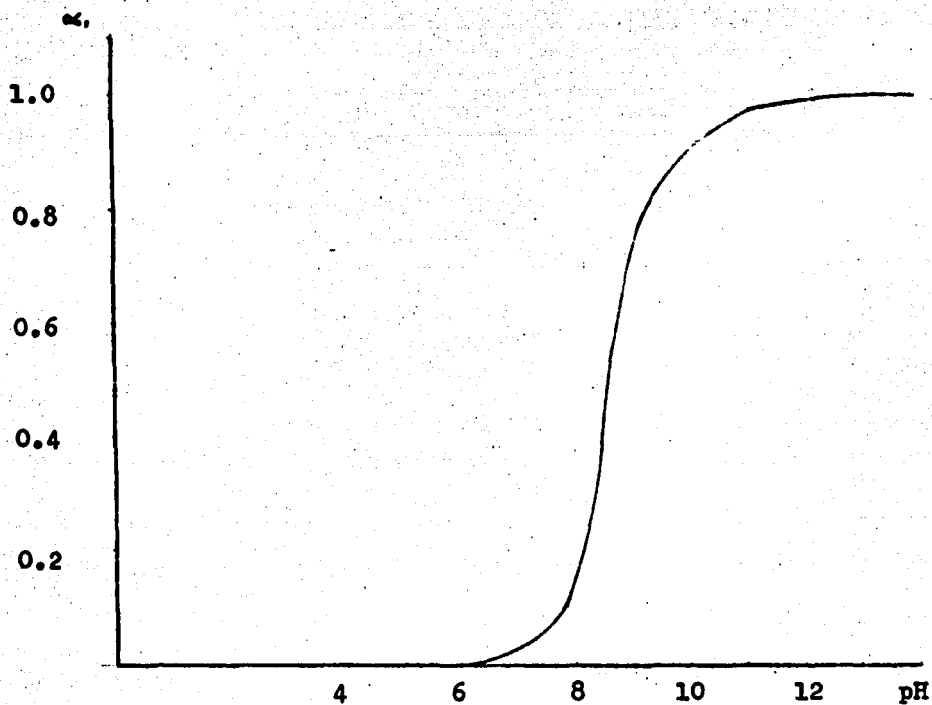
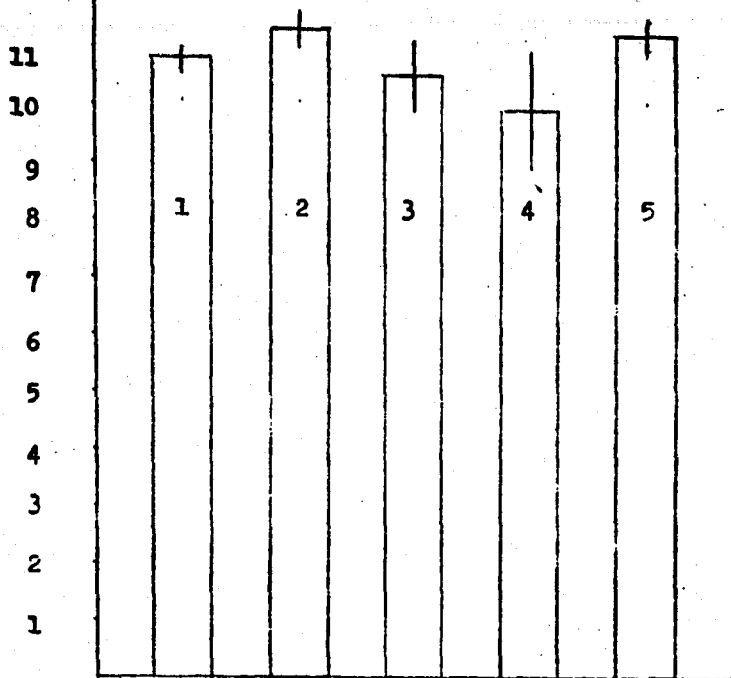


Figura 2. Fracción del ácido total presente en forma de CN^- , α_1 , en función del pH

mg HCN/100 g muestra



1. Método ácido (A.O.A.C.)
2. Método ácido (modificación)
3. Método alcalino (A.O.A.C.)
4. Método alcalino (modificación)
5. Método colorimétrico

Figura 3. Se muestra el contenido de HCN determinado por las diferentes técnicas. Los resultados son el promedio de 5 diferentes destilaciones

