

A DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO CIANÍDRICO EM MANDIOCAS (*Manihot esculenta* *Crantz*) POR DIFUSÃO^{1/}

Francisco Franco Feitosa Teles^{2/}
Tânia Toledo de Oliveira^{2/}
Maria Goreti de Almeida^{2/}
Américo José da Silveira^{3/}
Cid Martins Batista^{2/}
Jorge Luiz Martins Rezende^{2/}

1. INTRODUÇÃO

A metodologia tradicional para análise de ácido cianídrico (HCN) em raízes de mandiocas já foi sobejamente estudada (1, 4, 6, 7) e criticada. A técnica mais comum, que oferece maior acuidade e precisão, é a sugerida por TELES e SCHOLZ (6), na qual o HCN liberado por hidrólise é destilado por arraste de vapor, seguido de argentimetria pelo método de VOLHARDT.

Embora seja perfeitamente válida, essa técnica encerra algumas dificuldades, tais como: a) dificilmente se analisam mais de 6 amostras por vez, dada a necessidade de condensadores, maceradores e coletores individuais; b) o tamanho da amostra é muito grande, o que aumenta a possibilidade de acidente por envenenamento, uma vez que o HCN é substância gasosa altamente tóxica; c) a argentimetria é técnica analítica que requer grande habilidade do operador, além de apresentar custo elevado.

Visando a minimizar essas dificuldades, os autores se propuseram estudar uma nova técnica para análise do HCN contido em raízes de mandioca. A referida técnica baseia-se na liberação de HCN, concomitantemente à sua captação, em célula difusora de CONWAY (2), seguida de colorimetria pelo reagente de TELES (5, 8). Foram estudadas algumas variáveis dentro de dois parâmetros principais: a) a colorimetria e b) o método de difusão.

^{1/} Recebido para publicação em 23/04/1981.

^{2/} Departamento de Química da U.F.V. 36570 Viçosa, MG.

^{3/} Departamento de Fitotecnia da U.F.V. 36570 Viçosa, MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Colorimetria. Preparou-se o reagente de Teles conforme recomendado para análise de lactose (9). Fez-se a colorimetria sobre uma solução contendo 0,1 mg/ml de ácido cianídrico em hidróxido de sódio 0,5 normal, usando uma solução de bisulfito de sódio recém-preparada e uma solução preparada com sete dias de antecedência. Dessa forma, determinar-se-ia a estabilidade da solução de bissulfito de sódio, a qual é facilmente oxidável.

Dando seqüência ao estudo dessa variável, testou-se a influência da concentração de bissulfito na medição colorimétrica. Para isso, usaram-se soluções reativas, contendo zero, 1/4 e 1 volume de NaHSO_3 a 1% (p/v) no preparo do reagente de Teles.

A sensibilidade do método foi testada com o uso de soluções com 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 mg/ml de HCN em NaOH 0,5 N e substituindo, no reagente de Teles, o indicador pícrato por 2,4 dinitrofenol.

Difusão. Células de difusão de Conway contendo no cilindro central ralado de raízes de mandioca, 3 ml de água destilada, na câmara central, e uma solução aquosa de NaOH 0,5 N, na câmara externa, foram colocadas em estufa, a $70 \pm 5^\circ\text{C}$, por 120, 150, 180 e 210 minutos. Após esfriar, realizou-se a colorimetria em alíquota, retirada da câmara externa. Para comparação, substituiu-se a água, na câmara interna, por uma solução de ácido tartárico 1%, conforme recomenda OHLWEILER (3).

Para determinação da amostra ideal, variou-se o peso da mesma de aproximadamente 2 até 5 gramas de matéria fresca.

Foram testados os agentes ácido tartárico 1% (p/v) e água destilada como hidrolisantes.

Soluções de cianeto de sódio (NaCN) de 0,1 a 0,6 mg/ml foram usadas como padrão na câmara externa da célula de Conway.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Colorimetria. Conforme estabelece o método, para preparo do reagente de TELES (9) a solução de bissulfito de sódio deverá ser preparada recentemente, com dois dias apenas, no máximo. Como se esperava que o experimento colorimétrico tivesse duração acima de 2 dias, compararam-se 2 reagentes de Teles, um deles com solução de bissulfito de sódio, com 7 dias de preparo. Os resultados encontram-se no Quadro 1.

