

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA DOSE LETAL (DL<sub>50</sub>) ORAL E EFEITOS  
METABÓLICOS DA LINAMARINA EXTRAÍDA DE MANDIOCA, EM  
RATOS**

**ANA MARIA LOPES**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Energia na Agricultura.

**BOTUCATU-SP  
Fevereiro - 2001**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA DOSE LETAL (DL<sub>50</sub>) ORAL E EFEITOS  
METABÓLICOS DA LINAMARINA EXTRAÍDA DE MANDIOCA, EM  
RATOS**

**ANA MARIA LOPES**

Orientador: **Prof. Dra. Marney Pascoli Cereda**

Co-orientador: **Prof. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Energia na Agricultura.

**BOTUCATU-SP  
Fevereiro - 2001**

*Em memória de meu irmão e compadre*

Paulo Rubens, o Gijo.

## MAMÃ MANDIOCA

Mandioca, és grande.  
 Mandioca, és boa para nós  
 Mandioca, és tu que nos alimenta  
 Em condições difíceis, quando o milho não rende,  
 com solos pobres, tu, mandioca, ainda produzes.  
 Quando temos seca, tu, mandioca, ainda nos alimentas.  
 As tuas raízes dão-nos energia,  
 a tua mathapa faz o nosso corpo forte.

Às vezes, mandioca, te tornas amarga,  
 como nem as pessoas sempre andam bem dispostas.  
 Quando estás irritada por seca ou por solos pobres,  
 então, quando te faltas bebida e comida,  
 te tornas amarga. Quem não faria isso?  
 Alguns tipos sempre estão amargos,  
 como as pessoas que sempre andam desconfiadas...  
 Não permitem facilmente a sua aproximação.  
 Deves ter as tuas razões.

Esta mandioca amarga está a afectar-nos com a sua amargura,  
 parece que quer-nos envenenar!  
 Às vezes, tu mandioca amarga, tens nos trazido doenças.  
 Quando ficamos com fome em casa, e tu, só tu estavas na machamba,  
 deixaste-nos com vômitos e alguns de nós com konzo,  
 porque não tivemos a paciência para te tornar manso.

Com as tuas palavras amargas, tu nos avisaste,  
 que precisas de tempo antes de ser comida:  
 Posta de molho, até que fiques mole,  
 ou que fiques mole por bolores, antes de te secar.  
 Isto foi a maneira para mostrar-nos a tua cara doce.  
 Isso serviu-nos bem, quando tivemos tempo,  
 pois, servirás bem, quando temos tempo.

Mas quando há fome no lar, e tu estas na machamba...  
 agora já sabemos como te aproveitar:  
 Não vamos esperar até que fiques mole,  
 porque queremos comer no mesmo dia,  
 sim, no mesmo dia.  
 Acabamos com teu veneno por ralar as tuas raízes,  
 espremer o teu suco amargo, e depois torrар.  
 Assim, mandioca, mesmo se fores tão amarga,  
 o teu aspecto já torna-se delicioso.  
 O veneno saíu e podemos acompanhar-te com mathapa ou caril.  
 Assim, mamã mandioca, como agora sabemos o teu segredo,  
 assim vais servir-nos ainda melhor.

Sander Essers, Nampula, 29/7/94 (inspirado por Florence Nwapa)

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Sérgio Hugo Benez, cuja amizade tenho o prazer de compartilhar;
- À Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda, exemplo de seriedade e compromisso com a pesquisa.
- À Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues pela disposição em auxiliar;
- Ao Dr. José Renato Cagnon, idealizador deste projeto.
- À Dra. Mary Ann Foglio, do CPQBA, UNICAMP, pelas informações e extração do material;
- Ao biólogo Claudiney do Nascimento, cuja dedicação facilitou a realização deste trabalho.
- À Dra. Cristina Gevehr Fernandes que me relembrou os conceitos básicos da histopatologia;
- Às funcionárias de Seção de Pós-Graduação em Agronomia, FCA, Botucatu pelo atendimento sempre cordial;
- Ao pessoal Técnico e Administrativo do CERAT (Centro de Raízes e Amidos Tropicais) pelo bom atendimento;
- A Suzan Pantaroto sempre dedicada ao trabalho;
- À senhora Maria Luiza Falagueira Ardanaz, do Laboratório do Toxican, Departamento de Patologia, FM, UNESP, pelo preparo das lâminas;
- Aos colegas do Departamento de Química e Bioquímica, IB, UNESP, pelo interesse e incentivo;
- Aos Docentes do Curso de Pós-Graduação em Energia na Agricultura pelo conhecimento transmitido;
- Às queridas Lisabete, Vânia e Ana Catarina, pela amizade incondicional;
- Ao Emerson, amigo em todos os momentos.

## SUMÁRIO

Lista de Quadros.....	VII
Lista de Figuras .....	VIII
RESUMO.....	IX
SUMMARY.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Linamarina .....	4
2.2. Linamarase .....	7
2.3. Efeitos da Ingestão do Glicosídeos Cianogênicos .....	16
2.3.1. Intoxicação aguda .....	16
2.3.2. Desordens neurológicas.....	17
2.3.3. Bócio endêmico .....	17
2.3.4. Diabetes tropical.....	18
2.3.5. Malformações congênitas.....	18
2.4. Efeitos dos Glicosídeos Cianogênicos nos Animais.....	23
2.5. Mecanismos de Remoção de Glicosídeos Cianogênicos da Mandioca .....	25
2.6. Técnicas de Processamento de Raízes de Mandioca .....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Linamarina .....	32
3.2. Animais .....	32
3.3. Lotes Experimentais.....	33
3.4. Obtenção das Amostras.....	33
3.5. Cálculo da Dose Letal Oral (DL <sub>50</sub> ) de Linamarina .....	34
3.6. Determinações Bioquímicas no Soro .....	35
3.6.1. Proteínas Totais .....	35

3.6.2. Albumina .....	35
3.6.3. Glicose .....	36
3.6.4. Alanina Transaminase (EC 2.6.1.2) .....	36
3.6.5. Aspartato Transaminase (EC 2.6.1.1).....	36
3.6.6. Lactato Desidrogenase (EC 1.1.1.27).....	36
3.7. Histopatologia .....	37
3.8. Delineamento Experimental.....	37
3.9. Análise Estatística .....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1. DL <sub>50</sub> .....	39
4.2. Determinações Bioquímicas no Soro .....	43
4.2.1. Aspartato Transaminase (EC 2.6.1.1).....	43
4.2.2. Alanina Transaminase (EC 2.6.1.2).....	45
4.2.3. Lactato Desidrogenase (EC 1.1.1.27).....	47
4.2.4. Proteínas Totais (PT).....	49
4.2.5. Albumina (AB) .....	50
4.2.6. Relação Albumina / Globulina (A/G).....	51
4.2.7. Glicose .....	53
4.3. Alterações Histopatológicas.....	55
4.4. Consumo de Ração.....	60
4.5. Peso Corporal .....	62
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	65
6. CONCLUSÕES .....	66
7. SUGESTÕES .....	68
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....	69
9. APÊNDICE .....	81

**LISTA DE QUADROS**

Quadros	Página
1. Número efetivo de animais .....	40
2. Média e desvio-padrão referente à variável aspartato transaminase, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina .....	44
3. Mediana, 1º e 3º quartis referentes à alanina transaminase, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.....	46
4. Mediana, 1º e 3º quartis referentes à lactato desidrogenase, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.....	48
5. Média e desvio-padrão referente à proteínas totais, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.....	49
6. Mediana, 1º e 3º quartis referentes à albumina, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina. ....	51
7. Média e desvio-padrão referente à relação proteína:albumina, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.....	52
8. Média e desvio-padrão referente à glicose, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina .....	53

**LISTA DE FIGURAS**

Figuras	Página
1. Degradação da linamarina.....	8
2. Cianogênese na mandioca e metabolismo do cianeto no corpo humano.....	11
3. Corte histológico de fígado apresentando congestão sinusoidal e centro lobular. Hematoxilina & Eosina (x100).....	56
4. Corte histológico de rim apresentando acentuada congestão córtico medular. Hematoxilina & Eosina (x100).....	56
5. Corte histológico de sistema nervoso central apresentando congestão de pequenos vasos na substância cinzenta. Hematoxilina & Eosina (x100).....	57
6. Corte histológico de músculo cardíaco apresentando congestão visceral sistêmica. Hematoxilina & Eosina (x100).....	57
7. Corte histológico do sistema nervoso central, apresentando degeneração espongi-forme difusa. Hematoxilina & Eosina (x100).....	59
8. Corte histológico do cerebelo apresentando degeneração espongi-forme. Hematoxilina & Eosina (x100).....	59
9. Consumo médio diário de ração de ratos submetidos a diferentes doses de linamarina durante o período experimental.....	61
10. Peso corporal médio de ratos submetidos a diferentes doses de linamarina durante o período experimental (18/05 a 01/06/2000).....	63

## RESUMO

No presente estudo ratos machos, var. Wistar, com peso médio de 120g, divididos aleatoriamente em cinco grupos de cinco animais cada, receberam concentrações orais de linamarina extraída de mandioca com 87,3% de pureza equivalentes a 87,3; 174,6; 349,2 e 698,4 mg/kg peso vivo através de gavagem para determinação da DL<sub>50</sub>.

Após a administração das soluções, os animais foram observados quanto a ocorrência de óbitos por 4 horas. Nesse período morreram todos os animais do grupo que recebeu 698,4 mg/kg peso vivo, 3 animais com dose de 349,2 mg/kg peso vivo e 2 animais com dose de 174,6 mg/kg peso vivo. Os sobreviventes foram observados por 14 dias e posteriormente sacrificados.

Foram realizadas análises histopatológicas do cérebro, coração, pulmão, fígado, intestino delgado, músculo estriado, pâncreas, rim e baço. Estudou-se também a bioquímica sérica relativa aos níveis de proteína total, albumina, globulina, glicose e atividade das enzimas Alanina Transaminase (EC 2.6.1.2), Aspartatos Transaminase (EC 2.6.1.1) e Lactato Desidrogenase (EC 1.1.1.27), além do consumo de ração e peso corporal.

Os animais mortos pelas maiores concentrações de glicosídeos apresentaram ao exame histopatológico, congestão generalizada no cérebro, fígado, rins e coração. Os sobreviventes, sacrificados aos 14 dias, não apresentaram sinais de anóxia em tecido nobres. Não foram observadas alterações significativas nos

parâmetros bioquímicos estudados. O consumo de ração e peso corporal não foram afetados. Pelos resultados obtidos foi possível estabelecer que a  $DL_{50}$  oral de linamarina extraída foi  $324,86 \pm 1,5$  mg/kg/peso vivo, correspondendo a 35,35 mg de HCN/kg peso vivo.

## **EVALUATION OF ORAL LETHAL DOSE (DL<sub>50</sub>) AND METABOLIC EFFECTS OF EXTRACTED LINAMARIN FROM CASSAVA IN RATS.**

Botucatu, 2001, 96p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ANA MARIA LOPES

Adviser: MARNEY PASCOLI CEREDA

Co-Adviser: MARIA APARECIDA MARCHESAN RODRIGUES

### **SUMMARY**

In the present study the toxicity of linamarin, a cyanogenic glucoside extracted from cassava roots, was investigated in rats. Rondon bred male Wistar rats weighing 100-120g were given 100, 200, 400 800 mg linamarin/kg bw by stomach tube and observed for the occurrence of deaths. The purity of extracted linamarin was 87,3%. After 4 hours all the 5 animals that received 800 mg/kg b.w. have died; 3 out of 5 rats on 400 mg/kg b.w. and 2 out 5 animals that ingested 200 mg/kg b.w. have died. The survivors were observed for 14 days and sacrificed for evaluation of serum biochemistry (total protein albumin, globulin, glucose, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and lactate dehydrogenase) and post-mortem examination. Food intake was registered daily and body weight registered twice a week. The oral LD<sub>50</sub> determined was 324.86±1.5 mg/kg b.w. There was generalised congestion in the brain, heart, liver and kidney in the animals that died from the toxic levels of linamarin. No significant changes in serum biochemistry levels were observed in these animals. The rats that survived until 14 days did not present significant changes in serum biochemistry nor histopathological lesions. The results of the present study indicate that LD<sub>50</sub> of linamarin is higher than the safe levels set by the Codex Alimentarius Commission of FAO/WHO.

Key words: Cassava, linamarin, intoxication, biochemistry, histopathologic.

## 1. INTRODUÇÃO

A facilidade de cultivo, baixos custos de produção, a tolerância a solos pobres, à seca e ataque de insetos tornam a mandioca um alimento básico para milhões de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento da América Latina e África, constituindo a maior fonte das calorias consumidas.

Em diversos países como Índia, China e Tailândia o cultivo da mandioca destina-se à obtenção de matéria prima para as indústrias de amido, álcool, glicose, acetona, cola, papéis e estabilizantes em alimentos industrializados.

A mandioca possui glicosídeos cianogênicos entre os quais a linamarina apresenta-se em maior concentração; esses glicosídeos estão presentes em todas as partes da planta em concentrações variadas. Quando a planta ou raiz sofre traumatismo os glicosídeos liberam ácido cianídrico ou cianeto (HCN), principal responsável pela toxicidade da mandioca. Essa toxicidade potencial tem sido fonte de

preocupação de cientistas do mundo todo, principalmente da Europa e Estados Unidos da América, em razão da incidência de doenças em países africanos pobres, que tem sido relacionado com ingestão de mandioca.

Por esta razão, a Organização Mundial de Saúde limitou em 5 mg/kg de peso vivo o teor de cianeto em raízes de mandioca fresca e seus produtos, baseando-se em compêndios médicos. Embora se saiba no mundo científico que esse limite pode ser muito diferente da dose letal estabelecida, nada foi feito para contestar esses números com dados científicos confiáveis.

Entretanto, ao se levar em conta as quantidades ingeridas nestes mesmos países tanto de mandioca em uso culinário, como de seus produtos e subprodutos, o relato de acidentes letais é muito baixo. Uma preocupação adicional tem sido de usar processo tecnológico seguro para reduzir ao máximo os teores de linamarina.

Muitos alimentos processados adequadamente podem apresentar teores residuais de linamarina que acabam por se tornar barreiras psicológicas para o consumidor e para exportação.

No Japão, em razão da influencia de brasileiros que lá residem, tem havido grande pressão para importação e consumo de produtos derivados da mandioca. Com a falta de informações, as autoridades japonesas baixaram o limite de HCN para 1 mg/kg de produto. Como a redução dos teores de linamarina em alimentos

processados exige que se despenda muita energia, poucos resultados tem sido obtidos em níveis comercial.

A busca de variedades de mandioca com teor zero de linamarina é um procedimento dispendioso tanto economicamente como em esforço de pesquisa. Outra possibilidade é de estabelecer a real dose letal para linamarina, no sentido de se romper o paradigma de que a mandioca é uma planta perigosa e abrindo novos horizontes da pesquisa de uso de seus derivados, reduzindo os custos energéticos dos processos de destoxificação.

Pelo exposto, o objetivo da pesquisa foi estabelecer a Dose Letal ( $DL_{50}$ ) oral de linamarina de mandioca, bem como seus efeitos sobre o metabolismo de proteínas totais, albumina globulina, glicose e das enzimas aspartato transaminase (EC 2.6.1.1) alanina transaminase (EC 2.6.1.2) e lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27), além de possíveis alterações histológicas no cérebro, coração, pulmões, rins, fígado, pâncreas, intestino delgado, músculo estriado e baço de ratos submetidos a diferentes concentrações do glicosídeo extraído de mandioca.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Linamarina**

Com a população mundial chegando a seis bilhões de habitantes, há cada vez maior necessidade de aumento nas fontes protéicas e calóricas, através da investigação de novas fontes. Parte dessa população justamente a mais carente, está diretamente envolvida com o consumo de mandioca como na África do Sul, Caribe e Ásia.

A produção brasileira de mandioca está estagnada em um nível que varia de 22 a 25 milhões de toneladas desde 1985. A área plantada é um pouco inferior a 2 milhões de hectares. As estatísticas disponíveis indicam ser o Brasil o segundo maior produtor mundial, cabendo o primeiro posto à Nigéria, com cerca de 30,9 milhões de toneladas. (Anuário Estatístico, 1998).

No Brasil, a maior produtora de mandioca é a região Nordeste, com seis milhões de toneladas, seguida da região Norte, com aproximadamente cinco milhões de toneladas e Centro Oeste e Sudeste, com aproximadamente um e meio milhões de toneladas (Anuário Estatístico, 1998).

A mandioca é uma importante fonte energética para milhões de pessoas e animais nos trópicos, podendo ser utilizadas as raízes e as folhas (estas como fonte de vitaminas, proteínas e minerais) (Bokanga, 1994).

Em algumas regiões, a presença de glicosídeos cianogênicos em produtos de mandioca, processados inadequadamente, é associada a sintomas de intoxicação por cianeto (Rosling, 1994).

Além da mandioca, diversos vegetais são cianogênicos em seu metabolismo, como aveia (*Avena sativa*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e vagem (*P. vulgaris*). Outras plantas, cujo potencial cianogênico é comprovado, porém não identificados, são cana-de-açúcar (*Saccharum spontaneum*), arroz (*Oryza sp*), amendoim (*Arachis hypogea*) e manga (*Mangifera indica*) (Jones, 1997).

O IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), com base nas análises químicas de raízes de variedades de mandioca cultivadas no Estado de São Paulo, estabeleceu para a mandioca de mesa, o limite máximo de 100 ppm de HCN na polpa crua das raízes. Outras instituições adotam o limite de 50 ppm. Assim, a classificação, segundo o IAC é a seguinte: mansa: menos de 100 ppm de HCN na polpa

crua das raízes; intermediária: de 100 a 200 ppm de HCN; brava: mais de 200 ppm de HCN (Lorenzi & Dias, 1993).

Segundo o Codex Alimentarius Commission, da FAO (1988), a margem de segurança estabelecida para equivalentes de HCN em produtos de mandioca é de 10 mg HCN/kg de matéria fresca ou 300 mg/kg matéria seca, o que equivaleria a uma ingestão de 5 mg ou 0,2 mmol por 24 horas. Esses dados se referem a uma dieta básica de 1500 Kcal (Rosling, 1994).