Absorbancia

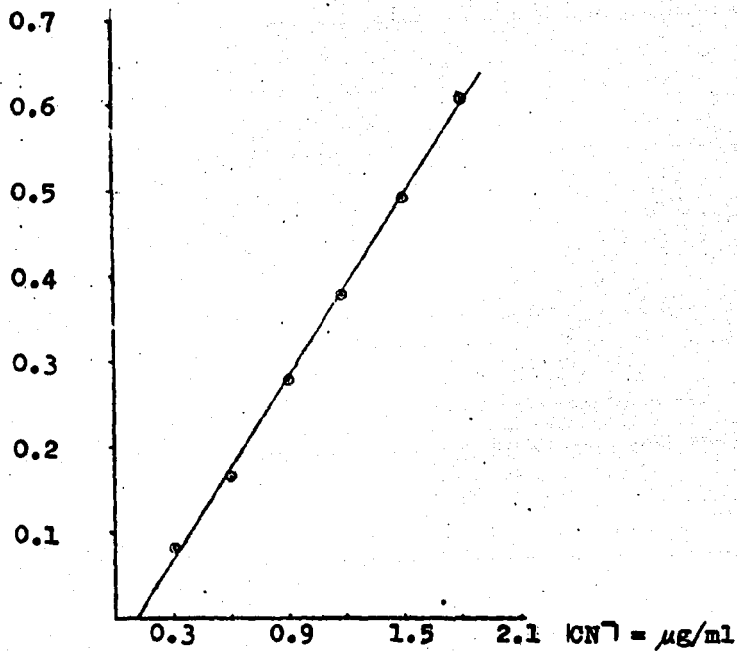


Figura 4. Curva de calibración del método colorimétrico, donde se mide la absorbancia como función de la concentración de CN^- .

B I B L I O G R A F I A

1. Araujo, Aldo M. de. 1976. The Relationship Between Altitude and Cyanogenesis in White Clover (*Trifolium repens* L.). *Hered.*, 17, 291.
2. Bansal, R. D. 1966. Cyanogenesis in Birdsfoot Trefoil, *Lotus corniculatus* L. *Res. Fran. Gen. Dep. Agr.*, 12, 40.
3. Bard, S. A. 1970. *Equilibrio Químico*. Harper and Row Publishers INC. p. 86.
4. Bartholomew, E. T., and Raby, E. C. 1935. Photoelectric Turbidimeter for Determining Hydrocyanic Acid in Solutions. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 7, 68.
5. Boxer, G. E., and Richards, J. C. 1951. Chemical Determination of Vitamin B12. II. The Quantitative Isolation and Colorimetric Determination of Millimicrogram Quantities of Cyanide. *Arch. Biochem.*, 30, 372.
6. Butler, G. W., Reay, P. F., and Tapper, B. A. 1973. Physiological and Genetics Aspects of Cyanogenesis in Cassava and Other Plants. In *Chronic Cassava Toxicity*. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 65.
7. Bruijin, G. H. de. 1973. The Cyanogenic Character of Cassava (*Manihot esculenta*). In *Chronic Cassava Toxicity*. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 43.
8. Brünnich, J. C. 1903. LXXX. Hydrocyanic Acid in Fodder Plants. *J. Chem. Soc.*, 83, 788.
9. Charlot, G. 1974. *Chimie Analytique Quantitative II*. Masson et cie, Editeurs. 2^e edition. p. 375.
10. Conn, E. E. 1973. Cyanogenic Glycosides: Their Occurrence Biosynthesis and Function. In *Chronic Cassava Toxicity*. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 55.

11. Coursey, D. G. 1973. Cassava as Food: Toxicity and Technology. In Chronic Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 27.
12. Cook, R. D. 1978. An Enzymatic Assay for the Total Cyanide Content of Cassava (*Manihot esculente* Crantz). J. Sci. Fd. Agric., 29, 345.
13. Cupples, H. L. 1933. Determination of Hydrocyanic Acid in Air and in Air Carbon Dioxide Mixtures. Ind. Eng. Chem. - Anal., 5, 50.
14. Delange, F. M., Velden, van der and Ermans, A. M. 1973. - Evidence of an Antithyroid Action of Cassava in Man and in Animals. In Chronic Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 147.
15. Dick, J. G. 1965. Analytical Chemistry. Mc Graw Hill Publishers. p. 328.
16. Ekechi, O. L. 1973. Endemic Goitre and High Cassava Diets in Eastern Nigeria. In Chronic Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 139.
17. Epstein, J. 1947. Estimation of Microquantities of Cyanide. Anal. Chem., 19, 272.
18. Ermans, A. M., Velden, van der, Kinthaert, J., and Delange, F. 1973. Mechanism of the Goitrogenic Action of Cassava. In Chronic Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 153.
19. Francis, G. K., and Connell, W. B. 1913. The Colorimetric Method for Determining Hydrocyanic Acid in Plants with Special Reference to Kafir Corn. J. Am. Chem. Soc., 35, 1624.
20. Feigl, F. 1958. Spot Test in Inorganic Analysis. Elsevier Publishing Company. Fifth edition. p. 276.
21. Feigl, F. 1960. Spot Test in Organic Analysis. Elsevier -