Por esses resultados, conclui-se que, no preparo de reagente de Teles, pode-se usar uma solução de bissulfito de sódio (NaHSO_3) pelo menos com uma semana após seu preparo, quando da análise de ácido cianídrico por esse método analítico.

O efeito do íon bissulfito é remover algum oxigênio da solução, evitando reoxidação. O uso desse íon, para esse fim, já foi estudado por OHLWEILER (3) e por SUMNER (6). Entretanto, sendo ele um redutor, poderia interferir com o íon cianeto (CN^-) a ser analisado. Os resultados encontram-se no Quadro 2.

Analizando os dados, notou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de F.

Pelo Quadro 2 verifica-se que a partir de 0,04 mg de HCN, quanto maior a concentração de HSO_3^- menor é a absorbância, aumentando, consequentemente, a sensibilidade do método, pois, enquanto 1,00 mg de cianeto mostrava uma absorbância de 0,470, na ausência de HSO_3^- , esta caía para 0,438, com a adição de 1 volume de HSO_3^- 1%, conforme recomenda o método original. Entretanto, essa sensibilidade não é a que se quer, pois implica amostragem menor ou diluições subseqüentes, aumentando o trabalho no manuseio e diminuindo a precisão por

QUADRO 1 - Efeito da idade da solução de bissulfito de sódio na avaliação colorimétrica em 540 nm

mg de HCN	Absorbância*	
	NaHSO ₃ recente	NaHSO ₃ velho
0,02	0,080 ± 0,001	0,082 ± 0,001
0,04	0,172 ± 0,002	0,182 ± 0,002
0,06	0,266 ± 0,002	0,262 ± 0,002
0,08	0,360 ± 0,003	0,355 ± 0,003
0,10	0,436 ± 0,003	0,440 ± 0,003
0,00	-0-	-0-

* Média de 4 repetições

* Não houve diferença estatisticamente significante entre as médias, pelo teste "t" ($P < 0,01$).

QUADRO 2 - Efeito do íon HSO₃⁻ na colorimetria em 540 nm

mg de HCN	Absorbância*		
	Volume de HSO ₃ ⁻	0,25	1,00
0,02	0,090 a	0,090 a	0,090 a
0,04	0,200 a	0,195 b	0,178 c
0,06	0,300 a	0,282 b	0,273 c
0,08	0,385 a	0,378 b	0,358 c
0,10	0,470 a	0,452 b	0,438 c

* Média de 4 repetições

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si ($P < 0,01$).

erro de pipetagem. Após esse estudo, deu-se preferência ao uso do reagente de Teles, preparado conforme o original, ou seja, com bissulfito a 1%.

Fazendo uma curva-padrão, usando 1 ml de soluções de concentrações que variaram de 0,02 a 0,4 mg/ml de HCN, obtiveram-se os resultados que se vêem no Quadro 3.

Em representação gráfica A540 «versus» concentração, evidencia-se linearidade até a concentração de 0,20 mg, desaparecendo a partir daí. Essa observação le-

QUADRO 3 - Curva-padrão para determinação colorimétrica do HCN pelo reagente de Teles

mg HCN	Absorbância*
0,02	0,090
0,04	0,178
0,06	0,273
0,08	0,358
0,10	0,438
0,20	0,840
0,30	1,020
0,40	1,150

* Médias de 4 repetições, não diferentes estatisticamente entre si ($P < 0,01$).

vou a estabelecer-se que o método é viável dentro dos limites de 0,02 a 0,20 mg de HCN, para tubos de Folin de 25 ml.

Teoricamente, a sensibilidade do método aumenta com o número de nitrações do anel. Desse modo, substituiu-se, no reagente de Teles, o ácido pícrico pelo 2,4 dinitrofenol (DNP). Os resultados obtidos encontram-se no Quadro 4.

