

**FARINHA DE FOLHAS DE MANDIOCA:  
EFEITOS SOBRE A PEROXIDAÇÃO E O  
PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E  
HEPÁTICO DE R ATOS**

**DANIELA SÉFORA DE MELO**

**2005**

DANIELA SÉFORA DE MELO

**FARINHA DE FOLHAS DE MANDIOCA: EFEITOS SOBRE A  
PEROXIDAÇÃO E O PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E  
HEPÁTICO DE RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do Programa de  
pós-graduação em Agronomia, área de  
concentração em Agroquímica e Agrobioquímica,  
para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa

---

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

(lipoproteína de baixa densidade) à oxidação e, indiretamente, reduzem a depleção de vitaminas antioxidantes.

Estudos avaliando a qualidade da proteína e a biodisponibilidade dos minerais e vitaminas também já foram realizados, assim como o potencial hipolipidêmico e antioxidante de substâncias purificadas como polifenóis, ligninas e saponinas. No entanto, pesquisas que avaliem o efeito destas substâncias presentes nas folhas de mandioca não constam na literatura pesquisada.

Portanto, neste trabalho estudou-se o efeito da adição de 5%, 10% e 15% de FFM em dietas hipercolesterolêmicas, sobre a peroxidação e o perfil lipídico plasmático e hepático em ratos.

**DANIELA SÉFORA DE MELO**

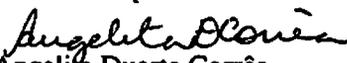
**FARINHA DE FOLHAS DE MANDIOCA: EFEITOS SOBRE A  
PEROXIDAÇÃO E O PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E  
HEPÁTICO DE RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 2 de fevereiro de 2005

Profa. Dra. Maria de Fátima Piccolo Barcelos – UFLA

Prof. Dr. Mário César <sup>\*</sup>Guerreiro – UFLA

  
Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Francisco,  
pelo apoio que sempre me proporcionaram e  
pela fonte inesgotável de compreensão,  
carinho e amor.

Aos meus irmãos, Ana Flávia, Karina e  
Alexandre, pela amizade e por  
acreditarem que eu venceria  
mais esta etapa.

Aos meus sobrinhos,  
Carol, Alice e Lucas,  
pelo grande amor e carinho.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida para realização do curso de Pós-Graduação e ao CNPq/ FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Angelita Duarte Corrêa, pela amizade, paciência e orientação segura e dedicada.

Ao Prof. Raimundo Vicente de Sousa, pela amizade, ensinamentos e importante orientação, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Aos meus co-orientadores, Custódio Donizete dos Santos e Celeste Maria Patto de Abreu, pelas contribuições e incentivo.

À Flávia Cristina Almeida Marcos, bolsista de iniciação científica (FAPEMIG-PIBIC), que auxiliou em todas as fases de execução deste trabalho, pela confiança e amizade.

Aos professores das disciplinas cursadas, pelos conhecimentos transmitidos, imprescindíveis em minha formação.

Ao Antonio Rogério Teixeira, engenheiro agrônomo e proprietário da Fazenda Rio Grande, que nos atendeu com muita gentileza, pelo fornecimento das folhas de mandioca.

Ao chefe do Departamento de Química/UFLA, Ruy Carvalho e à coordenadora de Pós-graduação, Celeste Maria Patto de Abreu, pela atenção

e presteza com que nos atenderam, apoiando financeiramente sempre que foi necessário.

À Maria Aparecida (Xulita), Miriam, Andressa e Nilda, funcionárias do DQI/UFLA, pela eficiência, atenção e carinho com que sempre me auxiliaram.

Ao William César Cortez e Marcos Antonio Machado, funcionários do DMV/UFLA, pela amizade, atenção e importante ajuda no ensaio biológico.

À Constantina Maria Braga Torres (Tina) e Sandra Mara Lacerda Silva, laboratoristas do DCA/UFLA, pelo apoio na realização das análises de composição centesimal.

Ao Prof. Augusto Ramalho de Moraes, do DEX/UFLA, pela contribuição nas análises estatísticas.

Ao Prof. Pedro Soares Bezerra Júnior, ao laboratorista José Rodrigues Alves Almeida Silva e ao monitor Leandro Lima, do DMV/UFLA, pela ajuda nas análises de histopatologia.

Ao João Astolfo e Wilson Ferreira de Carvalho Júnior, laboratoristas do DQI/UFLA, pela contribuição nas análises de minerais.

Às minhas amigas, que foram minha segunda família, Cristina, Lucília, Ana Paula, Valéria, Noele e Camila, pelos momentos agradáveis, incentivo e apoio nos momentos difíceis.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE SIGLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Vitamina C e $\beta$ -caroteno.....	3
2.2 Saponinas .....	7
2.3 Polifenóis.....	9
2.4 Oxalato.....	15
2.5 Glicosídeos cianogênicos.....	16
2.6 Atividade de hemaglutinina.....	18
2.7 Lipídeos plasmáticos e suas relações com doenças cardiovasculares...	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Farinha de folhas de mandioca.....	24
3.1.1 Colheita e preparo da amostra.....	24
3.1.2 Composição centesimal.....	25
3.1.3 Composição mineral.....	26
3.1.4 Vitamina C e $\beta$ -caroteno.....	26
3.1.5 Saponinas.....	26
3.1.6 Polifenóis.....	27
3.1.7 Oxalato.....	27
3.1.8 Cianeto.....	27

3.1.9 Atividade de hemaglutinina.....	27
3.1.10 Digestibilidade protéica <i>in vitro</i> .....	28
3.2. Ensaio biológico.....	28
3.2.1 Variáveis de desempenho.....	30
3.2.2 Sacrifício dos animais e colheita das amostras.....	30
3.2.3 Análises no sangue.....	30
3.2.3.1 Colesterol total.....	30
3.2.3.2 Colesterol na fração HDL.....	31
3.2.3.3 Triacilgliceróis.....	31
3.2.3.4 Colesterol nas frações VLDL + LDL e relação entre colesterol na fração HDL e colesterol total.....	31
3.2.3.5 Atividades de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina.....	31
3.2.3.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	32
3.2.4 Análises no fígado.....	33
3.2.4.1 Umidade e extrato etéreo.....	33
3.2.4.2 Colesterol total.....	33
3.2.4.3 Análise histopatológica.....	33
3.2.5 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Farinha de folhas de mandioca.....	36
4.2 Ensaio biológico.....	42
4.2.1 Dietas e variáveis de desempenho.....	42
4.2.2 Colesterol total, suas frações e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	46
4.2.3 Atividades de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e análises no fígado.....	51
5 CONCLUSÕES.....	59