A literatura cita teores de glicosídeos cianogênicos como equivalentes de HCN e equivalentes de  $CN^-$  o que causa confusões na compreensão dos dados.

A ingestão de mandioca e seus sub-produtos insuficientemente processados estão associados a um quadro de intoxicação diagnosticado em diversos países. Na Jamaica, neurite periférica; na Nigéria, ataxia neuropática tropical; em Moçambique, paralisia; em Zaire, Nigéria, bócio (Jones, 1998).

Segundo Nambisan (1994), o conteúdo de linamarina varia nas diferentes partes da planta: folhas, caule e casca contêm níveis maiores do glicosídeo que a parte comestível. Diferentes espécies também apresentam variação no conteúdo de linamarina na raiz (25-450 mg de equivalentes de cianeto kg peso fresco que poderia levar a diferentes graus de biossíntese, degradação ou transporte. Embora a translocação da linamarina se dê das folhas para a raiz, não há acúmulo progressivo na

parte comestível. Isto indica que a linamarina não é estocada passivamente no tecido, mas mobilizada e utilizada. (Nambisan, 1992).

De acordo com McMahon et al. (1995), a base fisiológica das diferenças no conteúdo de linamarina nas raízes é o aspecto mais controverso na mandioca. De acordo com De Bruijn (1973), a linamarina presente nas raízes é sintetizada na parte aérea. Diversos estudos sobre o conteúdo de cianogênicos em cultivares com alto e baixo potencial cianogênico, sugeriram que o conteúdo de linamarina das raízes pode ser determinado, em parte, pela sua presença na parte aérea (Makane et al., 1987). Entretanto, esse mecanismo de transporte ainda não está esclarecido.

## **2.2. Linamarase**

O primeiro passo para a liberação de HCN da molécula é a hidrólise da linamarina pela linamarase formando ludraxinitrila e glicose que decomposta espontaneamente ou enzimaticamente a cianeto e acetona. Convenciona-se que a atividade da linamarase é o degrau limite na cianogênese Figura 1. (McMahon et al., 1995).

A degradação da linamarina para cianeto envolve ação da linamarase (EC 3.2.1.21) e  $\alpha$ -hidroxinitrilalase (EC 4.1.2.37). A linamarase, que

hidrolisa linamarina a acetona ciano-hidrina é bem estudada e caracterizada em diferentes tecidos (Mkpong et al., 1990). Ela é ativa em todos os tecidos da planta onde há linamarina. A HN-liase que catalisa a clivagem de acetona em cianeto foi purificada e caracterizada nas folhas de mandioca de cultivares sul americanos (Hughes, 1994).

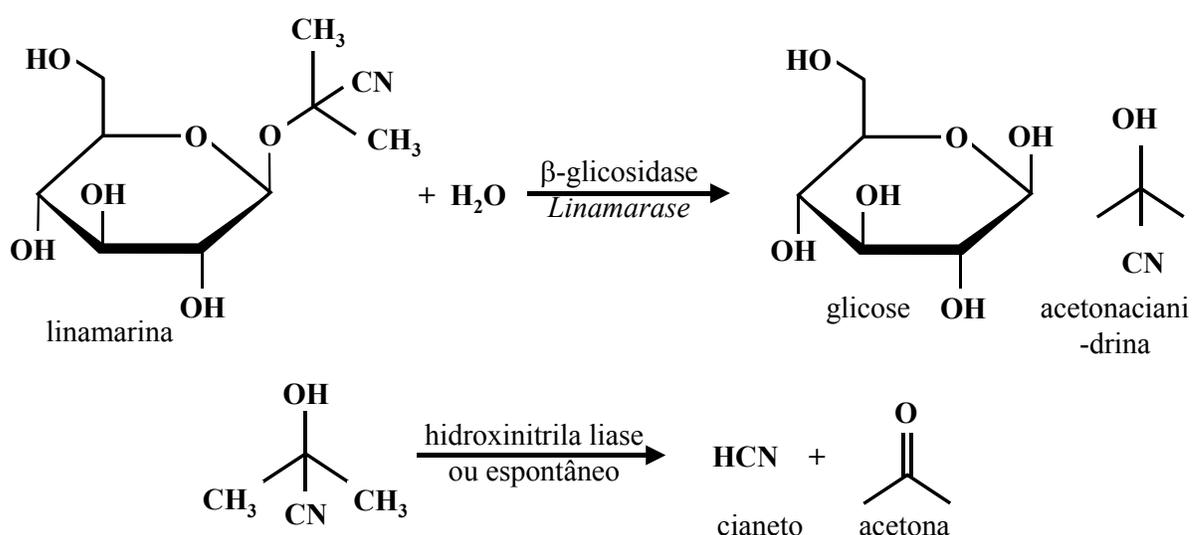


Figura 1. Degradação da linamarina

A atividade da linamarase varia entre os tecidos da planta. Folhas e casca possuem grande atividade da enzima, mas no parenquima da raiz essa atividade é de 30 a 100 vezes menor. (Nambisan & Sudaresan, 1991, citados por Nambisan, 1994). A enzima apresenta atividade máxima em pH 5,5 – 6,0 e temperaturas de 40–45° C. Redução significativa na atividade é observada em pH abaixo de 4,0 e temperaturas superiores a 50° C. A enzima é inativa em temperaturas maiores que 70° C. Sua

natureza e atividade em tecidos vegetais é significativa, pois influencia o grau de hidrólise dos glicosídeos cianogênicos durante o processamento e tem comportamento direto nos níveis finais de glicosídeos em produtos de mandioca (Nambisan, 1994).

Oliveira et al. (1998) em estudo sobre a atividade da linamarase e teores de cianeto e nitrogênio total em folhas de mandioca, observaram correlação entre a atividade da enzima e o teor de cianeto.

Embora o metabolismo do cianeto na mandioca não tenha sido extensivamente analisado, foi demonstrado que todos os tecidos possuem capacidade de metabolizar cianeto (McMahon et al., 1995). Essa conclusão baseou-se na observação de que todos os tecidos possuem altos níveis de atividade da  $\beta$ -cianoalanina sintase que apresenta atividade da rodanase, que catalisa a formação de tiocianato do cianeto (Nambisan, 1994).

É quase impossível obter-se estimativas válidas sobre a exposição ao cianeto em casos individuais. As raízes e as folhas da mandioca contêm quantidades variáveis de glicosídeos cianogênicos, sobretudo linamarina. O nível da linamarina é determinado por fatores genéticos e ambientais (Rosling, 1988).

Como o cianeto é um composto presente na degradação da linamarina, o metabolismo humano possui dois efetivos mecanismo de defesa. Primeiramente, cerca de 10 mg (0,4 mmol) de cianeto podem ser temporariamente neutralizados por uma reação reversível com a fração metahemoglobina nas células vermelhas do sangue (Lundquist et al., 1985). O segundo mecanismo é a presença da

enzima rodanase na maioria dos tecidos dos animais. Por uma reação com derivados de aminoácidos sulfurados da dieta, a enzima converte a maior parte do cianeto em tiocianato que é excretado na urina. O grau de conversão de cianeto a tiocianato em adultos é de cerca de 50-100 mg (2-4 mmol) cianeto/24h (Rosling, 1994), levando à diminuição dos níveis de aminoácidos sulfurados, e à redução do grau de destoxificação. Entretanto, mesmo com baixa ingestão protéica, sobretudo de aminoácidos sulfurados, alguns indivíduos são capazes de formar 0,5 mmol de tiocianato em 24 horas (Tylleskar et al., 1992) e não há evidências sugerindo sintomas agudos em indivíduos mal nutridos. A rodanase, catalisadora da conversão de cianeto em tiocianato é um sistema de destoxificação que ocorre no metabolismo animal e de plantas cianotróficas (Nambisan, 1994). Outro mecanismo de destoxificação é a conversão de cianeto a  $\beta$ -cianolamina pela enzima  $\beta$ -cianolamina sintase ( $\beta$ -CAS) (EC 4.4.1.9) na mandioca, (Merina et al., 1997).

Os trabalhos que investigam a eliminação dos glicosídeos cianogênicos no homem e animais citam o tiocianato como indicador da eliminação desses compostos, tanto no sangue como na urina. Figura 2. (Rosling, 1994).

O cianeto formado a partir da mandioca insuficientemente processada ocorre provavelmente como linamarina, ou um produto de quebra intermediário (Brimer, 1986). Segundo o autor, a linamarina que não foi metabolizada no intestino, poderá ser absorvida e excretada na urina sem levar à exposição ao cianeto.

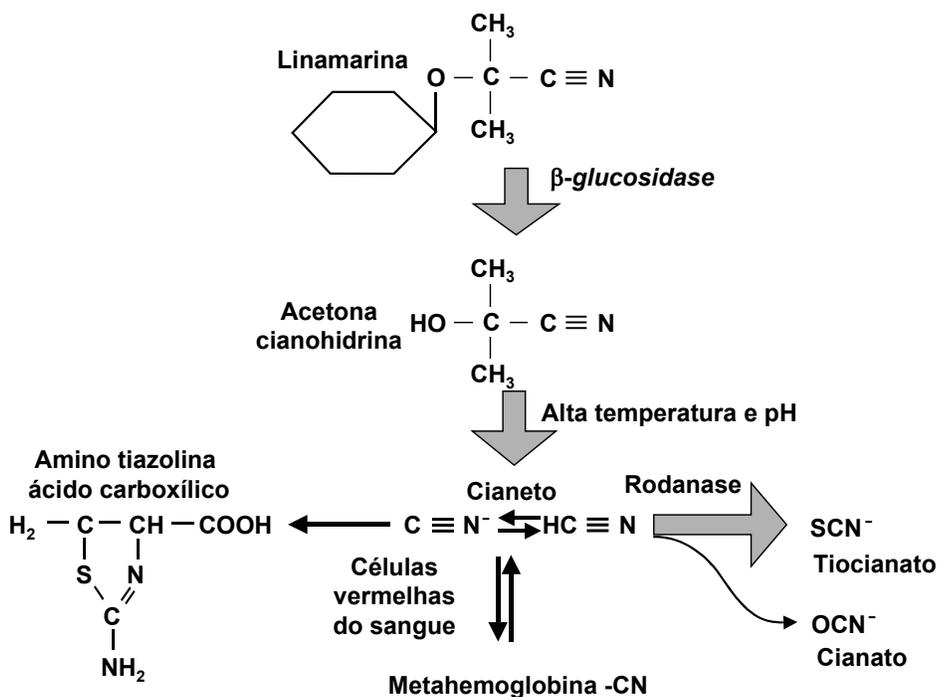


Figura 2. Cianogênese na mandioca e metabolismo do cianeto no corpo humano. (Rosling, 1994).

Cerca de 80% do cianeto ingerido é transformado em tiocianato e, em alguns dias, excretado na urina (Rosling, 1994). Não está claro se as cianohidrininas remanescentes são quebradas em cianeto, mas aceita-se que o local seria o intestino, como indicam estudos em ratos (Maduagwu, 1989). A excreção urinária da linamarina é muito rápida, durante as oito primeiras horas após a ingestão. A proporção de linamarina ingerida que passa pelo corpo livremente varia entre indivíduos, mas nunca é maior que a metade do total ingerido. Esses mesmos autores, em trabalhos em que investigaram a excreção de linamarina em humanos após a ingestão de farinha de mandioca, determinaram que, em média, 24% da linamarina ingerida foi excretada na urina em 24 horas e apenas 1% após esse período. Concluiu-se que menos da metade

da linamarina ingerida é convertida em cianeto e, conseqüentemente, tiocianato, cerca de um quarto é excretado inalterado e outro quarto é metabolizado em um composto ainda desconhecido (Carlsson et al., 1999).

Com o desenvolvimento fisiológico do tubo digestivo, a concentração de  $\beta$ -glucosidase nas paredes é baixa; entretanto essa quantidade é suficiente para causar alguma hidrólise (Matsumoto et al., 1972). O HCN é convertido em  $\text{SCN}^-$  enquanto o glicosídeo intacto é absorvido na circulação e excretado na urina. Se uma quantidade de glicosídeo é hidrolisada no fígado, haverá alta concentração de rodanase e hidroxicalabamina que auxiliarão na destoxificação. Olusi et al. (1979) administraram a animais experimentais, dose letal de cianeto como KCN e a maior parte do glicosídeo foi excretado intacto na urina como substâncias inertes. Spatz et al. (1966) determinaram que após 24 horas não há mais glicosídeo intacto nem excreção de  $\text{SCN}^-$ , indicando que não há estocagem nos tecidos para ser liberado posteriormente. A única situação em que o glicosídeo parece se tornar tóxico é quando é administrado forçosamente em altas concentrações. Neste caso a concentração de cianeto é muito maior que aquela de enzima capaz de detoxificá-lo e pode ser fatal (Oke, 1980).

Linamarina ingerida por ratos foi quebrada em HCN por glucosidases no intestino e aproveitada pela microflora. Ela também pode ser absorvida e excretada intacta na urina (Brimer, 1993; Carlsson, 1994).

Os fatores que controlam a quebra da linamarina em humanos são individuais, pois num estudo em Cuba, em mandioca cozida, Hernandez et al. (1995)

determinaram 28% de excreção urinária da linamarina e 8% como tiocianato urinário. Supõe-se que, quando a farinha de mandioca seca ao sol é misturada gradualmente à água quente, a atividade da linamarina é retardada. Especula-se também que a linamarina provoca efeitos tóxicos, mas não letais (Mlingi et al., 1992). Concluindo, uma substancial parte da linamarina ingerida é excretada e outras porções seriam quebradas pela beta-glucosidase em cianeto; entretanto a determinação de como se processa a quebra e o local onde ela ocorre, permanece desconhecida.

Deve-se considerar, entretanto, que o tiocianato ocorre normalmente no sangue e urina e seu aumento pode não estar relacionado com o cianeto da mandioca. As alterações séricas e urinárias podem ser devidas ao tiocianato de outras origens como tabaco, leite, sorgo (Lundquist et al., 1979).

Eminedoki et al. (1994) determinaram os níveis séricos e urinários de tiocianato numa população na Nigéria, após ingestão de gari. Segundo os autores os níveis de tiocianato aumentaram significativamente (20%) nos indivíduos, cuja dieta básica era constituída daquele produto, não havendo diferença entre os sexos.

Em estudos numa população na Tanzânia, Padmaja et al. (1993) determinaram excreção de 10-50% de linamarina na urina, após ingestão de farinha de mandioca. O cianeto, medido como excesso de tiocianato, variou entre 1% e 46% da ingestão total de linamarina.

Tylleskar et al. (1992) demonstraram que a alta concentração inicial de glicosídeos na raiz de mandioca desapareceu após tratamento adequado.

Segundo os autores, as quantidades de ácido cianídrico encontradas em produtos de mandioca são raramente maiores que  $5 \text{ mg HCN kg}^{-1}$ , em peso seco.

Os níveis de glicosídeos cianogênicos em raízes frescas estão por volta de  $1500 \text{ mg}$  equivalentes de  $\text{HCN kg}^{-1}$  em peso fresco (O'Brien et al., 1992). Esses níveis estão 150 vezes acima do limite de segurança, preconizados pela FAO que é de  $10 \text{ mg HCN/kg}$  em peso fresco. Se  $0,5 \text{ kg}$  de raízes frescas são consumidas sem processamento diariamente, o potencial de ingestão de cianeto é de  $30 \text{ mmol}$  por 24 horas, muitas vezes maior que a dose letal. Essas discrepâncias ilustram quão crucial é a elucidação dos níveis de toxicidez na ingestão de cianeto em produtos com altos níveis cianogênicos.

Existem muitas diferenças entre os níveis considerados seguros para consumo de produtos de mandioca recomendados pelo Codex Alimentarius da FAO/WHO (1988), citado por Dantas (2000) de  $10 \text{ mg}$  do “conteúdo total de ácido cianídrico por  $\text{kg}$  de peso seco” e de  $10 \text{ mg}$  de  $\text{HCN/100g}$  em peso fresco ( $300 \text{ mg}$  de equivalentes de  $\text{HCN}$  por  $\text{kg/peso seco}$ ) usados para classificar variedades com pouco cianeto (Hahn & Keyser, 1985). Os limites do Codex Alimentarius não diferenciam o tipo de composto cianogênico que pode estar presente.  $\text{HCN}$  não é o único cianogênico e geralmente está em quantidade muito pequena.

Segundo Rosling (1988) há uma relação causal entre a ingestão de cianeto da mandioca e intoxicação aguda. Mas o conhecimento sobre as doses de exposição e graus de susceptibilidade que poderiam induzir ou agravar os sintomas

ainda é incerto. Existe dificuldade em estabelecer ou excluir a relação causal entre exposição ao cianeto da mandioca e doenças neurológicas, como a ataxia tropical neuropática e outras doenças humanas. Diversas razões dificultam esses estudos tais como as limitações éticas em populações humanas, técnicas que possibilitam essas investigações e a necessidade de se utilizar marcadores bioquímicos.

Os níveis séricos de cianeto medem os efeitos combinados aos graus de exposição e destoxificação, embora reflitam a exposição durante as últimas horas (Lundquist et al., 1987). Quase todo o cianeto no sangue é constituído pela fração metabolicamente inerte que é reversivelmente transformada em metahemoglobina. O nível de metahemoglobina determina o nível de cianeto no sangue quando de um efeito tóxico e a correlação entre os níveis de cianeto sérico e sintomas de intoxicação. Entretanto, o nível fisiológico de cianeto é de 0,3  $\mu\text{mol/L}$  e os sintomas de intoxicação aguda devem ser cem vezes maiores (Rosling, 1994).

Diversas doenças têm sido associadas aos efeitos tóxicos da mandioca. Há evidências que alguns tipos de paralisia são causados por efeitos combinados de alta concentração de cianeto e baixa ingestão de aminoácidos sulfurados.

Revisões sobre os efeitos da cianogênese na saúde humana demonstram que essa é uma área de controvérsia científica (Wigg, 1993). Uma das razões é indubitavelmente a limitação de métodos analíticos na medicina.