Para concentrações inferiores a 0,3 mg de ácido cianídrico, a curva mostrou-se razoavelmente linear e com desvios-padrão bem pequenos. Entretanto, com o aumento das concentrações, a confiabilidade decresceu muito, haja vista as varia-

QUADRO 4 - Efeito da substituição de ácido pícrico por 2,4 dinitrofenol na determinação colorimétrica do HCN pelo reagente de Teles

mg HCN	Absorbância - repetições						
	1	2	3	4	5	\bar{x}	d.p.
0,1	0,010	0,010	0,010	0,020	0,010	0,012	0,005
0,2	0,060	0,060	0,055	0,060	0,065	0,060	0,004
0,3	0,120	0,120	0,165	0,180	0,135	0,144	0,027
0,4	0,220	0,235	0,245	0,270	0,240	0,242	0,018
0,5	0,360	0,425	0,465	0,390	0,365	0,401	0,044
0,6	0,500	0,465	0,480	0,455	0,470	0,474	0,017
0,7	0,590	0,595	0,615	0,585	0,595	0,596	0,012

ções verificadas. Conclui-se que, embora a sensibilidade do método seja aumentada para 0,7 mg de HCN, a variação das leituras de absorbância passam a ser muito grandes, comprometendo, destarte, a precisão do método, de acordo com o que foi anteriormente descrito. Acredita-se, contudo, que essa técnica ainda possa ser usada, se outras condições físicas e químicas forem estabelecidas.

O método por difusão. Ralado do cilindro central de uma única raiz de mandioca, variedade 'Cacau', depois de rápida homogeneização, foi colocado na câmara central de células difusoras de Conway. Como reagente hidrolisante usou-se apenas água destilada (5). As amostras pesaram entre 2,5 e 5,2 gramas, e a temperatura foi mantida em $70 \pm 5^\circ\text{C}$. Vêem-se os resultados no Quadro 5.

Analizando os resultados apresentados no Quadro 5, tiram-se três conclusões genéricas:

- 1.^{a)} maior amostra, menor resultado;
- 2.^{a)} maior tempo, menor variação;
- 3.^{a)} média mais alta para o tempo de 3 horas.

Em consequência, limitaram-se o peso das amostras (2 a 3,5 g) e o tempo da difusão (2 a 2,5 h), mantendo-se a temperatura em $70 \pm 5^\circ\text{C}$.

Os resultados desse novo experimento encontram-se no Quadro 6.

A análise do Quadro 6 mostra que o tempo de difusão de 2 horas e 30 minutos, quando mantidos os pesos das amostras entre 2,00 e 3,50 gramas, apresenta variações comparáveis às apresentadas por um tempo de difusão de 4 horas, como foi visto no Quadro 5, anteriormente citado. Nota-se, também, que, embora o peso das amostras tenha tido variações semelhantes ($s = 0,281$ e $0,285$), o tempo de duas horas mostrou resultados mais variáveis, levando a crer que a hidrólise não está completa com apenas duas horas a $70 \pm 5^\circ\text{C}$.

Como alguns autores (1, 4) recomendam o ácido tartárico, como agente hidrolisante, substituiu-se a água, na câmara interna, por uma solução desse ácido a 1% (p/v). Os resultados estão apresentados no Quadro 7.

Pela análise do Quadro 7, verifica-se que, ao contrário do que se pensa, o ácido tartárico diminui a liberação do HCN quando de sua determinação em raízes de mandiocas. Tal observação já havia sido feita por outros autores e uma discussão mais aprofundada sobre esse assunto poderá ser encontrada em TELES (5).

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista que vários parâmetros foram testados, apresenta-se, a seguir, para uniformização, a metodologia recomendada pelos autores:

Metodologia sugerida pelos autores para determinação de HCN em mandiocas pelo método de difusão.

Difusão:

- a — Enumerar as células de Conway, previamente limpas e secas (uma para o branco, 1 ou 2 para o padrão e 3 para cada amostra).
- b — Passar pasta de silicone no bordo externo das células, para facilitar a vedação.
- c — Colocar com pipeta, 5 ml de NaOH 0,5 N nas câmaras externas do branco e das amostras.
- d — Colocar, com pipeta automática ou bureta, 5 ml de solução-padrão na câmara externa dos padrões.