6 PERSPECTIVAS.....	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	71

## LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEA	Coefficiente de eficiência alimentar
CMD	Consumo médio diário
CT	Colesterol total
FA	Fosfatase alcalina
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
FFM	Farinha de folhas de mandioca
GMD	Ganho médio diário
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-c	Colesterol na fração HDL
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	Colesterol na fração LDL
MS	Matéria seca
MF	Matéria fresca
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TAG	Triacilglicerol
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-c	Colesterol na fração VLDL

## LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 01	Oxidação do ácido L-ascórbico a ácido L-dehidroascórbico.....	4
FIGURA 02	$\beta$ -caroteno.....	5
FIGURA 03	Vitamina A (retinol).....	5
FIGURA 04	Agliconas de um glicosídeo de esteróide (soladina) e de um glicosídeo de triterpeno (ácido oleanólico).....	7
FIGURA 05	Polifenóis de baixo (1, 2 e 3) e alto (4) peso molecular..	10
FIGURA 06	Unidades alcoólicas precursoras das ligninas.....	13
FIGURA 07	Hidrólise da linamarina.....	17
FIGURA 08	Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade.....	21
FIGURA 9	Parte aérea de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz cv. Cacao).....	24
FIGURA 10	Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o dialdeído malônico (MDA).....	32
FIGURA 11	Fluxograma dos procedimentos gerais realizados com os animais experimentais.....	35
FIGURA 12	CEA dos ratos com as dietas, durante a fase experimental.....	45
FIGURA 13	Curva de crescimento dos ratos com as dietas, durante a fase experimental.....	46
FIGURA 14	CT no sangue de ratos com as dietas durante a fase experimental.....	47
FIGURA 15	Distribuição das lesões observadas na análise histopatológica do fígado dos ratos, após 7 semanas de experimento.....	53
FIGURA 16	Vacuolização do citoplasma dos hepatócitos para cada nível de intensidade, leve (+), moderada (++) e acentuada (+++), corados com hematoxilina e eosina, x 40 (I) e x 400 (II).....	55

## LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 01	Composição das dietas experimentais (g/100g).....	29
TABELA 02	Composição centesimal da farinha de folhas de mandioca .....	36
TABELA 03	Componentes da fibra alimentar da farinha de folhas de mandioca .....	37
TABELA 04	Teores de minerais da farinha de folhas de mandioca.	38
TABELA 05	Comparação entre alguns minerais de hortaliças folhosas (mg/100g em matéria fresca) e a farinha de folhas de mandioca analisada neste trabalho.....	39
TABELA 06	Fatores antinutricionais e digestibilidade protéica <i>in vitro</i> da farinha de folhas de mandioca.....	40
TABELA 07	Composição centesimal das dietas experimentais em g/100g.....	43
TABELA 08	CMD, GMD e CEA dos ratos com as dietas, durante a fase experimental.....	43
TABELA 09	Teores médios (mg/dL) de parâmetros lipídicos e TBARS no sangue dos ratos após 7 semanas com as dietas experimentais.....	48
TABELA 10	Atividades de enzimas no sangue dos ratos após 7 semanas com as dietas experimentais.....	51
TABELA 11	Teores médios de umidade, EE, CT no fígado e relação PF seco/ PC.....	56

## RESUMO

**MELO, Daniela S fora de. Farinha de folhas de mandioca: efeitos sobre a peroxida o e o perfil lipídico plasmático e hepático de ratos. 2005. 74p. Disserta o (Mestrado em Agronomia,  rea de concentra o Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\***

Devido aos grandes índices de desnutri o no Brasil várias organiza es governamentais e não governamentais, como a Funda o Nacional de Saúde e Pastoral das Crianças, têm apresentado como uma alternativa o uso da “multimistura” como suplemento alimentar para popula es carentes. Um dos componentes dessa “multimistura”   a farinha de folhas de mandioca (FFM) que apresenta elevado teor de proteína, vitaminas e minerais. Muitos estudos para avaliar a qualidade dessa proteína e a biodisponibilidade dos minerais e vitaminas já foram realizados. No entanto, os possíveis efeitos hipolipidêmico e antioxidante das folhas de mandioca, pela presença de substâncias como polifenóis, ligninas e saponinas, cujo potencial já foi comprovado para substâncias purificadas, ainda não foram avaliados. Portanto, neste trabalho estudou-se o efeito da adi o da FFM em dietas contendo colesterol, sobre a peroxida o e o perfil lipídico plasmático e hepático em ratos. Para isso, folhas maduras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Cacao) foram colhidas aos 12 meses de idade da planta, lavadas e secas em estufa ventilada a 30 C - 35 C. Após secagem, as folhas, sem os pecíolos, foram trituradas em moinho e armazenadas em geladeira. Um ensaio biológico com 32 ratos machos Wistar, foi conduzido com quatro tratamentos: dieta controle e dietas contendo 5%, 10% e 15 % de FFM, todas suplementadas com 1% de colesterol, por um período de 7 semanas. As dietas se apresentaram isoenergéticas e contendo os mesmos níveis de proteína digestível e fibra. A FFM estudada apresentou um alto teor de proteína, bons níveis de vitamina C e  $\beta$ -caroteno. Os teores de saponinas, polifenóis e oxalato na FFM estão dentro da faixa dos valores encontrados para outras cultivares, no entanto, o cianeto e a atividade de hemaglutinina foram relativamente elevados. As dietas contendo FFM não apresentaram efeitos significativos sobre as variáveis de desempenho e sobre o perfil lipídico sang neo, mas interferiram no metabolismo lipídico, provocando a deposi o de lipídeos no fígado e aumento no seu peso, o que p de ser reforça-

---

\*Comit  Orientador: Dra. Angelita Duarte Corrêa (orientadora), Dr. Raimundo Vicente de Sousa, Dra. Maria Celeste Patto de Abreu e Dr. Custódio Donizete dos Santos – UFLA.

do pelos estudos histopatológicos e pelo aumento da atividade da enzima alanina aminotransferase. Já as dietas contendo 10% e 15% de FFM apresentaram atividade antioxidante.