## **2.3. Efeitos da Ingestão do Glicosídeos Cianogênicos**

### ***2.3.1. Intoxicação aguda***

O consumo de raízes de mandioca insuficientemente processadas pode causar intoxicação aguda. Os sintomas iniciam-se poucas horas após a ingestão e incluem, náusea, vômito, dispnéia, ocasionalmente levando à morte. Vários membros de uma mesma família são afetados de formas diferentes e todos os sintomas desaparecem em 12-24 horas não deixando seqüelas (Mlingi et al., 1992). Segundo Rosling (1988) apenas um caso de intoxicação aguda foi registrado em Lagos, quando três pessoas morreram após consumo de farinha de mandioca e os níveis de tiocianato foram de 34 a 54  $\mu\text{mol/L}$  quando o normal é de 1  $\mu\text{mol/L}$ , embora os níveis letais estejam acima de 100 $\mu\text{mol/L}$ .

Sintomas de intoxicação aparecem de 4-6 horas após ingestão de produtos não processados ou processados inadequadamente (Ministry of Health, Mozambique, 1984). Casos fatais são reportados em crianças pequenas que consumiram raízes cruas sem supervisão de familiares. Os sintomas iniciam-se rapidamente algumas horas após a ingestão e consiste de vertigens, vômito, colapso e, em alguns casos, morte em uma ou duas horas. Hospitais em áreas endêmicas utilizam injeções de tiosulfato que converte cianeto em tiocianato e aumenta o teor de destoxificação (Rosling, 1984).

### ***2.3.2. Desordens neurológicas***

As evidências de que o fator tóxico da mandioca é um fator causador de algumas desordens neurológicas que afetam a medula espinal são fortes, porém não conclusivas.

A ingestão de cianeto da mandioca foi indicada como um dos fatores causadores de duas neuropatias nutricionais, a neuropatia ataxica tropical, na Nigéria (Osuntokun, 1981) e parapesia espástica epidêmica em Moçambique (Ministry of Health, Mozambique, 1984).

Existem também doenças possivelmente relacionadas com intoxicação por glicosídeos cianogênicos que são:

### ***2.3.3. Bócio endêmico***

A glândula tireóide produz hormônios que regulam o metabolismo. Quando a ingestão diária de iodo é insuficiente, a tireóide retira o máximo de iodo do sangue.

Extensos estudos no Zaire estabeleceram que o bócio e o cretinismo, devido à deficiência de iodo, eram agravados quando o consumo de cianogênicos se estabelecia. O tiocianato tem uma molécula semelhante ao iodo e interfere no metabolismo da tireóide (Bourdoux, 1978). Populações no noroeste do

Zaire, com ingestão muito baixa de iodo e com adição de altos níveis de tiocianato, resultante do consumo de mandioca processada inadequadamente, sofreram de severo bócio endêmico e alta prevalência de cretinismo. Quando essa população foi tratada com suplementação de iodo intramuscular, o problema do bócio decresceu consideravelmente (Ermans et al., 1982) um efeito encontrado em outras populações africanas (Hershman & Sharp, 1983).

#### ***2.3.4. Diabetes tropical***

Dois tipos de diabetes são mundialmente conhecidos. Outro raro tipo de diabetes parece ocorrer nos trópicos e também chamado de tropical ou diabetes relacionada a má nutrição, caracterizada por um alto requerimento de insulina mas resistente à cetose (coma diabético). Afeta os adolescentes alimentados com dietas pobres. A distribuição geográfica coincide com o consumo de mandioca. A exposição ao cianeto foi proposta como possível causa e a teoria teve suporte por experimentos com animais (McMillan, 1979).

#### ***2.3.5. Malformações congênitas***

Em animais experimentais expostos ao cianeto da mandioca, houve aparecimento de malformações congênitas (Frakes & Raghubir, 1985). Essa relação não foi estudada em seres humanos. Uma conclusão realista leva a crer que

esse fato deve possivelmente ser causado por compostos cianogênicos, mas em casos muito raros.

A toxicidade da mandioca e seus subprodutos estão associadas ao cianeto livre, cuja dose letal é de 50 a 60 mg. (FAO, 1988, citado por Dantas, 2000).

Quando 10 g de amigdalina foram administradas parenteralmente em humanos, não houve sinal de intoxicação. Entretanto, quando a dose foi oral, o potencial tóxico se manifestou. (Eyerly, 1976). A dose oral pode ser 40 vezes mais tóxica que a parenteral, provavelmente pela ação de HCN livre liberado pela  $\beta$ -glucosidase presente no intestino (Dorr & Paxinos, 1978).

Segundo Solomonson (1981) a dose letal de amigdalina ingerida para o homem está entre 0,02 - 0,03 mmol/kg peso. Se levarmos em consideração que a dose letal de HCN para o homem é de 100 - 200 mg, cerca de 10 - 20 kg de mandioca (10-20 mg cianeto/kg) deveria ser consumida para produzir toxicidade (Oke, 1980).

Diversos autores relacionam o consumo de mandioca e subprodutos por populações africanas com ataxia neurotropical (ANT), bócio e cretinismo (Delange et al., 1994; Akintonuva et al., 1992; Kamalu, 1991; Conn, 1979). Dados da FAO (1988), citado por Dantas, (2000), indicam que essas alterações foram observadas na Nigéria a partir da década de 1930, em áreas de intenso plantio e consumo de mandioca, a maior fonte de carboidratos local.

Houve evidências de aumento da exposição ao cianeto em membros das famílias onde os casos foram relatados. Entretanto não houve evidências de alterações nos níveis protéico-calóricos e a transferrina sérica, indicador do nível protéico, era normal. Os níveis plasmáticos de cálcio, fosfato, sódio, potássio, bicarbonato e colesterol eram normais, bem como as funções hepáticas, renal e da tireóide. Entretanto os níveis de riboflavina eram deficientes. De acordo com Osuntokun (1981) o consumo diário de derivados de mandioca em áreas endêmicas de ANT na Nigéria é maior que 50 mg, coincidindo também com alta incidência de bócio.

Baseado em diversos estudos em consumidores humanos de mandioca e outros alimentos ricos em glicosídeos cianogênicos, há evidências que a intoxicação crônica, combinada com ingestão deficiente de riboflavina e/ou proteína de baixa qualidade, mais deficiência de metionina são responsáveis pela etiologia da ANT que, em combinação com deficiente ingestão de iodo leva ao aparecimento do bócio (Oke, 1979, 1980).

Embora existam evidências experimentais entre o consumo de dietas contendo glicosídeos cianogênicos e doenças como ANT, bócio, cretinismo e retardo mental, o mecanismo de ação do cianeto e tiocianato na célula ainda não foi bem compreendido (Nartey, 1980).

Jackson (1994), baseado em pesquisas na Libéria e África Tropical úmida, sugere que a dieta contendo mandioca pode influenciar a distribuição de certos genes da hemoglobina, alterar processos metabólicos como neoglicogênese, funções

enzimáticas, sobre a atividade dos hormônios da tireóide e retardando o desenvolvimento e crescimento humanos.

A literatura reporta poucos trabalhos com linamarina sintética e nenhum com linamarina extraída. Oke (1980), observou que dose de 250 mg de linamarina sintética/kg causaram sinais clínicos de intoxicação em ratos com deficiência de metionina. Barret et al. (1977) relataram a morte de 7 em 10 ratos tratados com 50 mg de linamarina sintética/kg através de gavagem.

Hamsters com doses orais de 100, 120 e 140 mg linamarina sintética/kg, através de gavagem, apresentaram sinais clínicos compatíveis com intoxicação por HCN. Dois animais com dose de 140 mg/kg e um, com dose de 120 mg/kg morreram após 2 horas. Não houve relação entre grau de intoxicação e dose (Frakes et al., 1985).

Parece existir diferenças na destoxificação de glicosídeos cianogênicos de acordo com a espécie. Ruminantes tendem a ser mais susceptíveis aos efeitos de intoxicação aguda pela presença da flora ruminal e a considerável quantidade da enzima emulsina que hidrolisa os clicosídeos (Oke, 1979).

Sobre o processo de destoxificação do cianeto no organismo, Oke (1973), em revisão sobre o assunto, descreveu que parece haver uma pequena atividade de  $\beta$ -glicosidase no intestino delgado dos ratos, que decresce a níveis mínimos após 21 dias de idade. A pequena quantidade de hidrolise ocorre quando os glicosídeos cianogênicos são ingeridos por ratos e realizada pela flora intestinal e a maior parte é

excretada livremente na urina (Spatz, 1968). Isso poderia explicar porquê a  $DL_{50}$  parenteral em ratos é maior que a  $DL_{50}$  oral. Barret et al. (1977) determinaram dose letal oral de 50 mg de linamarina que matou todos os 10 ratos com peso de 100 g. Quando a dose foi de 30 mg nenhuma linamarina foi detectada no sangue ou nas fezes, mas 5,65 mg foram detectados na urina (0,743 mg de tiocianato equivalente a 7,1 mg de linamarina). Após 72 horas encontrou 12,75 mg de linamarina e o restante deve ter sido absorvido intacto ou parcialmente hidrolisado e os produtos absorvidos e/ou eliminados nas fezes ou mesmo, a quantidade no sangue foi muito pequena para ser detectada no sangue.

Se assumirmos que de 100 a 200 mg de cianeto é a dose letal para o homem, então mais de 10 a 20 kg de mandioca deveriam ser consumidos para produzir intoxicação. De acordo com Hill (1977), somente cerca de 25% do glicosídeo ingerido é hidrolisado (e provavelmente cerca de 20% excretado sem alterações); então a quantidade para constituir a dose letal deve ser muito alta.

Oke (1980), acredita que, estritamente falando, o cianeto não constituiria um perigo para população consumidora e seus subprodutos pois sabendo-se dos princípios tóxicos, essas populações desenvolveram diferentes métodos de eliminação tais como fervura em água, secagem, fermentação, etc.

## 2.4. Efeitos dos Glicosídeos Cianogênicos nos Animais

Como já relatado anteriormente todos os glicosídeos cianogênicos apresentam perigo em potencial pela produção de HCN. Existem diferenças na sensibilidade a doses letais em diferentes espécies animais, bem como no grau de produção de HCN (Vetter, 2000).

Tungrakanpoung & Rhienpanish (1992) relatam um caso de intoxicação por *Mimosa invisa* var *inermis* que causou a morte de 22 búfalos. O óbito ocorreu entre 18 a 36 horas e os sintomas incluíram salivação, tremores musculares, dispnéia, decúbito lateral e o exame histopatológico revelou congestão e hemorragia com petéquias no coração, fígado, rins, pulmões, rumem e intestinos.

Investigando envenenamento agudo por HCN em ovelhas, Gajendeagad et al. (1992) observaram congestão de todos os órgãos, neurônios degenerados, com degeneração nuclear das células da glia e células de Purkinje e de Golgi, além de cromatose dos neurônios motores. Todas as lesões compatíveis com anóxia.

Em experimento com dietas à base de mandioca contendo HCN administradas a suínos, Iyayi (1994) relatou que ganho de peso, ingestão de alimento, conversão alimentar e eficiência protéica não foram alterados. Albumina sérica e proteínas totais permaneceram estáveis, mas os níveis de uréia aumentaram significativamente com aumento da ingestão de HCN.

Panigraki et al. (1992) examinaram o efeito de farinha de mandioca proveniente de raízes submetidas a diferentes tempos de secagem sobre desempenho de frangos de corte. Os animais alimentados com amostras secas por mais tempo apresentaram maior peso corporal o que leva a crer que o tempo de secagem maior das raízes produz farinhas com menor concentração de glicosídeos cianogênicos.

Em cães, Ibebunjo et al. (1992) e Kamalu (1993) observaram que o aumento da concentração de gari na dieta aumentou a concentração plasmática de tiocianato e aumentou a excreção urinária de proteína com diminuição da albumina sérica.

O efeito diabetogênico da linamarina de mandioca em cães foi estudado por Ragoobirsingh et al. (1993). O glicosídeo levou a alterações nas concentrações de insulina e a quantidade de leucócitos foi significativamente menor que no grupo controle com valores muito altos de glicose.

Kamalu (1993) encontrou vacuolação no fígado, túbulos proximais e ruptura de células epiteliais em cães alimentados com gari. O edema celular foi consequência direta da ação da linamarina como glicosídeo. Proteinúria ocorreu antes da primeira semana e os rins apresentaram nefrose. O mesmo autor, em 1991, revelou uma elevação anormal da atividade da lipase pancreática e hemorragia, necrose, fibrose e atrofia do pâncreas. De acordo com uma nova hipótese de Kamalu (1993), a linamarina proveniente da mandioca causa inibição da Na-K-ATPase, levando a um desbalanço eletrolítico com depleção de potássio que leva ao quadro de vacuolação e

ruptura das células epiteliais dos túbulos proximais, resultando em proteinúria e diminuindo a concentração de albumina sérica.

## **2.5. Mecanismos de Remoção de Glicosídeos Cianogênicos da Mandioca**

Embora rica em carboidratos, a mandioca é freqüentemente relacionada como alimento inferior pela baixa quantidade de proteína e pela presença de cianeto considerado fator antinutricional (Conn, 1979; Oke 1980).

O consumo de folhas não é tão comum como o de raízes e o alto teor em fibras e cianeto restringe seu uso na alimentação humana (Padmaja, 1995). Entretanto, Lancaster & Brooks (1983) observaram consumo de aproximadamente 500 g de folhas frescas/per capita no Zaire. Sendo ricas em proteínas, são bastante utilizados na alimentação de animais.

Os níveis de compostos cianogênicos nas raízes variam de 15 a 100 mg HCN/kg peso fresco (Coursey, 1973). Ocasionalmente, são encontrados variedades com altos teores de cianeto (1300 a 2000 mg/kg) (Dufour, 1988). A maior parte do cianeto encontra-se na casca e nas folhas, tendo a parte comestível da raiz, os menores concentrações.

A toxidez da mandioca aparece com a liberação de ácido cianídrico (HCN) durante a hidrólise dos glicosídeos cianogênicos pelas glicosidases da microflora intestinal (Fukuba et al., 1984). O HCN também pode ser gerado “in

vivo” pelas glicosidases do fígado e outros tecidos causando citotoxicidade “in situ” (Padmaja, 1989).

Doses de 50 a 100 mg de HCN são reportadas como letais para o homem adulto (Halstron & Moller, 1945). O envenenamento agudo está relacionado com o consumo de produtos processados inadequadamente. (Cheok, 1978).

Embora os tipos de processamento sejam diferentes para cada produto, eles permitem a interação entre os compostos cianogênicos e as glicosidases com liberação de HCN. Este, sendo termolábil é liberado no ar ou dissolvido na água. (Padmaja, 1995). É praticamente impossível remover todo HCN durante o processamento; então o cianeto residual assume extrema importância nos produtos processados (Oke, 1983). O cianeto residual pode estar na forma de glicosídeo, cianohidrinas ou cianeto livre e a extensão de sua retirada depende do processamento (Padmaja, 1995). Mlingi et al. (1992) observou que raízes secas rapidamente geraram farinha com altos teores de HCN. Em produtos envolvendo fermentação, as cianohidrinas intermediárias ficaram retidas em grande concentração (Tylleskar et al., 1992). Rosling et al. (1992), reportaram que as cianohidrinas residuais em produtos mal processados eram a maior fonte dietética de cianeto.

Os fatores controladores da hidrólise de glicosídeos cianogênico bem como da liberação de cianohidrinas durante o processamento da mandioca são fundamentais para a elucidação do mecanismo de intoxicação no homem e nos animais. Mais que isso, quantificar as várias formas de cianeto na mandioca e seus

produtos é essencial para se determinar a eficiência dos métodos de processamento (Padmaja, 1995).

O processamento eficiente da mandioca pode eliminar compostos cianogênicos em produtos alimentícios. Essa remoção é facilitada pela hidrólise da linamarina por maceração do tecido (Cock, 1985), adição de linamarase exógena (Padmaja et al., 1993), fermentação por bactérias ou pela produção de plantas transgênicas com alto teor de linamarase.

## **2.6. Técnicas de Processamento de Raízes de Mandioca**

Segundo Coursey (1973) os métodos de processamento nas raízes seriam constituídos de secagem ao sol, cozimento, fervura, torrefação e fritura, fermentação espontânea ou por inoculação:

Diversos trabalhos analisaram o efeito da secagem ao sol sobre a concentração de HCN (Cock, 1985; Nweke, 1994; Essers et al., 1995). Em primeiro lugar deve haver o contato linamarina-linamarase obtido com a desintegração da estrutura celular (picagem, moagem). Depois, tratamento pelo calor e pH adequado. Pieris et al. (1974) encontraram altos níveis de cianogênicos residuais em raízes secas ao sol, sugerindo ineficiência do processo.

O grau de desidratação depende da mistura, tamanho da partícula do material, da umidade e temperatura do ar, radiação solar e vento (Essers et al.,

1995). Segundo esses autores a secagem ao sol, não é eficiente na remoção de linamarina e, quanto menores os pedaços, maior a quantidade de HCN. Segundo os autores esse método poderia ser utilizado em variedades com baixo teor de glicosídeos cianogênicos.

Em diversas partes da Índia, Sri Lanka e América do Sul, as raízes são consumidas após picagem em pequenos pedaços e cozimento em água, sendo também esse o método utilizado para destoxificação na Nigéria (Almazan, 1988). Diversos autores relataram que o efeito do tempo de fervura é proporcional à remoção de cianeto (Ezeala & Okoro, em 1986; Cooke & Maduagwu em 1978; Fukuba et al., 1984). Nambisan & Sundaresan (1985), determinaram que 70% do cianeto foi retirado quando a proporção raiz/água foi de 1:1 e apenas 24%, quando 1:5.

Bourdoux et al. (1982) determinaram que a lavagem das raízes em água por um dia levar a um decréscimo de cianeto de 108,2 mg/kg para 59,5 mg/kg enquanto que a lavagem por cinco dias reduziu para 2,9 mg/kg. Cooke & Maduagwu (1978), entretanto, obtiveram resultados pouco expressivos. Esse método é o mais comum na preparação de inúmeros produtos de mandioca na África.