Solução (0,5 mg CN/ml): Pesar 130,40 mg de potássio cianeto, p. a., 96%, em um copo de Berzelius de 100 ml. Dissolvê-lo com 30 ml de NaOH 0,5 N. Transferi-

QUADRO 5 - Influência do tempo (h) e do tamanho da amostra (g) na determinação do ácido cianídrico (mg/g de matéria fresca) por difusão

QUADRO 6 - Teor de ácido cianídrico, determinado por difusão, em cilindro central de raiz de mandioca (mg/g de matéria fresca)

Peso da amostra (g)	2 horas		2 horas e 30 minutos	
	HCN mg/g		Peso da amostra (g)	HCN mg/g
3,15	0,29		3,02	0,26
3,29	0,23		3,28	0,25
3,65	0,22		2,64	0,29
2,87	0,24		2,71	0,26
3,25	0,23		2,63	0,28
\bar{x}	3,242	0,242*	2,856	0,268*
s	0,281	0,028	0,285	0,016

* Não houve diferença estatisticamente significante quando comparadas as médias pelo teste "t" ($P < 0,01$).

QUADRO 7 - Efeito do ácido tartárico na liberação do HCN (mg/g) de raízes de mandioca pelo processo de difusão

	Agente hidrolisante*	
	Água destilada	Ácido tartárico 1% (p/v)
	0,039	0,010
	0,034	0,016
	0,040	0,018
	0,040	0,017
	0,044	0,015
\bar{x}	0,0394 a	0,0152 b
s	0,004	0,003

* Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si, pelo teste "t" ($P < 0,01$).

lo, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 ml, lavando o copo de Berzelius e completando o volume de NaOH 0,5 N.

- e — Colocar 3 ml de água destilada na câmara central de todas as placas.
 - f — Tampar firmemente as células de Conway, pesar e anotar a pesagem, até centígrama. Ex.: 83,66 g.
 - g — Ligar a estufa em $70 \pm 5^\circ\text{C}$.
 - h — Colocar mandioca recentemente ralada na câmara central de todas as placas destinadas à «amostra».
- Obs:** Tampar imediatamente depois de cada adição.
 Não colocar mais de 3,00, nem menos de 2,00 gramas de amostra.
 Verificar se a amostra está bem homogeneizada.
 Evitar os lugares quentes do laboratório.
- i — Pesar novamente as células e anotar a segunda pesada (peso da célula + peso da mandioca).
 - j — Verificado o perfeito vedamento das células, levá-las à estufa, $70 \pm 5^\circ\text{C}$, por duas horas e 30 minutos.
 - k — Retirar da estufa e deixar esfriar durante 20 a 30 minutos, antes de proceder à fotometria.

Fotometria:

- a — Enumerar tubos de Folin-Wu, de 25 ml, na mesma ordem das células de difusão.
- b — Colocar o banho-maria para ebullir.
- c — Tomar alíquota de 2 ml do conteúdo da câmara externa, transferir para todos os tubos, observando a correspondência numérica entre tubo e célula de difusão.
- d — Adicionar, com pipeta automática, ou bureta, 3 ml do reagente de TELES (6, 9) a cada tubo de Folin-Wu.
- e — Tampar os tubos com rolhas de borracha *limpas e secas*.
- f — Imergir em banho-maria em ebulação por 10 minutos.
- g — Esfriar, por imersão em água fria.
- h — Completar o volume (25 ml) com água destilada.
- i — Fazer a leitura fotométrica em cubeta de 1 cm de diâmetro, em 540 nm.

Preparo do Reagente de TELES (9):

Soluções estoque (p/v, aquosa):

- a — Fenol 1% (estável)
- b — Sódio hidróxido 5% (estável)
- c — Ácido pícrico 1% (estável)
- d — Sódio hidrogênio-sulfito 1% (estável por uma semana).

Reagente (estável por 2 dias).