## ABSTRACT

MELO, Daniela Séfora. **Cassava leaves flour: effects on peroxidation and the plasmatic and hepatic lipidic perfil of rats.** 2005. 74p. Dissertation (Master in Agronomy, concentration area in Agrochemistry and Agrobiochemistry) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

Due to the great indices of underfeeding in Brazil, a number of governmental and non-governmental organizations as Fundação Nacional de Saúde e Pastoral das Crianças (National Health Institution and Children's Pastoral) have presented as an alternative, the use of the "multimistura" as the feeding supplement for the poor populations. One of the components of that "multimistura" is cassava leaves flour (CLF) which presents a high content of protein, vitamins and minerals. Several studies to evaluate the quality of the protein and bioavailability of minerals and vitamins have been performed. Nevertheless, the possible hypolipedemic and antioxidant effects of cassava leaves, due to the presence of substances as polyphenols, lignins and saponins, the potential of which was already confirmed for purified substances, have not been evaluated yet. Therefore, in this work, the effect of the addition of CLF in diets containing cholesterol on the peroxidation, plasmatic lipid profile and hepatic effect in rats was investigated. So, ripe cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz cv. Cacao) were picked at 12 months of age of the plant, washed and dried in ventilated oven at 30 - 35 °C. After drying the leaves without the petioles were ground in a mill and stored in refrigerator. A biological assay, with 32 Wistar male rats, was conducted with four treatments: control diet and diets containing 5%, 10 % and 15 % of CLF, all supplemented with 1% of cholesterol, for a period of 7 weeks. The diets were isoenergetic and contained the same levels of digestible protein and fiber. The studied CFL presented a high content of protein, good levels of vitamin C and  $\beta$ -carotene. The contents of saponins, polyphenols and oxalate in CLF are within the values found for other cultivars, nevertheless the cyanide and hemagglutinin activity was relatively high. The diets containing CLF presented no significant effects on the performance variables and on the blood lipid profile. But interfered in the lipid metabolism provoking lipid deposition in the liver and increase in its weight, which may be reinforced by the histopathologic studies and by activity increase

---

\*Guidance Committee: Dra. Angelita Duarte Corrêa (adviser), Dr. Raimundo Vicente de Sousa, Dra. Maria Celeste Patto de Abreu e Dr. Custódio Donizete dos Santos – UFLA.

of the enzyme alanine aminotransferase. Already the diets containing 10% and 15% of CFL presented antioxidant activity.

# 1 INTRODUÇÃO

Devido aos grandes índices de desnutrição no Brasil, várias organizações governamentais e não governamentais, como a Fundação Nacional de Saúde e Pastoral da Criança têm apresentado como alternativa o uso da “multimistura” como suplemento alimentar para populações carentes. Essa “multimistura” é constituída de alimentos não convencionais e ou subprodutos agroindustriais, como farelo de trigo, farinha de trigo, fubá de milho, pó de sementes de abóbora, pó da casca de ovos e farinha de folhas de mandioca (FFM).

O uso da FFM como um dos ingredientes dessa “multimistura” deve-se ao seu conteúdo protéico, vitaminas e minerais, já que são relativamente mais altos que o de hortaliças folhosas convencionais. Dessa forma, o aproveitamento das folhas poderia fornecer um balanço positivo na qualidade nutricional. Além do baixo custo de produção, as folhas são consideradas resíduos e não competem com o principal produto comercial, as raízes.

Muitos estudos têm sido realizados com folhas de mandioca objetivando propiciar níveis baixos de substâncias antinutritivas e ou tóxicas. Já se sabe que a forma de secagem das folhas, a idade da planta e a própria cultivar têm grande influência tanto sobre os teores de nutrientes quanto no de antinutrientes.

Dentre os compostos presentes nas folhas de mandioca, os glicosídeos cianogênicos são tóxicos, pois, após hidrólise liberam o cianeto, que exerce o efeito tóxico por se ligar ao citocromo  $a_3$  da cadeia respiratória e inibir a respiração celular. Já os polifenóis (taninos) são considerados antinutrientes porque diminuem a digestibilidade protéica. Todavia, vários estudos relataram a atividade antioxidante destes compostos, que podem estar relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares, pois aumentam a resistência da LDL

(lipoproteína de baixa densidade) à oxidação e, indiretamente, reduzem a depleção de vitaminas antioxidantes.

Estudos avaliando a qualidade da proteína e a biodisponibilidade dos minerais e vitaminas também já foram realizados, assim como o potencial hipolipidêmico e antioxidante de substâncias purificadas como polifenóis, ligninas e saponinas. No entanto, pesquisas que avaliem o efeito destas substâncias presentes nas folhas de mandioca não constam na literatura pesquisada.

Portanto, neste trabalho estudou-se o efeito da adição de 5%, 10% e 15% de FFM em dietas hipercolesterolêmicas, sobre a peroxidação e o perfil lipídico plasmático e hepático em ratos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene, arbustiva, pertence à família das Euforbicáceas. É bem tolerante à seca e possui ampla adaptação às mais variadas condições de clima e solo. A queda das folhas é um fenômeno natural e a longevidade da folha varia de 60 a 120 dias. A perda total das folhas caracteriza o período de repouso fisiológico, constituindo a época mais favorável para a colheita, em virtude da maior concentração de amido nas raízes (Lorezi & Dias, 1993).

A cultura de mandioca se adapta perfeitamente às condições nacionais, sendo o Brasil o maior produtor mundial, com produção estimada, no ano de 2005, em mais de 25 milhões de toneladas de raízes (SECTEC, 2005).