O simples ato de descascar a raiz, reduz em 50% o teor de HCN, já que é na entrecasca que estão os maiores níveis. (Tewe, 1991). Os índios Tukanoan, da Amazônia, consomem uma variedade com alto teor de HCN (311 a 583 mg/kg peso fresco). Antes do cozimento as raízes são cortadas de maneira que parte da película

interna entre em contato com a polpa, aumentando a ação da linamarase sobre o cianeto ligado (Dufour, 1988).

Durante a extração do amido, grande parte do cianeto ligado é convertido em cianeto livre no processo da moagem e lavagem (Arguedas & Cooke, 1982). Segundo esses autores, considerável redução no cianeto total foi observada com 1 hora de moagem com água para lavagem. Após 3 dias de sedimentação, a concentração de HCN caiu para 4%. Como o amido é base para numerosos produtos alimentícios, seu teor de cianeto residual é importante.

Houve um aumento, mais recentemente, no uso de farinha de mandioca. (Kim et al., 1968; Hudson & Ogunsua, 1976). Segundo Ogunsua (1989), pães feitos com farinhas provenientes de variedades com baixos teores de cianeto não apresentaram cianeto residual, enquanto aqueles feitos à base de farinhas com altos teores, continham 0,54 mg/kg/matéria seca.

Almazan (1986) descreveu que preparados frescos a partir de farinha de mandioca continham mais cianeto (59 a 406 mg/kg matéria seca) que aqueles estocados (24 a 67 mg/kg matéria seca). O mesmo autor determinou que o branqueamento de pedaços de mandioca em água salgada fervente por 4 a 5 min, antes da fritura, causou decréscimo de 63 a 64% na concentração de cianeto.

A ensilagem de raízes para alimentação animal preserva o valor nutricional e aumenta a vida útil do produto. (Padmaja, 1995; Gomez & Valdivieso, 1988 e Tewe, 1991). Os autores observaram que durante a ensilagem, o teor de cianeto

foi reduzido a partir da primeira semana. Entretanto outros estudos provaram que a redução foi resultante da lixiviação dos glicosídeos e cianeto livre através da grande quantidade de silagem produzida.

A fermentação microbiana tem sido utilizada em diversas partes do mundo para melhorar a palatabilidade, o valor nutritivo pela adição de proteínas e reduzir fatores tóxicos (Padmaja, 1996). Produtos fermentados de mandioca são extensivamente produzidos na África, América Latina, Filipinas e Indonésia. Além do baixo risco de toxicidade, esses produtos apresentam melhores condições de estocagem pela formação de ácidos orgânicos durante a fermentação. (Tewe, 1991; Bokanga, 1994).

Num estudo sobre redução de níveis de glicosídeos cianogênicos por fermentação com fungos, Esser et al. (1995) inocularam linhagens de *Geotrichum candidum*, *Mucor racemosus*, *Neurospora sitophila*, *Rhizopus arryzae*, *Rhizopus stolonifer* e *Bacillus* sp. A redução dos glicosídeos foi bastante significativa e a principal função dos microrganismos no processo foi de degradar as estruturas celulares, promovendo contato entre linamarase endógena e o glicosídeo. Segundo os autores a remoção de substâncias cianogênicas por fermentação é mais efetiva que somente por secagem solar e pode ser usado em variedades com altos teores de cianogênicos.

Em pesquisa sobre destoxificação microbiana de manipueira, Pantaroto et al., (2000) determinaram que 8 culturas (6 bactérias e 2 leveduras)

apresentaram-se hábeis ao desenvolvimento em meio com linamarina, isto é, degradando-a e apresentando potencial de aplicação na destoxificação de manipueira.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Linamarina**

Linamarina de raízes de mandioca de uso industrial, de cultivar desconhecido, fornecidas pela Plaza Indústria e Comércio Ltda., foi cedida pelo Laboratório do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (C.P.Q.B.A.) da UNICAMP apresentando grau de pureza de 87,3%.

#### **3.2. Animais**

Foram utilizados 25 ratos machos, *Rattus norvegicus* var. *albinus*, Rodentia, Mammalia, da raça Wistar, com peso médio de 120 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu, UNESP, transferidos para o Biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), do Instituto de Biociências, Botucatu,

UNESP. Para permitir aclimatação, os ratos foram mantidos em gaiolas plásticas, recebendo dieta basal (PURINA-Labina) e água "ad libitum" com 12 horas de período claro e 12 horas de escuro, em temperatura de 23°C durante sete dias.

### **3.3. Lotes Experimentais**

Após o período de aclimatação e jejum de 12 horas, foram administradas aos grupos experimentais, soluções aquosas recém preparadas de linamarina com 87,3% de pureza.

Essas soluções foram preparadas de acordo com o peso de cada animal, para obter-se concentrações em mg/kg peso vivo de 87,3 (grupo 1); 174,6 (grupo 2); 349,2 (grupo 3) e 698,4 (grupo 4); equivalentes a doses de 100, 200, 400 e 800 mg/linamarina/kg. O grupo 5 recebeu água destilada para simulação da situação de estresse. As soluções foram administradas através de gavagem com volume nunca excedendo 1,5 ml/animal.

### **3.4. Obtenção das Amostras**

Após a administração das soluções de linamarina, os animais foram observados quanto à ocorrência de mortes ou sinais de intoxicação por 4 horas.

Os animais mortos foram necropsiados e retirados os seguintes órgãos para exames histopatológicos: cérebro, coração, pulmões, rins, fígado, pâncreas, intestino delgado, músculo estriado e baço.

Os sobreviventes foram observados por 14 dias quando, após inalação com éter, foram decapitados, os órgãos alvo retirados e colhidas amostras de sangue, imediatamente centrifugado e congelado a  $-18^{\circ}$  C, para determinação de proteínas totais, albumina, glicose e atividade das enzimas alanina transaminase (EC 2.6.1.2), aspartato transaminase (EC 2.6.1.1) e lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27).

### **3.5. Cálculo da Dose Letal Oral (DL<sub>50</sub>) de Linamarina**

As doses foram administradas aos grupos experimentais, em progressão geométrica (razão 1,3). Os resultados foram interpretados pelo método de Weill (1952):

$$\log m = \log \Delta + [d(f + 1)], \text{ onde:}$$

$m$  = dose mediana e efetiva

$\Delta$  = menor dose utilizada

$d$  = relação entre doses sucessivas

$f$  = constante de interpolação de duas médias para obtenção de  $m$

1. Obtido o log de  $m$ , calcula-se seu antilog para chegar à dose efetiva em mg/kg

2. Limites fiduciais ou intervalo de confiança

$|\text{LF} = \text{antilog} / \log m \pm 2.d.\delta f|$ , onde:

$d = \log$  da relação entre doses

$\delta f =$  desvio padrão do  $\log m$

### **3.6. Determinações Bioquímicas no Soro**

#### **3.6.1. Proteínas Totais**

Através da reação de Biureto, as ligações peptídicas reagem com o íon cúprico em meio alcalino, formando complexo de cor violeta, cuja intensidade é proporcional à concentração de proteínas da amostra. (Celm, s.d.)

#### **3.6.2. Albumina**

A albumina reage especificamente com a forma aniônica do Verde de Bromocresol em presença de excesso de corante em meio tamponante em pH 3,8. (Celm, s.d.)

### **3.6.3. Glicose**

Pelo método enzimático (glicose oxidase) colorimétrico, a glicose forma ácido glucônico e água oxigenada, liberando cromógeno de coloração vermelha. (Celm, s.d.)

### **3.6.4. Alanina Transaminase (EC 2.6.1.2)**

Enzima citoplasmática com maior atividade no tecido hepático, sua atividade é medida pelo consumo de NADH (Wilkinson et al., 1972).

### **3.6.5. Aspartato Transaminase (EC 2.6.1.1)**

Amplamente difundida, principalmente no tecido muscular esquelético, renal, cerebral e hepático. Sua atividade é medida pela quantidade de NADH consumida na reação (Wilkinson et al., 1972).

### **3.6.6. Lactato Desidrogenase (EC 1.1.1.27)**

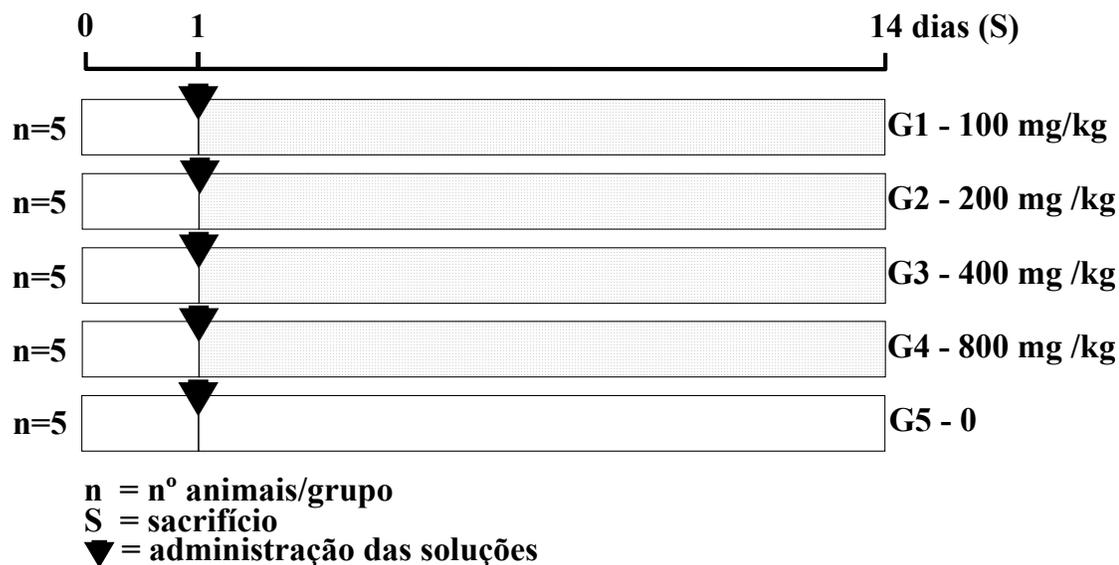
Encontrada no coração, fígado, músculo esquelético e rins, sua atividade é determinada pelo consumo de NADH na reação  $\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Lactato} + \text{NAD}^+$ . (Wilkinson et al., 1972).

### 3.7. Histopatologia

Após a morte dos animais, os órgãos foram retirados e conservados por 24 horas em formol 10%, lavados em água corrente “over night” e transferidos para solução de álcool 70% para posterior processamento. O método de coloração das lâminas foi de Hematoxilina & Eosina.

Esses procedimentos foram realizados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP, Campus de Botucatu.

### 3.8. Delineamento Experimental



### **3.9. Análise Estatística**

Para a comparação dos grupos em relação às variáveis estudadas, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis quando as variáveis não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade de variâncias (Gomes, 1984). Para as variáveis com distribuição normal, realizou-se a Análise de Variância e quando detectou-se diferença entre os grupos, utilizou-se o teste de Student–Newman–Keuls (SNK) (Gomes, 1984). O nível de significância adotado foi 5%. A análise foi realizada no Departamento de Bioestatística, IB.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DL<sub>50</sub>

O estudo da toxicidade oral a curto prazo permite conhecer o potencial de letalidade da substância-teste, ou seja, a dose que mata 50% dos animais de cada grupo e a função dose-resposta. As mortes ocorridas dentro das primeiras 24 horas após o tratamento são devidas, provavelmente ao efeito tóxico da substância, seja ele direto ou indireto. Os sinais que se manifestem após esse período, podem dar alguma indicação do efeito que a substância pode ter em concentrações mais baixas, quando administradas por períodos de tempo mais longos. (Burtis & Ashood, 1996).

No presente estudo, a DL<sub>50</sub> de linamarina foi de 324,86 ±1,5 mg/kg.

Os sinais clínicos de toxicidade iniciaram-se 50 minutos após a administração das soluções. Independentemente do volume fornecido, os animais

sensíveis à linamarina tornaram-se inicialmente apáticos, procurando isolar-se uns dos outros, os pêlos tornaram-se eriçados e apresentaram ligeira dispnéia. Cerca de 90 minutos após ingestão das soluções, nesses animais a dispnéia tornou-se evidente, com aparecimento de tremores musculares e ataxia. Neste instante todos os animais sintomáticos apresentaram decúbito lateral e apáticos, quando estimulados; as mucosas oral e nasal tornaram-se arroxeadas. O tempo máximo para óbito foi de 4 horas.

Os animais que receberam doses menores e aqueles mais resistentes não apresentaram quaisquer alterações de comportamento.

No Quadro 1 está o número efetivo de animais utilizados para o cálculo da DL<sub>50</sub>.

Quadro 1. Número efetivo de animais

Grupos	Óbitos	Número Efetivo
1- 100 mg	0	5
2- 200 mg	1	4
3- 400 mg	3	2
4- 800 mg	5	0
5- Controle	0	5

A literatura não cita trabalhos sobre doses letais de linamarina (Barret et al., 1997) determinaram que a dose de 50 mg de linamarina pura sintética foi letal para 7 ratos de um grupo de 10 com peso de 100 g, quando submetidos a soluções orais de linamarina diluídas em 0,5 ml de água destilada.

Frakes et al. (1985) forneceram doses orais de 100, 120 e 140 mg de linamarina sintética/kg a hamsters com 90 g de peso. Os sinais de intoxicação iniciaram-se uma hora após a administração das soluções e incluíram dispnéia ataxia, tremores e hipotermia. Dois animais com doses de 140 mg/kg e um animal com dose de 120 mg/kg morreram após 2 horas.

Esses resultados estão abaixo dos determinados por Lopes e Nascimento (1999) num experimento sobre  $DL_{50}$  de linamarina sintética pura da marca SIGMA em camundongos, cujo resultado foi de 195 mg/kg. Segundo Willhite (1982) hamsters tem se demonstrado mais susceptíveis que ratos e camundongos aos efeitos tóxicos dos glicosídeos amigdalina e prunasina. Ruminantes, como bovinos e ovelhas são supostamente mais sensíveis aos efeitos tóxicos de glicosídeos cianogênicos pela presença da flora microbiana ruminal e das consideráveis quantidades da enzima emulsina que hidrolisa os glicosídeos. (Oke, 1979). Em estudo com frangos de corte, cujas rações eram adicionadas de 0, 10, 20 e 30% de farinha de mandioca com alto (300 mg HCN/kg) e baixo (156 mg HCN/kg) teor de cianeto, Gomez et al. (1988), determinaram que dietas com baixos teores de cianeto não afetaram os animais, mas o grupo que recebeu 30% de farinha com alto teor apresentou aumento da mortalidade. Esse quadro parece ter sido agravado pela contaminação com aflatoxina. Os autores concluíram que frangos de corte são tolerantes a quantidades relativamente altas de glicosídeos cianogênicos.

O presente estudo é de extrema importância pois pela falta de informações quantitativas toxicológicas e epidemiológicas, um nível de segurança na

ingestão de glicosídeos cianogênicos não pode ser estimado (Dantas, 2000). Por isso o Codex Standard for Edible Cassava Flour (1995) concluiu que o nível de 10 mg/kg de HCN não está associado a intoxicação aguda.

Deve-se considerar também que, em estudos sobre toxicidade aguda no homem as concentrações letais são representadas pelo teor de cianeto e não do glicosídeo ingerido. De acordo com Eyerly (1976) a dose oral de amigdalina pode ser até 40 vezes mais tóxica que a dose parenteral. Isso deve ser pela provável liberação de HCN liberado pela  $\beta$ -glicosidase intestinal (Dorr & Paxinos, 1978). Segundo Solomonson (1981) a dose letal de amigdalina oral para o homem está entre 0,02 e 0,13 mmol/kg. Se isso for assumido como verdadeiro, cerca de 100 a 2000 mg HCN é a dose letal então mais de 10 a 20 kg de mandioca (10 a 20 mg HCN/kg), deveriam ser consumidos para produzir toxicidade (Oke, 1980). Indivíduos bem nutridos que consumiram quantidades razoáveis de amigdalina (1000 mg) por longos períodos não apresentaram sinais de intoxicação (Oke, 1979).

A literatura cita diferenças na sensibilidade de diferentes espécies animais na dose causadora dos sintomas de envenenamento e no grau de produção de cianeto a partir de glicosídeos cianogênicos. Na maioria dos estudos em animais e plantas, a toxicidade dos glicosídeos cianogênicos é frequentemente expressa como mg/HCN liberado. Doses letais de cianeto, expressas em mg/kg peso vivo foram determinados como 3,7 em camundongos; 4,0 em cães; 2,0 em gatos e 2,0 em bovinos e ovinos (Conn, 1979, citado por Dantas, 2000).

Considerando-se que 1 mol de linamarina ( $C_{10}H_{17}NO_6$ ) libera 1 mol de HCN e que a  $DL_{50}$  determinada foi 324,86 mg/kg linamarina, a quantidade teórica de cianeto liberado foi de 35,35 mg, portanto muito além dos níveis recomendados.

Pelo exposto, sugerimos a continuação dos estudos, pesquisando-se os efeitos biológicos da linamarina em experimentos de longa duração.

## **4.2. Determinações Bioquímicas no Soro**

### **4.2.1. Aspartato Transaminase (EC 2.6.1.1)**

No Quadro 2 estão representados os valores médios de atividade da enzima aspartato transaminase dos animais tratados com linamarina e do grupo controle. A atividade da AST foi mais elevada no grupo 1 (87,3mg/kg linamarina) em comparação aos outros grupos. Este fato não pode ser atribuído ao efeito do glicosídeo cianogênio sobre esse parâmetro bioquímico, pois os grupos 2 (174,6 mg/kg linamarina) e 3 (349,2 mg/kg linamarina), embora recebendo doses maiores de linamarina, apresentaram resultados médios próximos entre si e dentro da normalidade para o método.

Quadro 2. Média e desvio-padrão referente à variável aspartato transaminase, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.