- Publishing Company. Sixth edition. p. 365.
22. Gales, N., and Pensa, A. J. 1933. Quantitative Determination of Small Amounts of Hydrocyanic Acid. *Ind. Eng. Chem Anal. Ed.*, 5, 80.
 23. Goldschmidt, S. B., Butler, G. W., and Conn, E. E. 1963.- Incorporation of Hydrocyanic Acid Labelled with Carbon-14 into Asparagine in Seedlings. *Nat.*, 197, 718.
 24. Haisman, D. R., and Knight, D. J. 1967. The Enzymic Hydrolysis of Amygdalin. *Biochem. J.*, 103, 528.
 25. Heffer, W. 1963. Official, Standardised and Recommended Methods of Analysis. Publ. Analytical Methods Committee. p. 253.
 26. Hill, P. C. 1973. Chronic Cyanide Toxicity in Domestic Animals. In *Chronic Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr.*, London, England, p. 29.
 27. Hughes, M. A. 1973. The Genetics of Cyanogenesis. In *Chronic Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr.*, London, England, p. 49.
 28. Jacobs, M. B. 1949. The Analytical Chemistry of Industrial Poison, Hazards and Solvents. Interscience Publishers INC. Second edition. p. 444.
 29. Jaffé, W. G. 1950a. Estudio Sobre la Inhibición del Crecimiento de Ratas Causada por Algunas Semillas de Leguminosas. *Act. Cient. Ven.*, 1, 62.
 30. Jenkins, G. L., Dumes, A. G., and Christian, J. E. 1951.- *Química Farmaceutica Cuantitativa. Editorial Atlante S. A Mex.*, D. F. p. 122.
 31. Jennigs, A. C. 1978. Sialic Acid in Plant Tissues: a History of Incorrect Identification Due to the Use of Non-Specific Colorimetric Reactions. *J. Sci. Fd. Agric.*, 29, 930.

32. Kolthoff, S. 1970. Quantitative Chemical Analysis. Mc Millan Editions. p. 741 y 795.
33. Maner, J. H., and Gómez, G. 1973. Implications of Cyanide Toxicity in Animal Feeding Studies Using High Cassava Rations. In Chronic Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 113.
34. Montgomery, R. D. 1967. Observations on the Cyanide Content and Toxicity of Tropical Pulses. W. I. Med. J., XIII 1.
35. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1975. Twelfth edition. p. 481.
36. Oke, O. L. 1973. The Mode of Cyanide Detoxication. In Chronic Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London, England, p. 97.
37. Orozco, D. F. 1970. Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Porrúa, S. A. Séptima edición. p. 263 y 268.
38. Patty, F. A. 1963. Industrial Hygiene and Toxicology. Interscience Publisher INC. Second edition. p. 1991.
39. Pérez, T. R. 1975. Patología Molecular, Subcelular y Celular. La Prensa Médica Mexicana. p. 193.
40. Seil, G. E. 1926. Determination of Hydrocyanic Acid in Gaseous Mixtures. Ind. Eng. Chem., 18, 142.
41. Snell, S. 1960. Colorimetric Methods of Analysis. D. Van Nostrand Company. Third edition. p. 856.
42. Standard Methods for the Examination of Water, Sewage and Industrial Wastes. 1955. Published by Am. Publ. Health Ass. INC. Tenth edition. p. 293.
43. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 1960. Published by Am. Publ. Health Ass. INC. Eleventh edition. p. 350.
44. Standard Methods for the Examination of Water and Waste -

Water. Published by Am. Publ. Health Ass. INC. Thirteen -
edition. p. 397.

45. Takanashi, Shigeru and Tamura, Z. 1970. Fluorometric De -
termination of Cyanide by the Reaction with Pyridoxal. -
Chem. Pharm. Bull., 18, 1633.
46. Viehoveer, A., and Johns, C. D. 1915. On the Determina -
tion of Small Quantities of Hydrocyanic Acid. J. Am. Chem
Soc., 37, 601.
47. Wilson, J. 1973. Cyanide and Human Disease. In Chronic -
Cassava Toxicity. Int. Dev. Res. Centre Monogr., London,
England, p. 121.