As folhas de mandioca apresentam algumas substâncias consideradas antinutritivas e ou tóxicas, como cianeto, polifenóis (taninos), nitrato, ácido oxálico, hemaglutinina, saponinas e inibidores de tripsina. Estas substâncias podem ocasionar efeitos tóxicos, dependendo da quantidade consumida ou, então, podem trazer benefícios, dependendo da substância e ou da circunstância.

Como neste estudo pretende-se avaliar o efeito da farinha de folhas de mandioca (FFM) sobre a peroxidação e o perfil lipídico plasmático e hepático de ratos, é de grande importância descrever a vitamina C e o  $\beta$ -caroteno, e outras substâncias, como, saponinas, polifenóis, oxalato, cianeto e hemaglutinina, presentes em sua constituição. Será também mostrado um pouco sobre o metabolismo de lipoproteínas e mecanismos aterogênicos.

### 2.1 Vitamina C e $\beta$ -caroteno

Quimicamente, a vitamina C é a lactona do ácido derivado da glicose. É um sólido branco, cristalino com p. f. 190°C - 192°C; bastante solúvel em água e

etanol absoluto, insolúvel nos solventes orgânicos comuns, como clorofórmio, benzeno e éter (Bobbio & Bobbio, 2003).

Pela habilidade de se interconverter entre as formas reduzida e oxidada, a vitamina C participa de reações de oxidação-redução. O ascorbato pode doar átomos de hidrogênio para reduzir algum outro composto e, neste processo, o ácido L-ascórbico é oxidado a ácido L-dehidroascórbico (Figura 1). Assim o ácido ascórbico pode inativar o oxigênio reativo, protegendo substâncias vulneráveis à destruição oxidativa. Esta propriedade é uma das que classificam a vitamina C como um antioxidante (Reed, 1980).

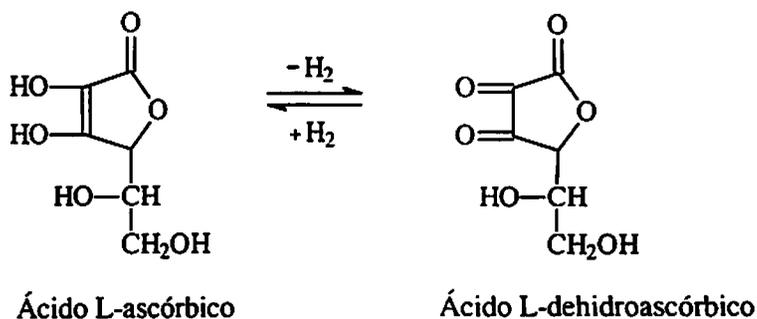


FIGURA 1 Oxidação do ácido L-ascórbico a ácido L-dehidroascórbico.

Carvalho et al. (1986), estudando a farinha de folhas de mandioca de dez cultivares, cujas folhas foram colhidas aos doze meses de plantio e secas em estufa ventilada a 45°C, encontraram teores de vitamina C total que variaram de 52,23 a 139,19 mg/100g de matéria seca (MS). Já Corrêa (2004), avaliando diferentes formas de secagem das folhas, encontrou valores variando de 108,62 a 168,53 mg/100g de MS, enquanto Wobeto (2003), avaliando a idade da planta, encontrou para a idade 12 meses, valores que variaram de 42,64 a 67,28 mg/100g de MS.

Os carotenóides constituem um grupo de pigmentos naturais lipossolúveis que ocorrem nos cromoplastos, entretanto, sua presença muitas vezes é mascarada pela clorofila (Oliveira et al., 1982). Quimicamente, os carotenóides são substâncias formadas por oito unidades de isopreno; a ligação isoprênica é invertida na parte central da molécula de forma que os dois grupos metílicos ficam separados por três carbonos.

A molécula de  $\beta$ -caroteno (Figura 2), por conter dois anéis de  $\beta$ -ionona, poderia ser transformada em duas moléculas de vitamina A (Figura 3), o que não é observado experimentalmente. Esse fato leva a supor que metade de cada molécula de  $\beta$ -caroteno é perdida durante a conversão ou, então, que de cada duas moléculas de  $\beta$ -caroteno absorvidas, somente uma é transformada em vitamina A (Bobbio & Bobbio, 2003).

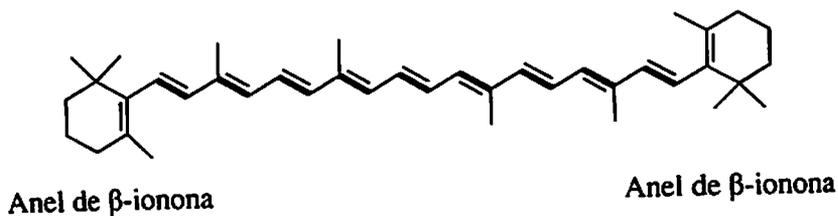


FIGURA 2  $\beta$ -caroteno.

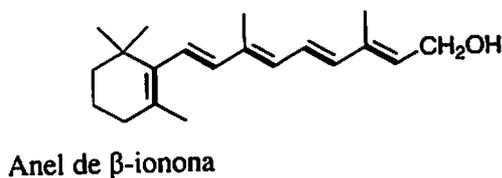


FIGURA 3 Vitamina A (Retinol).

Jenkins & Atwal (1994) relataram redução da disponibilidade da vitamina A e vitamina E quando saponina (*gypsophila* e *quillaja*) foi complementada em 0,9% da dieta, para pintos, por um período de 28 dias. Houve reduções do ganho de peso, da ingestão alimentar e da digestibilidade de lipídeos e aumento na excreção de colesterol. HDL-c e colesterol total (CT) no sangue não foram afetados. No entanto, Rao & Kendall (1986), avaliando o efeito da saponina (*quillaja*), demonstraram que um teor de 0,75% adicionado à dieta, para ratos, foi bem tolerada e não teve efeito adverso sobre o consumo alimentar e o ganho de peso. A análise de lipídeos no soro não mostrou diferença nas concentrações de triacilgliceróis (TAG) e CT, ao final de 8 semanas. Mas, estes níveis reduziram-se significativamente, após 24 semanas. A maioria dos estudos mostram que as saponinas diminuem o colesterol do soro apenas quando colesterol é adicionado à dieta. Nesse estudo, colesterol não foi adicionado, o que sugere que as saponinas se ligam aos ácidos biliares, formando complexos insolúveis, evitando assim sua reabsorção.