Dose de Linamarina mg/kg de peso vivo	Média U/L	Desvio-padrão
87,3	26,8 <sup>b</sup>	5,9
174,6	18,8 <sup>a(1)</sup>	4,3
349,2	14,5 <sup>a</sup>	0,7
0,0	13,2 <sup>a</sup>	3,5

(1) Média seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Essa enzima encontra-se no citosol e mitocôndrias do fígado, músculo esquelético, coração, rins e hemácias, com aplicações clínicas no enfarto do miocárdio, doença hepática parenquimatosa e doença muscular. Elevações ligeiras de AST e ALT podem ser observados após a ingestão de álcool e administração de drogas, como apiáceos, salicilatos ou ampicilina. A embolia pulmonar pode elevar os níveis de AST em duas ou três vezes o normal e elevações ligeiras a moderadas (duas e cinco vezes o normal) são vistas na pancreatite aguda e doença hemolítica. (Burtis & Ashood, 1996).

Os valores de referência variam de acordo com o laboratório e temperatura de trabalho. No presente estudo, a temperatura de trabalho foi de 25° C considerando-se normais valores entre 2 – 19 U/L.

Não existem na literatura trabalhos referentes à ação de glicosídeos cianogênicos ou do cianeto sobre atividade enzimática em amostras séricas

ou teciduais. Observou-se neste estudo que os valores considerados normais foram encontrados no grupo controle e nos grupos 2 e 3 que receberam concentrações maior de linamarina. No grupo 1, a média determinada de 26,8 U/L está acima do normal para o método. Nesse grupo foram utilizados cinco animais para o cálculo da média o mesmo ocorrendo com o grupo controle. Comparando-se esses dois grupos observa-se que no 1º, a média dobrou em relação ao controle e o desvio padrão maior indica que o grupo foi heterogêneo. Embora a diferença tenha sido significativa, não se pode afirmar que esse efeito seja consequência da linamarina pois nos grupos que receberam doses maiores, embora com menor número de animais, os resultados foram normais. Considerando-se que o glicosídeo causou lesões hepáticas nos animais que morreram pelas maiores doses, deveria-se esperar aumento da dosagem enzimática naqueles dos grupos 2 e 3. Esses resultados indicam que há necessidade de repetição da pesquisa com maior número de animais para melhor avaliação do efeito da linamarina sobre esse parâmetro.

#### **4.2.2. Alanina Transaminase (EC 2.6.1.2)**

Os animais do grupo 2 (174,6 mg/kg linamarina) apresentaram os valores acima do padrão de atividade da enzima ALT (Quadro 3), embora não tenham sido observados diferenças estatísticas significativas entre os grupos estudados.

A alanina transaminase é a enzima mais específica do fígado sendo encontrada também no tecido cardíaco e músculo esquelético. Sua aplicação clínica se dá principalmente na doença hepática parenquimatosa. (Burtis & Ashood, 1996)

Quadro 3. Mediana, 1º e 3º quartis referentes à alanina transaminase, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.

Dose de Linamarina mg/kg de peso vivo	Mediana U/L	1º q U/L	3º q U/L
87,3	25,0 <sup>a(1)</sup>	19,5	29,3
174,6	38,0 <sup>a</sup>	29,0	39,0
349,2	17,0 <sup>a</sup>	16,0	18,0
0,0	18,0 <sup>a</sup>	17,5	19,5

<sup>(1)</sup> Valores de medianas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

No presente estudo, os valores considerados normais deveriam estar entre 2 e 25 U/L e os animais dos grupos 1 e 3, e do grupo controle apresentaram-se dentro da normalidade para o método.

Não se pode afirmar que o aumento da atividade da enzima, apresentado pelos 4 animais pertencentes ao grupo 2 seja resultado de uma ação da linamarina sobre o metabolismo hepático.

Neste caso, embora não estatisticamente diferentes, os resultados do grupo 2, estão bem acima dos demais. Na prática, as variações nos níveis da enzimas ALT e AST são geralmente concomitantes, pois ambas são indicadoras de

lesões hepáticas. No grupo 2, trabalhou-se com quatro animais que apresentaram resultados normais para AST.

Os resultados individuais nos grupos 1 e 2 foram muito heterogêneos. Pelos resultados observou-se que a linamarina não afetou os dois animais do grupo 3, cujos resultados estão muito próximo do controle. Como discutido anteriormente, seria necessário a repetição das análises com amostragem maior.

#### **4.2.3. Lactato Desidrogenase (EC 1.1.1.27)**

A principal causa da investigação da atividade da LDH no presente estudo foi à afirmação de que o cianeto causa diminuição na utilização de oxigênio pelos tecidos, produzindo um estado de anóxia histotóxica. Isto ocorre através da inativação da citocromo oxidase tecidual pelo cianeto que se combina com  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  presente na enzima. Além disso, o cianeto causa aumento dos níveis de lactato no sangue decorrente da mudança de metabolismo aeróbico para anaeróbico (EPA, 1990, citado por Dantas, 2000).

A LDH está presente em todas as células do organismo, sendo encontrada somente no citoplasma. Suas principais fontes são o coração, fígado, músculo esquelético, hemácias, plaquetas e linfonodos. Os valores podem estar ligeiramente elevados na congestão hepática, choque e anóxia. (Burtis & Ashood, 1996).

Os valores de LDH no soro de animais tratados com linamarina e do grupo controle estão representados no Quadro 4 e não diferiram estatisticamente.

Diante do exposto seria esperado um aumento na atividade da LDH e o que foi observado foram níveis abaixo do normal para o método em todos os grupos estudados, inclusive o controle.

Quadro 4. Mediana, 1º e 3º quartis referentes à lactato desidrogenase, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.

Dose de Linamarina mg/kg de peso vivo	Mediana U/L	1º q U/L	3º q U/L
87,3	62,0 <sup>a(1)</sup>	39,5	75,5
174,6	59,0 <sup>a</sup>	56,5	66,0
349,2	47,5 <sup>a</sup>	47,0	48,0
0,0	74,0 <sup>a</sup>	48,8	81,5

(1)Valores de medianas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ).

Portanto, não podemos concluir que a linamarina causou esse efeito nos animais. Concluímos que deve-se repetir a determinação de LDH pois essas alterações poderiam estar relacionadas com a metodologia empregada.

#### 4.2.4. Proteínas Totais (PT)

No Quadro 5 estão representadas as médias encontradas para proteínas totais nos animais tratados com linamarina e grupo controle, que não diferiram estatisticamente entre si.

Observou-se que para todos os grupos, inclusive o grupo controle, os valores estiveram abaixo dos considerados normais. Segundo o manual Animais de Laboratório (Purina, s.d.), o valor médio em soro de ratos é de 6,3 g/100 ml.

Mesmo estando fora dos padrões, podemos concluir que, no caso de dose única de linamarina, não houve interferência desse glicosídeo cianogênico sobre a concentração sérica de proteínas. Os resultados são concordantes com (Iyayi, 1994) que, num estudo sobre o efeito de dietas com mandiocas contendo baixa e alta concentração de cianeto, em suínos das raças Landrace e Large White, observou-se que ganho de peso, ingestão de alimentos, albumina sérica e proteína total não foram afetados.

Quadro 5. Média e desvio-padrão referente à proteínas totais, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.

Dose de Linamarina mg/kg de peso vivo	Média g/dL	Desvio-padrão
87,3	4,88 <sup>a(1)</sup>	0,18
174,6	5,38 <sup>a</sup>	0,84
349,2	4,95 <sup>a</sup>	0,50
0,0	5,32 <sup>a</sup>	0,30

(1) Média seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Olusi et al. (1979), num experimento com ratas albinas alimentados com diferentes formas de preparo da mandioca, observaram que nos grupos alimentados com dietas com 50% de gari os parâmetros bioquímicos e hematológicos não foram afetados. Entretanto, naqueles alimentados com mandioca crua e KCN em proporções de 5 e 10 g/100 g, houve decréscimo nos valores de hemoglobina, proteínas totais. Indicando que o tratamento adequado da mandioca reduz os riscos de intoxicação.

Num estudo semelhante, sobre reprodução de uma geração de ratos, os mesmos autores demonstraram que a geração F1 apresentou redução significativa dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

#### **4.2.5. Albumina (AB)**

Os valores de albumina estão no Quadro 6 indicando que não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

Como no caso anterior os níveis séricos de albumina estão abaixo do normal que variam de 3,5 a 4,8 g/dl. O manual Animais de Laboratório (Purina s.d), cita com valores de referência normal entre 3,4 a 4,3 g/100 ml para ratos.

Sendo a proteína mais abundante do plasma, a albumina representa 40 a 60% da proteína total. É sintetizada no fígado a uma velocidade que depende da ingestão de proteína. (Miller, 1988).

Quadro 6. Mediana, 1º e 3º quartis referentes à albumina, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.

Dose de Linamarina mg/kg de peso vivo	Mediana g/dL	1º q g/dL	3º q g/dL
87,3	3,10 <sup>a(1)</sup>	3,08	3,10
174,6	3,10 <sup>a</sup>	3,05	3,25
349,2	3,00 <sup>a</sup>	3,00	3,00
0,0	3,20 <sup>a</sup>	3,08	3,20

(1) Valores de mediana seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

A discreta hipoalbuminemia encontrada deve-se provavelmente a uma diminuição de ingestão de proteína. A hipoalbuminemia é condição altamente inespecífica e deve ser relacionada com outras frações protéicas do soro (Miller, 1988).

Como o grupo controle também apresentou diminuição das concentrações de albumina pode-se concluir que essa seja uma característica do lote de animais estudados e que neste caso, não houve efeito de linamarina.

#### 4.2.6. Relação Albumina / Globulina (A/G)

A relação média A/G está demonstrada no Quadro 7 cujos resultados não diferiram estatisticamente.

A literatura cita diferentes valores de referência para esse parâmetros de  $1,17 \pm 0,71$  (Miller, 1988); 1,2 a 2,2 (Celm, s.d) e 1,2 a 2,1 para ratos, (Purina, s.d).

Quadro 7. Média e desvio-padrão referentes à relação albumina/globulina, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.

Dose de Linamarina mg/kg de peso vivo	Média	Desvio-padrão
87,3	1,72 <sup>a(1)</sup>	0,19
174,6	1,53 <sup>a</sup>	0,26
349,2	1,55 <sup>a</sup>	0,35
0,0	1,48 <sup>a</sup>	0,13

(1) Média seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

As globulinas constituem uma fração muito heterogênea dos proteínas plasmáticas e sua alteração assume importância especial nos distúrbios nutricionais, dano hepatocelular, nefrose mieloma múltiplo e infecções crônicas. (Miller, 1988).

Os valores encontrados estão dentro dos padrões normais pois a discreta diminuição nos níveis de PT e AB não afetou diretamente a relação albumina/globulina.

A literatura não relata pesquisas com níveis de albumina sérica e globulinas em animais submetidos ao efeito do glicosídeo linamarina. Os resultados

encontrados indicam que as doses de linamarina não levaram a alterações desses parâmetros.

#### 4.2.7. Glicose

Os resultados médios de glicose no soro de ratos estão no Quadro 8 e não diferiram estatisticamente.

Os limites normais de glicose pelo método enzimático de glicose oxidase estão entre 70 a 110 mg/dl. Embora possa ser dosada por uma gama de diferentes procedimentos analíticos, os intervalos de referência variam de modo significativo entre os métodos empregados (Miller, 1988).

Quadro 8. Média e desvio-padrão referente à glicose, dos grupos de ratos tratados com diferentes doses de linamarina.

Dose de Linamarina mg/kg de peso vivo	Média g/dL	Desvio-padrão
87,3	163,6 <sup>a(1)</sup>	46,8
174,6	216,8 <sup>a</sup>	25,4
349,2	200,5 <sup>a</sup>	14,8
0,0	158,2 <sup>a</sup>	58,7

(1) Média seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Em condições normais, o teor de glicose no sangue mantém-se dentro de limites bastantes estreitos. Isso se deve à intervenção de um mecanismo regulador hormonal bastante sensível e delicado, cujos principais integrantes são representados, de um lado, pela insulina (agente hipoglicemiante) e, de outro, pelos hormônios adrenocorticais, pré-hipofisários, adrenalina e glucagon (agentes hiperglicemiantes) (Miller, 1988).

Num estudo sobre o efeito diabetogênico da linamarina em cães, Ragoobirsingh et al., (1993), determinaram que nos cães tratados, a concentração plasmática de insulina era muito menor que o grupo controle resultando em valores anormalmente altos de glicose. Esses resultados estão de acordo com Kamalu (1991) que em experimento semelhante, demonstrou redução nos níveis de insulina em cães submetidos a dietas com diferentes fontes de mandioca.

Segundo o EPA (1990), citado por Dantas, (2000) o cianeto causa aumento nos teores de glicose sangüíneas e ácido láctico e decréscimo na relação ATP/ADP indicando uma mudança de metabolismo aeróbico para anaeróbico. Aparentemente ativa a glicogenólise e Shunt de pentoses, diminuindo o grau de glicólise e inibindo o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram níveis de glicose sérica acima do normal para o método empregado, inclusive no grupo controle, portanto não permitindo discussão sobre o efeito da linamarina sobre os teores séricos de glicose.

Para todos os parâmetros bioquímicos estudados, considerando-se diferenças mínimas esperadas referentes as médias de tratamento e levando em conta a variabilidade que ocorre, ao nível de 5% de significância e com poder do teste igual a 80%, o tamanho da amostra deveria ser maior.

### **4.3. Alterações Histopatológicas**

As lesões macroscópicas e histopatológicas observadas nos animais que sofreram intoxicação aguda consistiram de congestão visceral sistêmica, mais acentuada no fígado (Figura 3). Os rins demonstraram no exame histopatológico, congestão mais proeminente na região córtico medular (Figura 4). O sistema nervoso central (Figura 5), miocárdio (Figura 6) pâncreas e pulmões apresentaram congestão difusa.

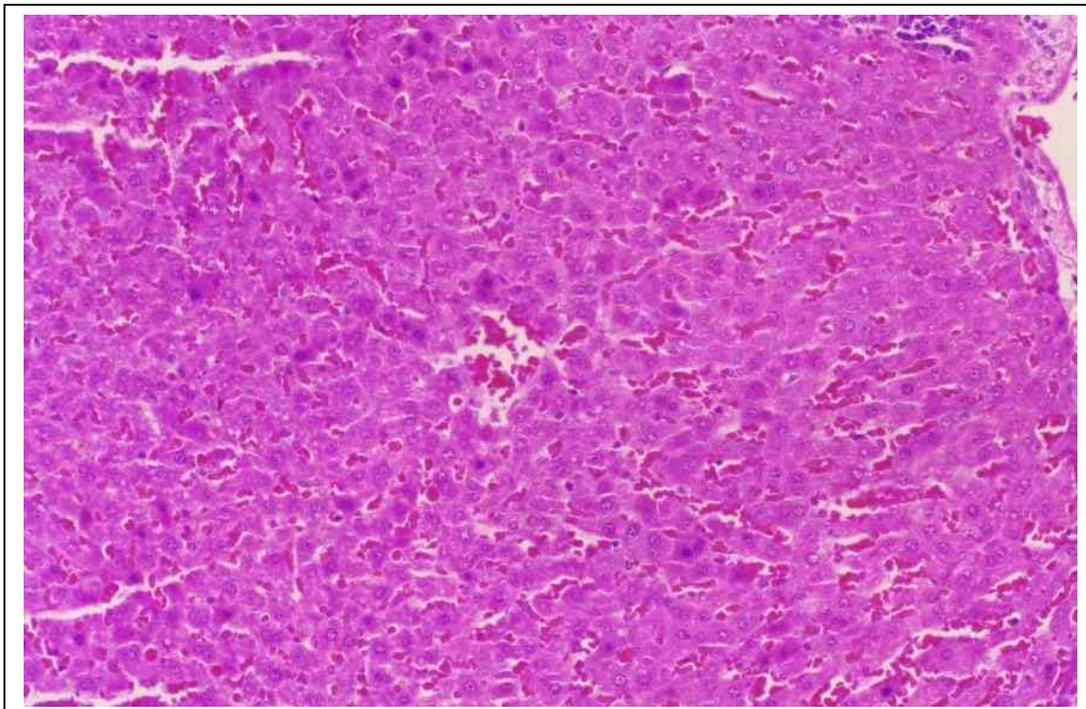


Figura 3. Corte histológico de fígado apresentando congestão sinusoidal e centro lobular. Hematoxilina & Eosina (x100).

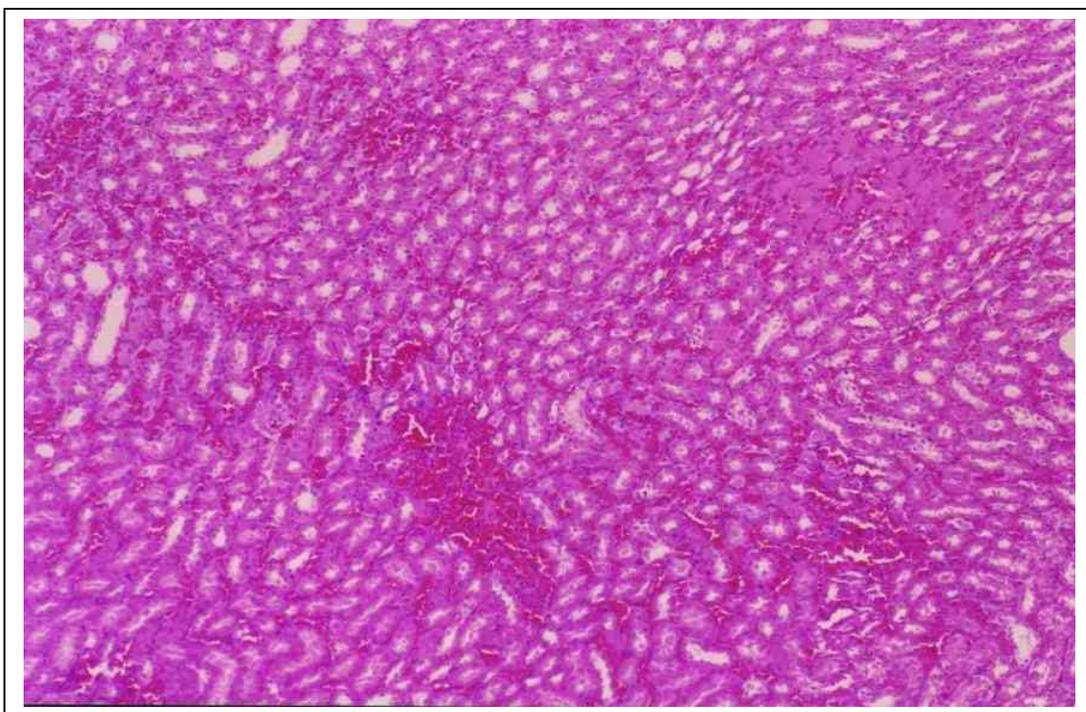


Figura 4. Corte histológico de rim apresentando acentuada congestão córtico medular. Hematoxilina & Eosina (x100).