Mesclar na seguinte ordem: 1 volume de fenol (a), 2 volumes de sódio hidróxido (b), 2 volumes de ácido pícrico (c) e 1 volume de sódio hidrogênio-sulfito, agitando bem, depois de cada adição. Manter em recipiente escuro, com tampa plástica ou de borracha.

Obs: O ácido pícrico vendido no Brasil geralmente contém 50% de água.
 Nesse caso, deve-se pesar o dobro da quantidade sugerida.

Cálculo dos Resultados:

Utilizar a fórmula abaixo em caso de repetição da nova técnica. Os dados do Quadro 8 servem de exemplo para cálculo.

$$\text{mg de CN/g} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times \frac{\text{Concentração do padrão g/ml}}{\text{Peso da amostra g}}$$

$$\text{mg/g} = \frac{0,250}{0,185} \times \frac{0,5 \text{ mg}}{2,86 \text{ g}} = 0,24$$

QUADRO 8 - Dados fictícios para orientação de cálculo

Tubo	Peso da célula (g)	Célula + mandioca (g)	Peso da amostra (g)	Absorbância	CN mg/g
1 (branco)	-	-	-	Zero	
2 (padrão)	-	-	-	0,185	
3 (amostra)	84,40	87,26	2,86	0,250	0,24
4 (amostra)	84,83	87,12	2,29	0,200	0,24
5 (amostra)	80,59	82,86	2,27	0,195	0,23

5. RESUMO

Os autores propõem nova metodologia para análise do ácido cianídrico (HCN) em raízes de mandioca, baseada no uso de células de difusão de Conway, seguido de espectrofotometria pelo reagente de Teles, em 540 nm.

A nova técnica é descrita com detalhes, o que permite, facilmente, sua repetição por outros laboratórios, e apresenta, como principal vantagem, a possibilidade de analisarem-se mais de 60 amostras de uma só vez, usando equipamento e reagentes comumente encontrados em laboratórios de análise agrícola, com reduzido perigo para o analista.

6. SUMMARY

A new method for the determination of hydrocyanic acid (HCN) in cassava roots, using Conway diffusion cells, was developed. Photometric measurements were carried out by the use of the Teles reagent at 540 nm.

The new method is safer and cheaper than conventional assays, and allows analysis in batches of 60 samples.

A detailed description of the technique is offered to permit repetitions by other laboratories.

7. LITERATURA CITADA

1. CALAZANS, F.J. & AZEVEDO, E. *Determinação colorimétrica de ácido cianídrico em mandioca*. Recife, Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco, 1964. p. 1-23. (Boletim Técnico n.º 9).
2. CONWAY, E.J. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. N. York, Chemical Publishing Co., 1963. p. 241-335.
3. OHLWEILER, O.A. *Química Analítica Quantitativa*. São Paulo, Livros Técnicos e Científicos, Editora S.A./MEC, 1974. vol. 3 p. 709-917.
4. PAULA, R.D.S. & RANGEL, J.L. *A mandioca, sua industrialização, seu valor econômico*. S. Paulo, Instituto Nacional de Tecnologia, 1940. p. 19-29.
5. TELES, F.F.F. Considerações sobre a análise do ácido cianídrico em mandioca e seus produtos manufaturados. In: *Pesquisas tecnológicas sobre a mandioca*. Fortaleza, B.N.B., 1972. p. 7-33.
6. TELES, F.F.F. *Nutrient analysis of prickly pear (*Opuntia ficus indica* L.)*. University of Arizona, Tucson, 1977. 157 p. (Tese de Doutoramento).
7. TELES, F.F.F. & SCHOLZ, H.K.B. *Análise do ácido cianídrico em mandiocas e seus produtos manufaturados*. Fortaleza, B.N.B., 1968. 32 p. mimeog.
8. TELES, F.F.F., SILVEIRA, A.J. & BATISTA, C.M. Carboidratos ácido-digeríveis e toxidez cianogênica de dez clones de mandioca cultivados em Minas Gerais. *Rev. Ceres* 26 (147): 513-516. 1979.
9. TELES, F.F.F., YOUNG, C.K. & STULL, J.W. A rapid method for lactose determination. *J. Dairy Sci.* 61 (4): 506-508. 1978.