A redução nos níveis de colesterol poderia ser explicada pelo aumento da excreção do colesterol, por formação de complexos com as saponinas administradas por via oral ou, ainda, pelo aumento da eliminação fecal de ácidos biliares, conduzindo a uma maior utilização do colesterol para a síntese dessas substâncias (Schenkel et al., 1999). Uma outra proposta de mecanismo leva em consideração também as propriedades irritantes das saponinas. Com a formação de complexos entre as saponinas e o colesterol das membranas das células da mucosa intestinal, ocorreria uma esfoliação, com perda de função e redução da área de absorção (Johnson et al., 1986; Cheeke, 1996).

Evidências indicam que saponinas, que foram anteriormente denominadas como antinutrientes, podem ser benéficas à saúde e à nutrição humana. No entanto, esses benefícios devem ser estudados, assim como os

## 2.2 Saponinas

Saponinas são glicosídeos que ocorrem em uma ampla variedade de plantas. A sua hidrólise completa produz sapogeninas, as quais podem ser esteróides ( $C_{27}$ ) ou triterpenóides ( $C_{30}$ ), e açúcares (hexose, pentose e ácido sacárico). São geralmente caracterizadas por seu sabor amargo, produção de espuma em solução aquosa, capacidade de hemolisar células vermelhas do sangue (Birk & Irena, 1980) e formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membrana (Schenkel et al., 1999).

Na Figura 4 são mostrados exemplos da aglicona de um glicosídeo de esteróide (solanidina) e de um glicosídeo de triterpeno (ácido oleanólico) (Schenkel et al., 1999).

As saponinas apresentam um número variável de monossacarídeos ligados entre si em cadeia linear ou como uma cadeia ramificada. Os monossacarídeos encontrados mais comumente são: D-glicose, D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-fucose e os ácidos glicurônico e galacturônico. As ligações interglicosídicas podem ser  $\alpha$  ou  $\beta$  e os monossacarídeos podem ocorrer na forma de piranose ou furanose (Schenkel et al., 1999).

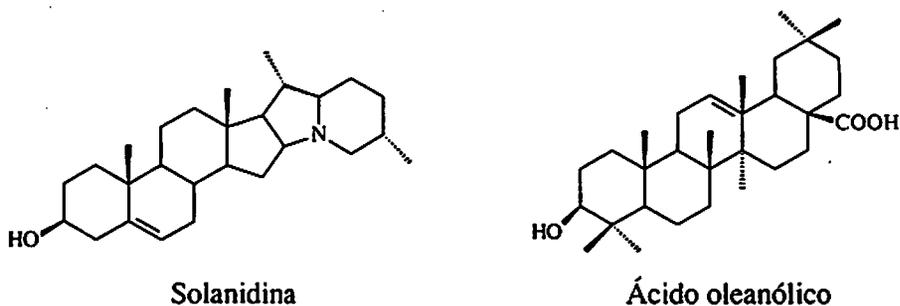


FIGURA 4 Agliconas de um glicosídeo de esteróide (solanidina) e de um glicosídeo de triterpeno (ácido oleanólico).

Jenkins & Atwal (1994) relataram redução da disponibilidade da vitamina A e vitamina E quando saponina (*gypsophila* e *quillaja*) foi complementada em 0,9% da dieta, para pintos, por um período de 28 dias. Houve reduções do ganho de peso, da ingestão alimentar e da digestibilidade de lipídeos e aumento na excreção de colesterol. HDL-c e colesterol total (CT) no sangue não foram afetados. No entanto, Rao & Kendall (1986), avaliando o efeito da saponina (*quillaja*), demonstraram que um teor de 0,75% adicionado à dieta, para ratos, foi bem tolerada e não teve efeito adverso sobre o consumo alimentar e o ganho de peso. A análise de lipídeos no soro não mostrou diferença nas concentrações de triacilgliceróis (TAG) e CT, ao final de 8 semanas. Mas, estes níveis reduziram-se significativamente, após 24 semanas. A maioria dos estudos mostram que as saponinas diminuem o colesterol do soro apenas quando colesterol é adicionado à dieta. Nesse estudo, colesterol não foi adicionado, o que sugere que as saponinas se ligam aos ácidos biliares, formando complexos insolúveis, evitando assim sua reabsorção.

A redução nos níveis de colesterol poderia ser explicada pelo aumento da excreção do colesterol, por formação de complexos com as saponinas administradas por via oral ou, ainda, pelo aumento da eliminação fecal de ácidos biliares, conduzindo a uma maior utilização do colesterol para a síntese dessas substâncias (Schenkel et al., 1999). Uma outra proposta de mecanismo leva em consideração também as propriedades irritantes das saponinas. Com a formação de complexos entre as saponinas e o colesterol das membranas das células da mucosa intestinal, ocorreria uma esfoliação, com perda de função e redução da área de absorção (Johnson et al., 1986; Cheeke, 1996).

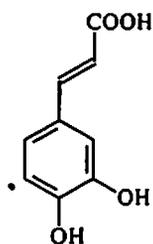
Evidências indicam que saponinas, que foram anteriormente denominadas como antinutrientes, podem ser benéficas à saúde e à nutrição humana. No entanto, esses benefícios devem ser estudados, assim como os

possíveis efeitos tóxicos, níveis ingeridos e tipos de saponinas (Rao & Kendall, 1986).

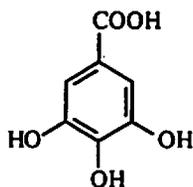
Wobeto (2003), estudando os antinutrientes da farinha de folhas de mandioca em três idades da planta, encontrou menores teores aos 12 meses (2,9 /100g de MS). Foi observado um aumento nos níveis de saponinas com a maturidade. Os teores encontrados, independente da cultivar e idade do vegetal, variaram de 1,74 a 4,73 g/100g de MS.