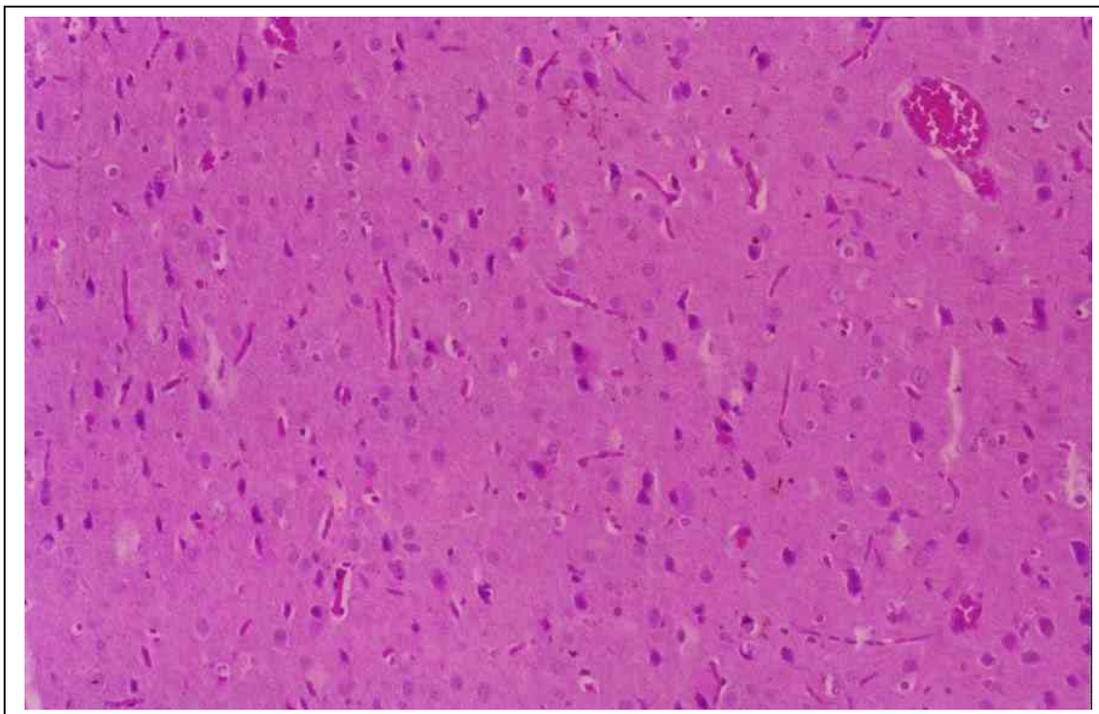


Figura 5. Corte histológico de sistema nervoso central apresentando congestão de pequenos vasos na substância cinzenta. Hematoxilina & Eosina (x100).

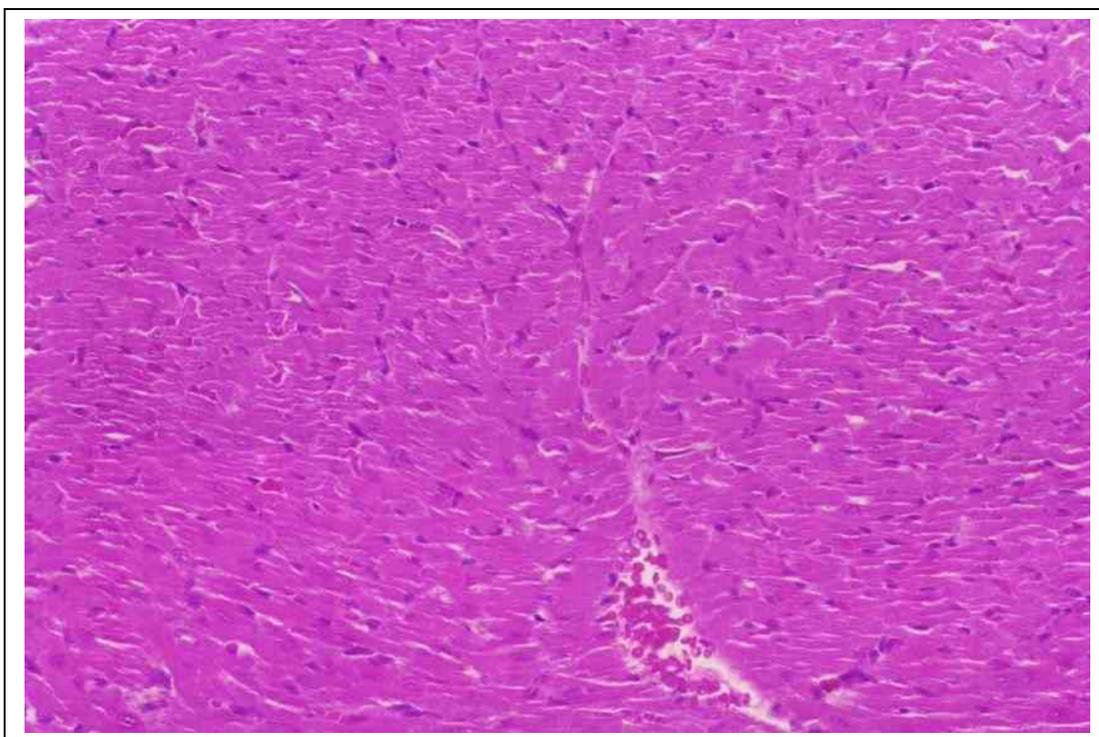


Figura 6. Corte histológico de músculo cardíaco apresentando congestão visceral sistêmica. Hematoxilina & Eosina (x100).

Independentemente da dose recebida, os animais sobreviventes e os sacrificados aos 14 dias, apresentaram degeneração espongiiforme envolvendo principalmente a substância branca (Figuras 7 e 8).

Essas alterações são semelhantes às relatadas por diversos autores em estudos sobre a influência de glicosídeos cianogênicos, provenientes de diferentes fontes vegetais, no metabolismo de várias espécies animais.

Sargison et al. (1996), observaram em vacas que ingeriram acidentalmente várias partes de *Prunus padus*, sinais clínicos de depressão, bruxismo, taquicardia e estase ruminal. O exame post-mortem revelou degeneração hepática aguda. Tungtrakanpoung & Rhienpanish (1992) relataram congestão e hemorragia com petéquias no coração, fígado, rins, pulmões, rúmen e intestinos de búfalos, após ingestão de *Mimosa invisa* var. *inermis*. Jackson (1995) estudando dois burros mortos após ingestão de *Prunus virginiana*, não encontrou lesões histopatológicas significativas. Gajendragad et al. (1992) examinaram as lesões histopatológicas de ovelhas mortas após ingestão de vagens de *Acacia sp.* Os exames revelaram congestão acentuada de todos os órgãos viscerais, degeneração e congestão na córtex cerebral. Kamalu (1993) encontrou vacuolização periportal no fígado, vacuolização e ruptura de células dos túbulos proximais dos rins de cães alimentados experimentalmente com gari. Foram também observadas degeneração e dilatação das fibras do miocárdio, atribuídas a congestão passiva crônica.

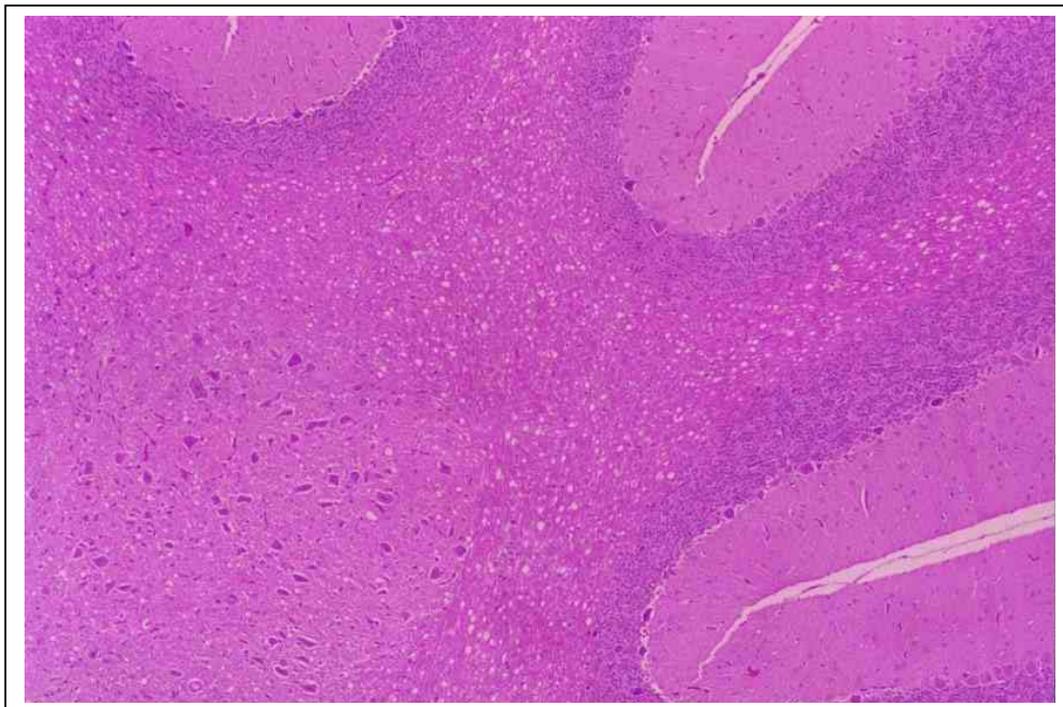


Figura 7. Corte histológico do sistema nervoso central, apresentando degeneração espongiforme difusa. Hematoxilina & Eosina (x100).

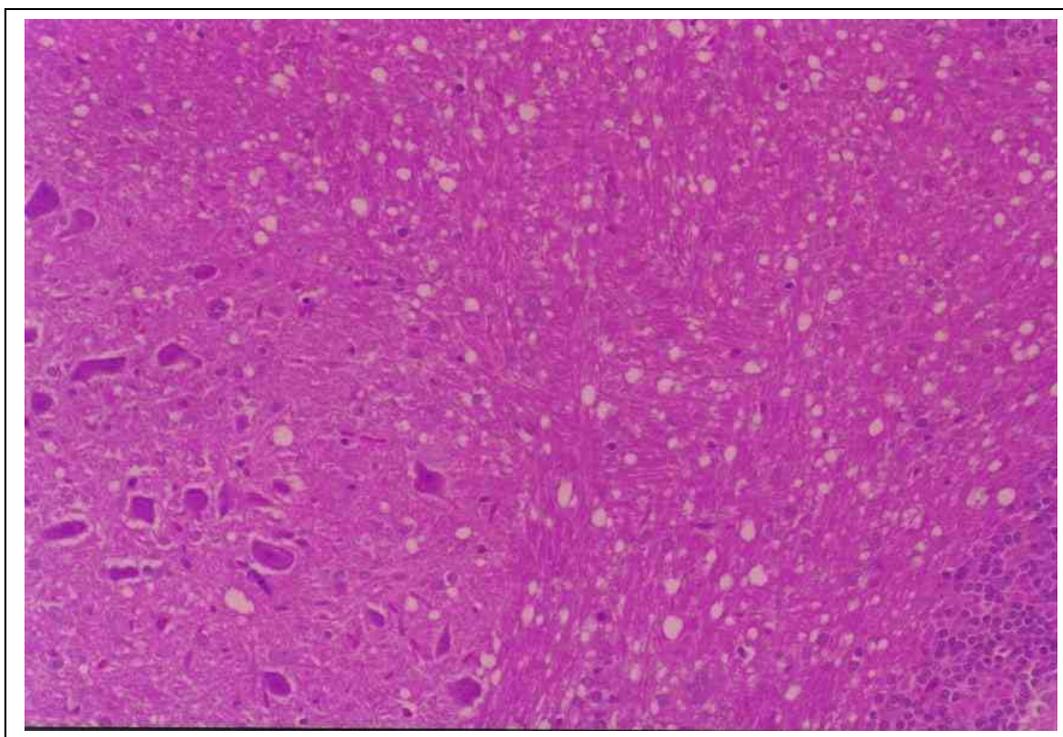


Figura 8. Corte histológico do cerebelo apresentando degeneração espongiforme. Hematoxilina & Eosina (x100).

No presente estudo, a congestão visceral apresentada pode estar relacionada à insuficiência cardíaca congestiva. A agressão pelo cianeto leva a isquemia que se traduz morfológicamente por perda dos grânulos da matriz mitocondrial com queda da fosforilação oxidativa e decréscimo na produção de ATP (Montenegro & Franco, 1999). A exposição a cianeto leva a redução na utilização do oxigênio nos tecidos, produzidos um estado de anóxia histotóxica, causado pela inativação da citocromo oxidase (Dantas, 2000).

O cianeto, quando administrado por via oral, é rapidamente absorvido e distribuído pelo organismo através do sangue. As concentrações são maiores nos eritrócitos que no plasma e combina-se com o ferro da metahemoglobina e da hemoglobina eritrocitárias (Dantas, 2000). A distribuição tecidual ocorre em diferentes níveis, sendo relatado em um caso fatal de intoxicação humana os seguintes níveis: conteúdo gástrico, 0,03; sangue, 0,05; fígado, 0,11; cérebro, 0,07 e urina, 0,20 (mg/100mg). (EPA, 1990, citado por Dantas, 2000).

#### **4.4. Consumo de Ração**

Os dados diários de consumo de ração dos animais experimentais estão representados na Figura 9.

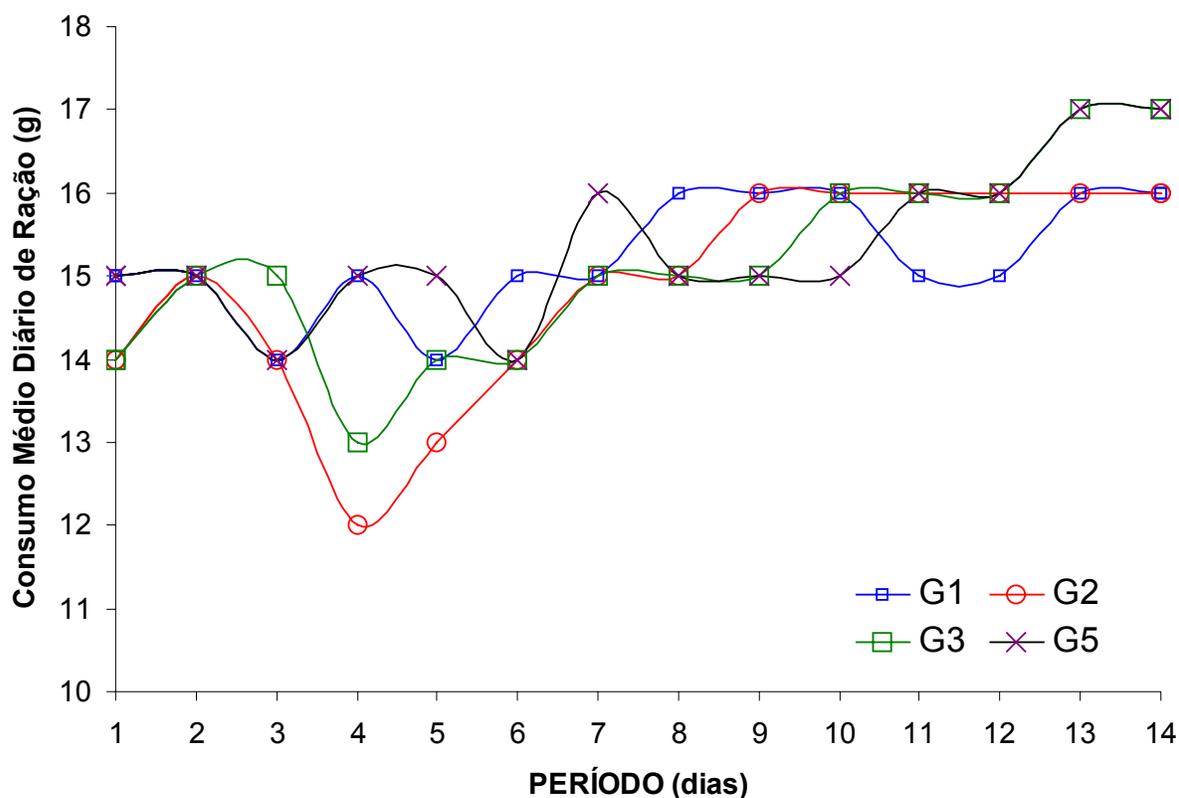


Figura 9. Consumo médio diário de ração de ratos submetidos a diferentes doses de linamarina durante o período experimental.

O animais dos grupos 1 (87,3 mg/kg linamarina) e 5 (Controle) diminuíram a ingestão de alimento no 3º dia aumentando o consumo já no dia seguinte. Entretanto, aqueles dos grupos 2 (174,6 mg/kg linamarina) e 3 (349,2 mg/kg linamarina) apresentaram declínio mais acentuado que os dos grupos 1 e 5 no 4º dia com recuperação no 5º dia. A partir do 5º dia todos os animais apresentaram aumento do consumo diário de ração. Embora tenha havido uma pequena queda na ingestão de alimentos em todos os grupos experimentais, esse parâmetro continuou dentro das

médias estabelecidas pela Purina (s.d) para consumo médio diário de ração de ratos jovens, que varia de 12 a 15 g. Essa diminuição na ingestão de alimentos provavelmente seja a causa da estabilização do peso corporal dos animais do grupo 2.