### **2.3 Polifenóis**

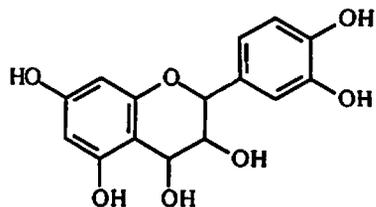
Os polifenóis constituem um grupo de substâncias caracterizadas como metabólitos secundários aromáticos de plantas que possuem um ou mais grupos hidroxila acídicos ligados a um anel aromático. Polifenóis podem ser divididos em diferentes classes dependendo de sua estrutura básica. Os flavonóides constituem uma das mais importantes classes de polifenóis, com mais de 5.000 compostos descritos. Sua estrutura comum é o difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ), que consiste de dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono que usualmente formam um heterociclo oxigenado (Bravo, 1998). Os compostos polifenólicos variam quanto à massa molar, podendo ser baixa, como ácido caféico, gálico e leucocianidina ou mais elevadas, com estruturas mais complexas, como taninos (Figura 5) (Croteau et al., 2000).



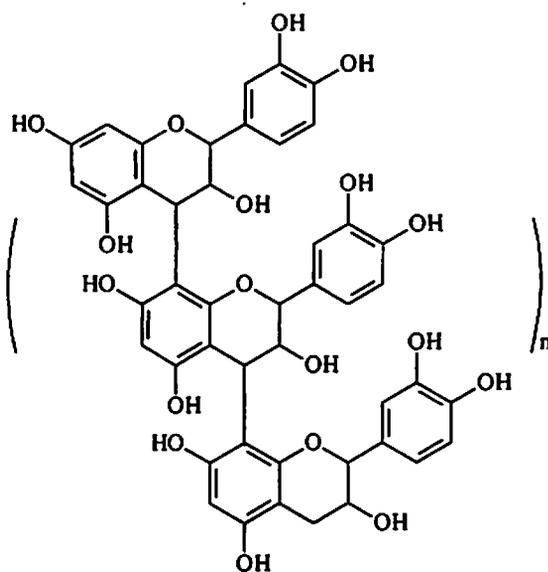
Ácido caféico (1)



Ácido gálico (2)



Leucocianidina (3)



Proantocianidina (4)

FIGURA 5 Polifenóis de baixa (1, 2 e 3) e alta massa molar (4).

### a) Taninos

Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molar entre 500 e 3.000 g/mol (Bate-Smith & Swain, 1962). Na forma não oxidada os taninos reagem com as proteínas por meio de ligações de hidrogênio e ou

ligações hidrofóbicas. Quando oxidados, os taninos se transformam em quinonas, as quais formam ligações covalentes, com alguns grupos funcionais das proteínas, como sulfídrico da cisteína e  $\epsilon$ -amino da lisina (Sgarbieri, 1996).

As ligações de hidrogênio são, provavelmente, formadas entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e as funções carbonílicas das ligações peptídicas das proteínas. Entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos protéicos ocorrem interações hidrofóbicas. Assim, as interações hidrofóbicas atuam como força de atração inicial na complexação em meio aquoso entre tanino e proteína (Luck et al., 1994).

Al-Mamary et al. (2001) estudaram a inibição das enzimas digestivas,  $\alpha$ -amilase, tripsina e lipase em coelhos, usando 1,4% e 3,5% de taninos. Os resultados indicaram que a adição de 1,4% de tanino na dieta animal não teve um efeito significativo no ganho de peso e no consumo alimentar. No entanto, a adição de 3,5% de tanino reduziu significativamente o ganho de peso corporal e aumentou o consumo alimentar em relação ao grupo controle. O aumento no consumo alimentar concomitantemente com a diminuição do peso corporal pode ser interpretada como uma consequência da redução da digestibilidade da maioria dos nutrientes essenciais, incluindo minerais.

Taninos podem ser classificados em duas categorias: taninos hidrolisáveis que, após hidrólise, produzem carboidratos e ácidos fenólicos, e taninos não hidrolisáveis ou condensados (proantocianidina), que são polímeros dos grupos flavan-3-ols e flavan-3,4-diols.

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente  $\beta$ -D-glicose, cujas hidroxilas são esterificadas com ácido gálico (galotaninos) ou ácido hexaidroxidifênico (elagitaninos). Após hidrólise, os elagitaninos liberam o ácido hexaidroxidifênico, que se rearranja espontaneamente para produzir ácido elágico (Melo & Santos, 1999).

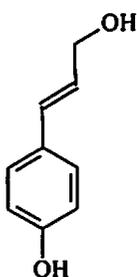
Nos taninos condensados ocorre condensação oxidativa entre carbono C-4 de um heterociclo e carbono C-6 ou C-8 da unidade adjacente. A maior parte das pesquisas refere-se apenas às proantocianidinas oligoméricas (trimeros, dímeros e tetrâmeros), devido à dificuldade de análise de moléculas com alta massa molar. Proantocianidina, no entanto, pode ocorrer com um grau de condensação de 50 ou mais unidades monoméricas. Condensação auto-oxidativa ou enzimática de unidades de flavan-3-ols ou flavan-3,4-diols tem sido sugerida como um processo que leva à formação de taninos condensados (Bravo, 1998).

Reed et al. (1982) identificaram quatro tipos de antocianidinas quando taninos condensados de folhas de mandioca foram tratados com HCl concentrado em n-butanol, apresentando maior quantidade de delphinidina. Analisando a fibra detergente neutro (FDN) obtida da FFM estes autores encontraram taninos e níveis elevados de proteína bruta. A quantidade de proteína bruta na FDN, que é insolúvel quando tratada com pepsina e protease, é altamente correlacionada com a quantidade de taninos na FDN. Dessa forma os taninos representam um importante fator limitante no valor nutritivo das folhas de mandioca.

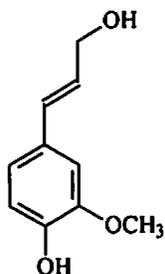
#### b) Ligninas

O termo lignina é proveniente da palavra latina *lignum* (madeira, lenhoso) e foi inicialmente usado para descrever a substância incrustada não celulósica presente no tecido lenhoso. Após a celulose, as ligninas são os produtos naturais orgânicos mais abundantes conhecidos, representando cerca de 20% a 30% de todo o tecido vegetal vascular (Buchanan et al., 2001).