Os dados apresentados não são concordantes com os observados por Varshney et al. (1996) em eqüinos e Jackson (1994) em humanos, os quais relatam diminuição no consumo de alimento quando as dietas continham glicosídeos cianogênicos. Iyayi (1994) porém, não observou alteração nesse parâmetro em suínos em dietas com alto teor de cianeto.

Os resultados observados sugerem que a dose única de linamarina provoca um ajuste metabólico nos animais, sem alterar significativamente o consumo de ração.

#### **4.5. Peso Corporal**

Os resultados médios de peso corporal, obtidos a cada dois dias dos grupos estudados, encontram-se na Figura 10.

Os animais dos grupos 1 (87,3 mg/kg linamarina) e 2 (174,6 mg/kg linamarina) apresentaram uma estabilização no peso corporal no 5º dia após administração das soluções, com recuperação a partir do 6º dia. Animais dos grupos 3 (349,2 mg/kg linamarina) e 5 (Controle) apresentaram aumento de peso corporal seguindo padrão linear.

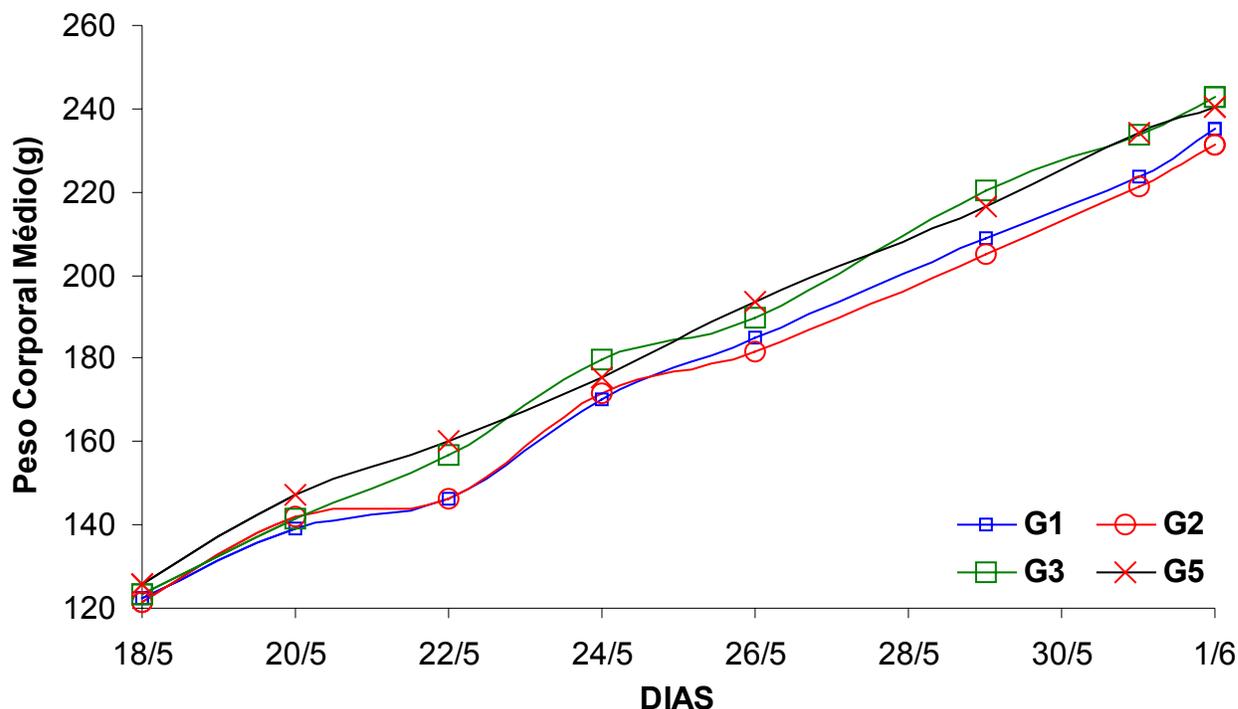


Figura 10. Peso corporal médio de ratos submetidos a diferentes doses de linamarina durante o período experimental (18/05 a 01/06/2000).

Observando-se a variação individual de peso corporal (Tabela 3 do Apêndice) verifica-se que o ganho de peso entre o 3º e 5º dias foi menor que nos outros períodos e que animais do grupo 3, que receberam doses maiores tiveram uma curva ascendente semelhante ao grupo controle. Esse fato pode ser explicado por um ajuste metabólico individual dos animais em resposta ao cianeto liberado pela hidrólise da linamarina, pois embora saiba-se que o tempo máximo de excreção do cianeto, sob forma de tiacianato é de 72 horas, uma parte da linamarina, cujo metabolismo é desconhecido, não é excretada sob essa forma. (Oke, 1979; Rosling et al., 1992)

Panigraki et al. (1992) observaram menor ganho de peso em frango de corte submetidos a dietas contendo farinha de mandioca com pouco tempo de secagem. Varshney et al. (1996) em estudos sobre efeito do *Sorghum bicolor*, administrado, por dois meses, no metabolismo de eqüinos, também observaram redução de peso em decorrência da diminuição do apetite. Jackson (1994) sugeriu que dietas diárias contendo mandioca, podem desacelerar o crescimento e desenvolvimento de hemácias na África. Num estudo com diferentes linhagens de suínos, Iyayi (1994) não observou diminuição de ingestão de alimento e de peso corporal, mesmo quando a dieta continha alto teor de cianeto.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que uma única dose de linamarina não prejudica o desenvolvimento dos animais e que a pequena oscilação do peso observada entre o 3º e 5º dias pode ser causada por variações metabólicas individuais desses animais.

## **5. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O estudo deverá ter continuidade para verificação dos possíveis efeitos cumulativos da linamarina sobre o metabolismo animal, através de testes de toxicidade oral a médio prazo.

A determinação da dose letal oral de linamarina, coloca em discussão conceitos pré-estabelecidos sobre o perigo da ingestão de mandioca e seus sub produtos e abre outras opções de pesquisas visando o desenvolvimento de novas tecnologias de processamento. Esse fato evitaria também, uma desnecessária concentração de esforços energéticos e financeiros nos processos de destoxificação.

## 6. CONCLUSÕES

Nas condições do experimento concluiu-se que:

- a DL<sub>50</sub> oral de linamarina de mandioca em ratos é de 324,86±1,5 mg/kg/peso vivo;
- nos animais sobreviventes a linamarina não causou anóxia em tecidos nobres (neurônios da córtex e células de Purkinje);
- a dose letal oral de linamarina causou congestão do fígado, rins, coração e cérebro;
- a linamarina não levou a alterações significativas nos níveis séricos de proteína total, albumina, globulina, glicose e na atividade das enzimas alanina transaminase (EC 2.6.1.1), aspartato transaminase (EC 2.6.1.2) e lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27);

- o consumo de ração e peso corporal não foram afetados por uma única dose de linamarina;

- em dose única não há efeito tardio da linamarina no metabolismo dos animais sobreviventes.

## **7. SUGESTÕES**

Com finalidade de melhorar os conhecimentos para discussão dos efeitos da linamarina no metabolismo animal, sugerem-se experimentos de médio prazo visando o estudo da atividade de enzimas, já que são poucas as informações sobre esses parâmetros. Seria interessante a realização de estudos sobre a liberação e excreção do cianeto formado a partir da linamarina extraída no metabolismo animal.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS<sup>1,2</sup>

AKINTOWA, A., TUNWASHE, O.L. Fatal cyanide poisoning from cassava-based med. *Human and Experimental Toxicology*, n.11, 47-49, 1992.

ALMAZAN, A.M. Cyanide concentration in fried cassava chips and its effect on chips taste. *Nigerian Food J.*, v.4, p.65, 1986.

ALMAZAN, A.M. Cyanide and its reduction in cassava during processing. In: *Workshop on Enhancing the Contribution of Cassava to Food Security in SADCC*, Mzuzu, Malawi, 1988, 159p.

ANUARIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA- Ed. Argos Comunicação, São Paulo, 4820, 1988.

ARGUEDAS, P., COOKE, R.D. Residual cyanide concentration during the extraction of cassava starch. *J. Food Sci. Technol.*, v.17, p.251, 1982.

---

<sup>1</sup> BIOSIS. *Serial sources for the BIOSIS previews database*. Philadelphia, 1990. 413p.

<sup>2</sup> UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas, Ed. UNESP. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994. 4v., v.2, Referências Bibliográficas.

- BARRET, M.D.P., ALEXANDER, J.C., HILL, D.C. Utilization of <sup>35</sup>S from radioactive methionine or sulfate in detoxification of cyanide by rats. In: Use of cassava as an animal Feed: *Proc. IDRC Conference, Guelph, Canadá, 1977.*
- BARRET, M.D.P., HILL, D.C., ALEXANDER, J.C., ZISTNAK, A. Fate of orally dosed linamarin in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v.55, p.134-36, 1977.
- BOKANGA, M. Processing of cassava leaves for human consumption. *Acta Horticulturae. International Workshop on Cassava Safety*, n375, 203-8, 1994.
- BOURDOUX, P., DELANGE, F., GERADR, M., MAFUTA, M., HANSON, A., ERMANS, A.M. Evidences that cassava ingestion increases thiocyanate formation: a possible etiological factor in endemic goitre. *J. Clin. Endocrinol. Met.*, v.46, p.613-21, 1978.
- BOURDOUX, P., DELANGE, F., GERARD, M. Antithyroid action of cassava in humans. In: Role of cassava in the etiology of endemic goitre and cretinism. *Int. Develop. Res. Centre Monogr.* 61-8, 1980.
- BOURDOUX, P., SEGHERS, P., MAFUTA, M., VANDERPAS, J., VANDERPAS, R.M., DELANGE, F., ERMANS, A.M. Cassava products: HCN content and detoxification process. In: *Nutritional Factors Involved in the Goitrogenic Action of Cassava*, Delange, F., Iteke, F.B. and Ermans, A.M., Eds., IDRC-184, Ottawa, Canada, 1982. 51p.
- BRIMER, L. ROSLING, H. Microdifussion method with solid state detection of cyanogenic glucosides from cassava in human urine. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 31, p.599-603, 1993.
- BRIMER, L. *Cyanide and cyanogenic compounds the occurrence in material of biological origin and the analysis*. Thesis. Royal Danish School of Pharmacy. Copenhagen, 1996.
- BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R. *Tietz Fundamentos de Química Clínica – Burtz & Ashwood Ed. W.B. Saunders Company – Philadelphia, 1996, 4<sup>a</sup> ed. 836p.*

- CARLSSON, L., MLING, N., RONQUIST, G., ROSLING, H. A specific and sensitive method for determination of linamarin in urine. *Natural Toxins*, v.93, p.257-61, 1994.
- CARLSSON, L., MLINGI, N., JUMA, A., RONQUIST, G., ROSLING, H. Metabolic fates in humans of linamarin in cassava flour ingested as atiff porvidge. *Food and Chemical Toxicology*, v.37, p.307-312, 1999.
- CHEOK, S.S. Acute cassava poisoning in children in Sarawak. *Trop. Doct.*, n.8, p.99-105, 1978.
- COCK, J.H. Cassava: New potential for a neglected crop. Westview Press, Boulder, Colorado, 1985.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMUSSION. Report of Eighth Session of the Codex Coordinating Committee for Africa, Cairo, Food and Agricultural Organization/World Health Organization, 1988.
- CONN, E.E. Cyanogenic glucosides. *Agric Food Chem.*, v.17, p.519, 1979.
- COOK, R.D., MADUAGWU, E.N. The effect of simple processing on the cyanide content of cassava chips. *J. Food Technol.*, n.13, p.299-303, 1978.
- COURSEY, D.G. Cassava as food: toxicity and technology. In: CHRONIC CASSAVA TOXICITY, PROCEEDING OF AN INTERNATIONAL WORKSHOP, London, England 29-30 January. Eds B. Nestel & R. MacIntire. International Development at Research Centre, Ottawa, 89-96, 1973.
- DANTAS, L.M. Resposta informações glicosídeos cianogênicos / HCN mandioca [mensagem pessoal]. mensagem recebida por [quimica@ibb.unesp.br](mailto:quimica@ibb.unesp.br) em 11 de abril de 2000.
- DE BRUIJN, G.H. The cyanogenic character of cassava (*Manihot esculenta*). In: Nestel, B., MacIntyre, R. Eds. *Chronic cassava toxicity*. Proceedings of an Interdisciplinary Workshop. London, 1973, 43-48.

- DELANGÉ, F., EKPECKI, L.O., ROSLING, H. Cassava cyanogenesis and iodine deficiency disorders. *Acta Horticulturae*, v.375, 289-293, 1994.
- DORR, R.T., PAXINOS, J. The current status of laetrile. *Annals of Internal Medicine*, v.89, p.389-397, 1978.
- DUFOUR, D.L. Cyanide content cassava (*Manihot esculenta Euphorbiaceae*) cultivars used by Tukanoan Indians in Northvest Amazonia, *Econ. Bot.* v.42, n.2, p.255-61, 1988.
- EMINEDOKI, D.G., MONANU, M.O. ANOSIKE, E.O. Thiocyanate levels of mainly dietary origin in serum and urine from a human population sample in Port Harcourt, Nigeria. *Plant Foods for Human Nutrition*. 46, 277-85, 1994.
- ERMANS, A.M., MBULAMOKO, N.M., DELANGE, F. Role of cassava in the etiology of endemic goitre and cretinism. Ottawa, Canada: In: *Develop Res Centre Monogr*, 136p., 1982.
- ESSERS, A.J.A., JUNGERS, C.M.G.A., NOUT, M.J.R. Contribution of selected fungi to the reduction of cyanogen levels during solid substrate fermentation of cassava. *International Journal of Food Microbiology*. v.26, n.2, p. 251-57, 1995.
- EYERLY, R.C. Laetrik; focus on the facts. *Cancer*, v.26, p.50-54, 1976.
- EZEALA, D.O., OKORO, N. Processing techniques and hydrocyanic acid content of cassava based human foodstuffs in Nigeria. *Journal of Foof Biochemistry*, v.10, p.125-132, 1986.
- FRAKES, R.A., RAGHUBIR, P.S. Developmental toxicity of the cyanogenic glycoside linamarin in the golden hamster. *Teratology*, 31, 241-46, 1985.
- FRAKES, R.A., RAGHUBIR, P.S., WILLHITE, C.C. Developmental toxicity of the cyanogenic glycoside linamarin in the golden hamster. *Teratology*, v.31, p.241-46, 1985.
- FUKUBA, H., IGARASHI, O., BRIONES, C.M., MENDOZA, E.T. Cyanogenic glucosides in cassava and cassava products: determination and detoxification. In: TROPICAL

- ROOT CROPS: POST-HARVEST PHYSIOLOGY AND PROCESSING. 1984, Tokyo. *Proceeding...* Japan: Scientific Societies Press. 1984, p.255.
- GAJENDRAGAD, M.R., GOPALAKVISHNA, S., RAVIKUMAR, S.B. Pathology of the brain in acute hydrocyanic acid poisoning in sheep. *Indian Veterinary Journal*, v.61, p.206-10, 1992.
- GOMES, F.P. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Piracicaba, 1984. 160p.
- GOMEZ, G., APARICIO, M.A., WILLHITE, C.C. Relationship between dietary cassava cyanide levels and broiler performance. *Nutrition Reports International*, v.37, p.63-75, 1988.
- GOMEZ, G., VALDIVIESO, M. The effects of ensiling whole root chips on cyanide elimination. *Nutr. Rep. Int.*, v.37, p.1161, 1988.
- HAHN, S.K., KEYSER, J. Cassava: a basic food fro Africa. *Outbook on Aghriculture*. v.14, p.95-99, 1985.
- HALSTROM, F., MOLLER, K.D. Content of cyanide in human organs from cases of poisoning with cyanide taken by month, with contribution to toxicology of cyanides. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, n.1, p.18-23, 1945.
- HERNANDEZ, T., LUNDQUIST, P., OLIVEIRA, L., PÉREZ CRISTIÁ, R., ROSLING, H. The fate in humans of dietary intake of cyanogenic glycosides from roots of sweet cassava consumed in Cuba. *Natural Toxins*, v.14, p.88-91, 1995.
- HERSHMAN, J.M., SHARP, B. Et al. Endemic goitre in Vietnam. *Journal Clinical. Endocrinology Metabolism*. v.57, p.243-49, 1983.
- HILL, D.C. Physiological and biochemical responses of rats given potassium cyanide or linamarin. In: Use of cassava as an animal Feed: *Proc. IDRC Conference*, Guelph, Canadá, 1977.

- HUDSON, B.J.F., OGUNSUA, A.O. The effects of fibre, starch damage and surfactants on the backing quality of wheat/cassava composite flours. *J. Food Sci. Technol.*, v.11, p.129, 1976.
- HUGHES, J., CARVALHO, F.J.P. Purification, characterization and cloning of hydroxy nitrile lyase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Arch. Biochemistry Biosis.* V.311, p. 496-502, 1994.
- IBEBUNJO, C., KAMALU, B.P., IHMELANDU, E.C. Comparison of the effects of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) organic cyanide and inorganic cyanide on muscle and bone development in a Nigerian breed of dog. *British Journal of Nutrition*, v.68, 483-491, 1992.
- IYAYI, E.A. Supplement effects of low-and high cyanide cassava peels on the performance, nutrient digestibility and serum metabolites of growing pigs. *Tropenlandwint*, v.95, p.175-205, 1994.
- JACKSON, F.L. The bioantropological impact of chronic exposure to sublethal cyanogens in Africa. *Acta Horticulturae*, v.375, p.295-309, 1994.
- JACKSON, F.L. Cyanide poisoning in two donkeys. *Veterinary and Human Toxicology*, p.37, p.567-568, 1995.
- JONES, D.A. Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry*, v.47, p.155-162, 1997.
- KAMALU, B.P. The effect of a nutritinally balanced cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diet on endocrine function using the dog as a model. 1. Pancreas. *British Journal of Nutrition*, v.65, p.365-372, 1991.
- KAMALU, B.P. Pathological changes in growing dogs fed on a balanced cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diet. *British Journal of Nutrition*, v.69, p.921-934, 1993.
- KIM, J.C., RUITER, D. Bread made from non-wheat flours. *J. Food Sci. Technol.* v.22, p.867, 1968.