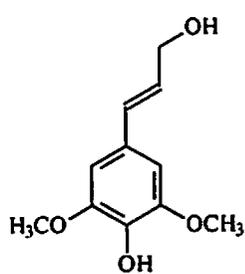
A molécula da lignina é uma macromolécula, com uma elevada massa molar, resultante do acoplamento aleatório de radicais formados pela oxidação enzimática de álcoois, como o p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 6) (Buchanan et al., 2001).



Álcool cumarílico



Álcool coniferílico



Álcool sinapílico

FIGURA 6 Unidades alcoólicas precursoras das ligninas.

A lignina é um polímero natural complexo em relação à sua estrutura e heterogeneidade e, por esse motivo, não é possível descrever uma estrutura definitiva da lignina. Não é digerida, nem absorvida no trato digestivo e também não é atacada pela microflora do intestino grosso. Pode ligar-se aos ácidos biliares e outros compostos orgânicos (por exemplo, o colesterol), retardando ou diminuindo a absorção desses componentes no intestino delgado (Márquez, 2004).

Ravindran & Ravindran (1988), estudando as mudanças na composição nutricional de folhas de mandioca em três estágios de maturidade, encontraram menores teores de lignina (0,9 g/100g MS) em folhas muito jovens, quando comparadas à folhas jovens (4,1 g/100g MS) e maduras (8,4 g/100g MS). Isto deve-se à maior deposição de lignina em folhas maduras.

### c) Ação antioxidante

Quimicamente, antioxidantes são compostos aromáticos que possuem, pelo menos, uma hidroxila, podendo ser sintéticos, como BHA (t-butilhidroxianisol) e o BHT (t-butilhidroxitolueno), amplamente utilizados

pela indústria de alimentos, ou naturais, substâncias bioativas tais como fenólicos e terpenos, presentes em diversos alimentos (Kitts, 1994).

Os ácidos graxos e os alimentos que os contêm estão sujeitos a reações químicas que podem alterar as características do produto final. A reação de oxidação dos lipídios está relacionada ao número de duplas ligações, tendo como exemplo os ácidos linoléico e linolênico como substratos suscetíveis. Ácidos graxos saturados na presença de metais ou oxigênio e altas temperaturas também podem ser oxidados.

Os produtos da oxidação lipídica, além de produzirem hidroperóxidos que conferem odor e sabor desagradáveis aos alimentos, ainda podem desencadear a peroxidação *in vivo*, resultando em problemas de saúde (Halliwell, 1996).

Miura et al. (2000) relataram aumento da resistência à oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) *ex vivo*, em humanos, quando 300mg de extrato polifenólico de chá verde, contendo aproximadamente 240mg de catequina, foram ingeridos duas vezes diariamente, antes do café da manhã e jantar, por uma semana. O tempo de retardamento da oxidação foi significativamente prolongado por 13,7 minutos após a ingestão de catequina pelos animais experimentais, comparado com aquele antes do experimento. Este achado sugere fortemente que o consumo diário de chá verde (catequina) inibe a modificação oxidativa da LDL, reduzindo a depleção de vitaminas antioxidantes, levando à redução do risco de doenças cardiovasculares.

Polifenóis, especialmente epicatequina e epicatequina-galato são antioxidantes efetivos contra peroxidação induzida por AAPH - 2,2-azobis-(2-amidinopropano hidrocloreto) - em microssomas de fígado de ratos (Cai et al., 2002). Este estudo mostrou um efeito antioxidante sinérgico de polifenóis e antioxidantes endógenos, no qual o período de inibição da peroxidação aumentou significativamente quando os polifenóis foram adicionados antes do

início da reação, comparado ao período de inibição de quando polifenóis foram adicionados após depleção de antioxidantes endógenos.

## 2.4 Oxalato

O ácido oxálico, primeiro membro da série dos ácidos dicarboxílicos, encontra-se presente em diversos alimentos de origem vegetal constituintes da dieta humana, com elevadas concentrações no espinafre, cenoura, alface, amendoim, feijão, cacau e chá (Massey et al., 1993).

O ácido oxálico presente nos alimentos pode estar combinado com cátions, formando oxalatos solúveis (K, Na e  $\text{NH}_4^+$ ) ou oxalatos insolúveis (Mg,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ). Assim, o cozimento com água reduz a maior parte dos oxalatos solúveis e os insolúveis permanecem, em sua maioria, no vegetal (Midio & Martins, 2000).

Apenas 2%-6% dos oxalatos presentes na dieta são realmente absorvidos pelo trato gastrointestinal, o restante é degradado pela microflora intestinal ou eliminado pelas fezes (Midio & Martins, 2000). Em concentrações elevadas, liga-se ao cálcio para formar cristais que se agregam; frequentemente são grandes o suficiente para bloquear as vias urinárias. Estima-se que 70% a 80% dos cálculos renais sejam constituídos de oxalato de cálcio (Massey et al., 1993).

Kayashima & Katayama (2002), investigando o efeito do ácido oxálico sobre a oxidação do ácido ascórbico na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , observaram uma redução na velocidade de oxidação em uma maneira dose dependente. A proteção do oxalato contra a oxidação do ascorbato pode ser devido à alta afinidade do oxalato em formar complexos com o íon cobre. Estes resultados sugerem que o ácido oxálico pode ser útil como um antioxidante natural.

Existem relatos sobre danos provenientes da ingestão de alimentos contendo oxalatos, no entanto, um efeito crônico é observado apenas quando

uma elevada ingestão de oxalato e, baixa ingestão de cálcio e de vitamina D são ministrados por um período prolongado (Loures & Jokl, 1990).

Corrêa (2000), analisando as folhas de mandioca da cultivar Baiana submetidas a diferentes formas de secagem, observou teores de ácido oxálico variando de 1,94 a 2,75 g/100g de MS. Já Wobeto (2003), aos 12 meses de idade da planta, encontrou teores que variaram de 1,36 a 2,48 mg/100g de MS.