- LANCASTER, P.A. BROOKS, J.E. Cassava leaves as human food. *Econ. Bot.* v.37, n.3, p.331-35, 1983.
- LOPES, A.M., NASCIMENTO, C. DL<sub>50</sub> de linamarina em camundongos, 1999. dados não publicados.
- LORENZI, J.O., DIAS, C.A.C. Cultura da mandioca 2ª impressão Campinas, Cordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1993, 41p. (Boletim Técnico, 211)
- LUNDQUIST, P., MARTENSSON, J., SORBO, B., OHMAN, S. Method for determining thiocyanate in serum and urine. *Clinical Chemistry*, v. 25, p.678-81, 1979.
- LUNDQUIST, P., ROSLING, H., SORBO, B. Determination of cyanide in whole blood, erythrocytes and plasma. *Clinical Chemistry*, v.31, p. 591-95, 1985.
- LUNDQUIST, P., ROSLING, H., SÖRBO, B., TIBBLING, L. Cyanide concentrations in blood after cigarette smoking, as determined by a sensitive fluorometric method. *Clinical Chemistry*, v.35, p.617-619, 1987.
- MADUAGWU, E.N. Metabolism of linamarin in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.7, p.451-54, 1989.
- MAKAME, M., AKORODA, M.O., HAHN, S.K. Effects of reciprocal stem grafts on cyanide translocation in cassava. *Journal of Agricultural Science*, v.109, p.605-8, 1987.
- MANUAL CELM – Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo, s.d., 82p.
- MATSUMOTO, H., YUKIO, N., NISHIMURA, E.T.; HABER, M. Glicosidase modulation in pre-weaning rats: Its association with tumor induction by cycasin. *J. Nutl. Cancer Inst.*, v.49, p.423, 1972.
- McMAHON, J.M., WHITE, W.L.B., SAYRE, R.T. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Experimental Botany*, v.46, p.731-41, 1995.
- McMILLAN, D.E. Dietary cyanide and tropical malnutrition diabetes. *Diabetic Care*, v.2, p.202-208, 1979.

- MERINA, E., NAMBESIAN, B., SUDHAKARAN, P.R. Catabolism of linamarin in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) *Plant Science*, v.126, p.155-162, 1997.
- MILLER, O. Laboratório para o clínico. 6ªed. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1988, 549p.
- MINISTRY OF HEALTH, MOZAMBIQUE. Test by: Casadei, E., Jansen, P., Molin, A., Rosling, H. An epidemic of spastic paraparesis associated with chronic cyanide intoxication in a cassava staple area in Mozambique. *Bull WHO*, v.62, p.485-92, 1984.
- MKPONG, O.E., YAN, H., CHISM, G. Sayre, purification, characterization and localisation of linamarases in cassava. *Plant Physiology*, v. 93, n.1, p. 176-81, 1990.
- MLINGI, N., POULTER, N.H., ROSLING, H. An outbreak of acute intoxications from consumption of insufficiently processed cassava in Tanzania. *Nutrition Research*, v.12, p.677-87, 1992.
- MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M. **Patologia – Processos Gerais**. Editores Mário Rubens Montenegro; Marcello Franco, 4ª ed., São Paulo:Editora Atheneu, 1999. 320p.
- NAMBISAN, B. Evaluation of the effect of various processing techniques on cyanogen content reduction in cassava. In: BOKANGA, M., ESSERS, A.J.A., POULTER, N., ROSLING, H., TEWE, O. *Acta Horticulturae – International Workshop on Cassava Safety*. Tbadan: WOCAS. v.375, p.203-7, 1994
- NAMBISAN, B. Cyanogenesis in cassava. In: Roca W.M., Thro A.M., eds *Proceedings of the first international scientific meeting of the cassava biotechnology network*. Cartagena, Colombia, 25-28 august 1992: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 424-7, 1992.
- NAMBISAN, B., SUNDARESAN, S. Effect of processing on the cyanoglucoside content of cassava. *J. Sci. Food Agric.* v.36, p.1197, 1985.
- NAMBISAN, B., SUNDARESAN, S. Distribution of linamarin and its metabolising enzymes in cassava tissues. *Journal of Science and Food Agriculture*, v.66, p.503-8, 1994.

- NARTEY, F. Toxicological aspects of cyanogenesis in tropical foodstuffs. In: Toxicology in the tropics. Editors R.L.Smith and E.A. Bababumni, Taylor & Francis Ltd, London, p.53-73, 1980.
- NWEKE, F. COSCA *Working Paper*. n.11, IITA, Ibadan, Nigeria, 1994, 47p.
- O'BRIEN, G.M., MBOME, L., TAYLOR, A.J. Variations in cyanogen content of cassava during village processing in Cameroon. *Food Chemistry*, v. 44, p. 131-36, 1992.
- OGUNSUA, A.O. total cyanide levels in bread made from wheat cassava composite flours. *Int. J. Food Sci. Technol.* v.24, p.361, 1989.
- OKE, O.L. The role of hydrocyanic acid in nutrition. *World Rev. Nutr. Diet*, v.11, p.170, 1969.
- OKE, O.L. The mode of cyanide detoxification. *Chronic Cassava Toxicity*. IDRC Publication, London, 1973. 10p.
- OKE, O.L. Some aspects of the role of cyanogenic glycosides in nutrition. *Wld. Rev. Nutr. Diet*, v.33, p.70-103, 1979.
- OKE, O.L. Toxicity of cyanogenic glycosides. *Food Chemistry*, v.6, p.97-109, 1980.
- OKE, O.L. Processing and detoxification of cassava. In: SYMPOSIUM OF INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS. 6, 1983, Lima. *Proceeding...* Lima:International Potato Centre, CIP, 1983, p.329-34.
- OLIVEIRA, A.I., CATANEO, A.C., CEREDA, M. Atividade de linamarase (EC 3.2.1.21) e teores de cianeto e N total em folhas de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). *Acta Biologica Leopoldensia*, v.20, p.373-80, 1998.
- OLUSI, S.O., OKE, O.L., ODUSOTE, A.C. Effect of cyanogenic agents on reproduction and neonatal development of rats. *Biol. Neonotes*, v.36, p.233-293, 1979.
- OSUNTOKUN, B.O. Cassava diet, chronic cyanide intoxication and neuropathy in Nigerian Africans. *Word Review Nutrition Diet*. v. 36, p.141-73, 1981.

- PADMAJA, G. Cyanide detoxification in Cassava for food and feed uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.35, n.4, p.299-39, 1995.
- PADMAJA, G., PANIKKAR, K.R. Pattern of enzymes changes in rabbits administered linamarin or potassium cyanide. *Ind. J. Exp. Biol.*, n.27, p.551-58, 1989.
- PADJAMA, G., GEORGE, M., MOORTY, S.N. Detoxification of cassava during fermentation with a mixed culture inoculum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 63, p. 473-81, 1993.
- PANIGRAKI, S., RICKARD, J., O'BRIEN, G.M., GAY, G. Effects of different rates of drying cassava root on its toxicity to broiler chicks. *British Poultry Science*, v.33, p.427-33, 1992.
- PANTAROTO, S. CEREDA, M.P., MANFIO, G.P., CEZAR, V.R.S., LEONEL, M., URBANO, L.H. Destoxificação microbiana de manipueira (líquido residual da prensa de mandioca) etapa inicial. SIMPÓSIO EM ENERGIA NA AGRICULTURA, II, 2000, Botucatu. *Anais...* Botucatu:UNESP, 2000, p.631-34.
- PIERIS, N., JANSZ, E.R., KANDAGE, R. Cyanogenic glucoside content of manioc. I. Enzymic method of determination applied to processed manioc. *J. Natl. Sci. Counc. Sri Lanka*, v.2, p.67-76, 1974.
- PURINA. *Animais de Laboratório*. São Paulo, s.d., 27p.
- RAGOOBIRSINGH, D., ROBINSON, H.M., MORRISON, E.Y., SE, A. Effects of cassava cyanoglucoside linamarin on blood sugar levels in the dog. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.11, p.625-629, 1993.
- ROSLING, H. *Cassava toxicity and food security – A review health effects of cyanide exposure from cassava and of ways to prevent such effects*. Uppsala: International Child Health Unit, Uppsala University, 1988. 40p.
- ROSLING, H. Measuring effects in humans of dietary cyanide exposure from cassava. *Acta Horticulturae: International Workshop on Cassava Safety*. v.376, p. 271-83, 1994.

- ROSLING, H., MLINGI, N., TYLLESKAR, T., BANE, M. Casual mechanisms behind human diseases induced by cyanide exposure from cassava. In *Proc. I. Int. Meeting of the Cassava Biotechnology Network*, Roca, W.M. and Thro, A.M. Eds, CIAT, Cali, Colombia, 1992, 366p.
- SARGISON, N.D., WILLIAMSON, D.S., DUNCAN, J.R., McCANCE, R.W. *Prunus padus* (bird cherry) poisoning in cattle. *Veterinary Record*, v.138, p.188, 1996.
- SOLOMONSON, L.P. Cyanide as a metabolic inhibitor, in *Cyanide in Biology*, Vennesland, B., Conn, E.E., Knowles, C.J., Westley, J. and Wissing, F., Eds. Academic press, New York, 1981. 11p.
- SPATZ, M. The role of international micro-organisms in determining cycasin toxicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.128, p.1005, 1968.
- TEWE, O.O. Detoxification of cassava products and effects of residual toxins on consuming animals. In: *Proc FAO Expert Consultation Meeting on Roots, Tubers, Plantains and Bananas*, 1991, 81p.
- TUNGTRAKANPONG, N., RHIENPANISH, K. The toxicity of *Mimosa inuisa* var. *inermis* Adalbert to buffaloes. *Buffalo Bulletin*, v.11, p.230-31, 1992.
- TYLLESKAR, T., BANE, M., BINANGI, N., COOKE, R.D., NIGEL, N.H., ROSLING, R. Cassava cyanogens and Konzo, an upper neuron disease found in Africa. *Lancet*, v.33, p.208, 1992.
- VARSHNEY, J.P., GRUPTA, A.K. YADAV, M.P. Occurrence of ataxia-cystitis syndrome in horses fed on *Sorghum vulgare* in India. *Indian Veterinary Journal*, v.73, p.985-86, 1996.
- VETTER, J., Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, v.38, p.11-36, 2000.
- WEIL, C.S. Tables for convenient calculation of median effective (DL<sub>50</sub> or ED<sub>50</sub>) and instructions in their use. *Biometrics*, v.8, p.249-263, 1952.

- WIGG, D. The quiet revolutionaries – a look at the campaign by agricultural scientists to fight hunger. *World Bank Development Essays*, v. 2, p. 1-47. Washington: The World Bank, 1993.
- WILKINSON, J.H., BARON, D.N., MOSS, D.W., WALKER, P.G. Standardization of clinical enzyme assays: a reference method for aspartate and alanine transaminase. *J. Clin. Path.* v.25, p.940-44, 1972.
- WILLHITE, C.C. Congenital malformation induced by laetrile. *Science*, v.215, p.1513-1515, 1982.
- ZITBAKM A., HILL, D.C.; ALEXANDER, J.C. Determination of Linamarin in Biological Tissues. *Anal. Biochem.*, v.77, p.310, 1977.

## **9. APÊNDICE**

Tabela 1. Resultados, média e desvio-padrão dos parâmetros bioquímicos estudados nos grupos experimentais.

Tratamento	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS						
	ALT(U/I)	AST(U/I)	LDH(U/I)	PT(g/dl)	AB (g/dl)	PT:AB	Glicose (g/dl)
G11	22	24	58	5,0	3,1	1,6	102
G12	26	35	66	4,9	3,1	1,8	128
G13	39	27	85	4,7	3,1	2,0	215
G14	12	19	313	4,7	3,0	1,7	185
G15	25	29	51	5,1	3,1	1,5	188
<b>Média</b>	<b>24,8</b>	<b>26,8</b>	<b>114,6</b>	<b>4,9</b>	<b>3,1</b>	<b>1,7</b>	<b>163,6</b>
<b>S</b>	<b>9,7</b>	<b>5,9</b>	<b>111,6</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>46,8</b>
G21	21	22	56	5,2	3,0	1,3	185
G22	39	15	57	4,8	3,1	1,8	218
G23	37	23	61	4,9	3,1	1,7	247
G24	39	15	63	6,6	3,4	1,3	214
<b>Média</b>	<b>34,0</b>	<b>18,8</b>	<b>59,3</b>	<b>5,4</b>	<b>3,2</b>	<b>1,5</b>	<b>216,0</b>
<b>S</b>	<b>8,7</b>	<b>4,3</b>	<b>3,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>25,4</b>
G31	16	14	47	5,3	3,0	1,3	211
G32	18	15	48	4,6	3,0	1,8	190
<b>Média</b>	<b>17,0</b>	<b>14,5</b>	<b>47,5</b>	<b>5,0</b>	<b>3,0</b>	<b>1,6</b>	<b>200,5</b>
<b>S</b>	<b>1,4</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>	<b>14,8</b>
G51	16	14	52	5,2	3,1	1,5	206
G52	18	15	39	5,3	3,2	1,6	84
G53	21	7	98	5,1	3,0	1,4	146
G54	18	15	76	5,3	3,2	1,6	228
G55	19	15	74	5,7	3,2	1,3	127
<b>Média</b>	<b>18,4</b>	<b>13,2</b>	<b>67,8</b>	<b>5,3</b>	<b>3,1</b>	<b>1,5</b>	<b>158,2</b>
<b>S</b>	<b>1,8</b>	<b>3,5</b>	<b>22,9</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>58,7</b>

Tabela 2. Consumo médio diário de ração dos grupos experimentais.

<b>Período (dias)</b>	<b>Grupo Experimentais</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
1°	15	14	14	15
2°	15	15	15	15
3°	14	14	15	14
4°	15	12	13	15
5°	14	13	14	15
6°	15	14	14	14
7°	15	15	15	16
8°	16	15	15	15
9°	16	16	15	15
10°	16	16	16	15
11°	15	16	16	16
12°	15	16	16	16
13°	16	16	17	17
14°	16	16	17	17
<b>MÉDIA</b>	<b>15,2</b>	<b>14,9</b>	<b>15,1</b>	<b>15,4</b>
<b>s</b>	<b>0,7</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>	<b>0,9</b>

Tabela 3. Controle do peso corporal dos grupos experimentais.

DATA	Grupos Experimentais				
	1	2	3	4	5
18/05	116	121	130	123	130
18/05	124	120	120	118	127
18/05	131	118	117	127	117
18/05	122	128	128	123	126
18/05	118	120	122	120	128
<b>Média</b>	<b>122</b>	<b>121</b>	<b>123</b>	<b>122</b>	<b>126</b>
<b>s</b>	<b>5,8</b>	<b>3,8</b>	<b>5,5</b>	<b>3,4</b>	<b>5,0</b>
20/05	128	141	153	-	151
20/05	147	136	-	-	148
20/05	154	138	130	-	137
20/05	134	153	-	-	150
20/05	133	-	-	-	149
<b>Média</b>	<b>139</b>	<b>142</b>	<b>142</b>	<b>-</b>	<b>147</b>
<b>s</b>	<b>10,8</b>	<b>7,6</b>	<b>16,3</b>	<b>-</b>	<b>5,7</b>
22/05	135	148	166	-	167
22/05	152	140	-	-	160
22/05	143	137	148	-	150
22/05	157	160	-	-	162
22/05	144	-	-	-	161
<b>Média</b>	<b>146</b>	<b>146</b>	<b>157</b>	<b>-</b>	<b>160</b>
<b>s</b>	<b>8,5</b>	<b>10,3</b>	<b>12,7</b>	<b>-</b>	<b>6,2</b>
24/05	154	170	166	-	174
24/05	179	170	-	-	176
24/05	185	160	193	-	168
24/05	168	187	-	-	179
24/05	164	-	-	-	179
<b>Média</b>	<b>170</b>	<b>172</b>	<b>180</b>	<b>-</b>	<b>175</b>
<b>s</b>	<b>12,3</b>	<b>11,2</b>	<b>19,1</b>	<b>-</b>	<b>4,5</b>
26/05	170	182	198	-	190
26/05	200	179	-	-	195
26/05	195	169	182	-	186
26/05	184	196	-	-	197
26/05	175	-	-	-	200
<b>Média</b>	<b>185</b>	<b>182</b>	<b>190</b>	<b>-</b>	<b>194</b>
<b>s</b>	<b>12,8</b>	<b>11,2</b>	<b>11,3</b>	<b>-</b>	<b>5,6</b>

Continua

Continuação: Tabela 3. Controle do peso corporal dos grupos experimentais.

Data Pesagem	Grupos Experimentais				
	1	2	3	4	5
29/05	195	205	232	-	210
29/05	222	197	-	-	219
29/05	214	198	209	-	211
29/05	214	220	-	-	221
29/05	199	-	-	-	222
<b>Média</b>	<b>209</b>	<b>205</b>	<b>221</b>	<b>-</b>	<b>217</b>
<b>s</b>	<b>11,3</b>	<b>10,6</b>	<b>16,3</b>	<b>-</b>	<b>5,7</b>
31/05	212	220	246	-	226
31/05	238	217	-	-	243
31/05	228	213	221	-	227
31/05	223	235	-	-	237
31/05	218	-	-	-	238
<b>Média</b>	<b>224</b>	<b>221</b>	<b>234</b>	<b>-</b>	<b>234</b>
<b>s</b>	<b>9,9</b>	<b>9,6</b>	<b>17,7</b>	<b>-</b>	<b>7,4</b>
01/06	222	229	256	-	229
01/06	254	228	-	-	252
01/06	238	222	230	-	237
01/06	233	247	-	-	236
01/06	228	-	-	-	247
<b>Média</b>	<b>235</b>	<b>232</b>	<b>243</b>	<b>-</b>	<b>240</b>
<b>s</b>	<b>12,2</b>	<b>10,8</b>	<b>18,4</b>	<b>-</b>	<b>9,2</b>