## 2.5 Glicosídeos cianogênicos

Glicosídeos cianogênicos constituem um grupo de substâncias naturais que originam, por hidrólise, uma cetona ou aldeído, um açúcar e um íon cianeto. A toxicidade destes glicosídeos deve-se à liberação de cianeto (Barcelos, 2002). As folhas de mandioca apresentam três tipos de glicosídeos cianogênicos: a linamarina, a lotaustralina e 2-((6- $\alpha$ - $\beta$ -D-apiofuranosil)- $\beta$ -D-glicopiranosil)oxi-2-metilbutanonitrila) (Prawat et al. 1995). A linamarina é o glicosídeo encontrado em maior quantidade em folhas de mandioca, cerca de 95%.

A hidrólise de glicosídeos cianogênicos pode ocorrer por ação enzimática (Figura 7), quando a integridade física da planta é danificada. A hidrólise enzimática envolve duas enzimas: a  $\beta$ -glicosidase, que hidrolisa a ligação  $\beta$ -glicosídica, liberando a cianidrina e um açúcar (passo 1) e a hidroxinitrilolase, que dissocia a cianidrina para originar o correspondente aldeído ou cetona (passo 2).

O ácido cianídrico exerce efeito tóxico no organismo devido à sua grande afinidade pelo ferro no seu estado férrico. Dessa maneira, reage rapidamente com o íon trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ) da citocromo oxidase ou citocromo  $a_3$  da cadeia respiratória. Como resultado, há inibição da etapa citocromo  $a$ -citocromo  $a_3$ , interrompendo o transporte de elétrons para o oxigênio molecular (Midio & Martins, 2000). A dose letal de HCN para o homem oscila entre 0,5 e 3,5 mg/kg de peso corpóreo (Wogan & Marletta, 1993).

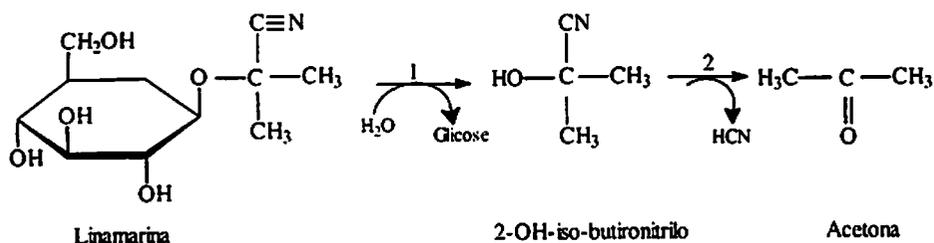


FIGURA 7 Hidrólise da linamarina (McMahon et al., 1995).

O tratamento é dirigido no sentido da reversão da ligação do ácido cianídrico com a citocromo oxidase. Um dos tratamentos consiste na administração intravenosa do nitrito de sódio, que converte a hemoglobina em metemoglobina. O ferro contido no grupo heme, agora no estado férrico, compete com a citocromo  $a_3$  pelo ácido cianídrico. Sendo a afinidade da metemoglobina pelo cianeto maior, ocorre formação de cianometemoglobina e restauração da citocromo oxidase. A remoção do cianeto do organismo é feita em uma segunda etapa. Para isso, tiosulfato de sódio é administrado intravenosamente, acelerando-se, assim, a conversão do cianeto por meio da enzima rodanase em tiocianato, que é muito menos tóxico e excretado pela urina (Midio & Martins, 2000). A hidroxicoalamina (Vitamina  $B_{12}$ ) também exerce funções de desintoxicação, pois retém o cianeto como cianocobalamina, sendo facilmente liberada pela exposição à luz (Montgomery, 1980).

A partir de observações epidemiológicas, tem-se estabelecido uma relação entre a exposição permanente de glicosídeos cianogênicos e certas enfermidades: bócio, neuropatia atáxica tropical e Konzo, uma paralisia rápida e permanente (Osuntokun, 1981; OMS, 1992). A tolerância ao cianeto parece ter correlação com o estado nutricional do indivíduo, pois deficiências de vitaminas

do complexo B e aminoácidos sulfurados resultam em maior propensão a intoxicações (Montgomery, 1980).

O nível de cianeto em folhas de mandioca varia de 3 a 4.000 mg/kg de peso fresco (Barrios & Bressani, 1967; Ravindran & Ravindran, 1988). As condições de secagem influenciam nos teores de cianeto. Gómez & Valdivieso (1985) observaram maiores perdas de cianeto pela secagem ao sol (82% a 94%) do que secagem em estufa a 60°C (68% a 76%). Corrêa (2000) obteve menores teores residuais de cianeto na FFM quando secou as folhas à sombra em relação à secagem ao sol e em estufa a 30°C-40 °C.

Chew (1972) relatou que as folhas de 18 cultivares de mandioca, cultivadas sob condições idênticas, apresentaram teores de ácido cianídrico que variaram entre 174 e 622 mg/kg de peso fresco. Assim, a variação do nível de cianeto das folhas depende consideravelmente do fator genético.

Brassir & Fafunso (1976), estudando as principais técnicas de pré-cozimento de folhas de mandioca, observaram que folhas trituradas, cozidas por 15 minutos e, em seguida, lavadas com água, sofreram reduções de, em média, 85% do valor original de cianeto nas folhas frescas. Além disso, o cozimento subsequente removeu quase todo o cianeto remanescente, restando de 1 a 2 mg/kg. Esta parece ser a forma mais eficiente de eliminação de cianeto em folhas de mandioca.

## **2.6 Hemaglutininas**

Hemaglutininas ou lectinas são glicoproteínas que têm a propriedade específica de se ligar a certos carboidratos. Devido a esta propriedade as hemaglutininas podem ligar-se a certos componentes da membrana das células sanguíneas provocando hemaglutinação. Apresentam, em geral, massa molar entre 80.000 e 130.000 g/mol e um teor de sacarídeo em suas moléculas entre 5%-13% (Sgarbieri, 1987).

As hemaglutininas são muito difundidas na natureza. Os extratos de aproximadamente 800 espécies vegetais apresentam atividade aglutinante (Shibamoto & Bjeldanes, 1996). A toxicidade e a resistência térmica das lectinas são bastante variáveis entre espécies de leguminosas e mesmo entre variedades de uma mesma espécie (Sgarbieri, 1987).

Lectinas, ao serem ingeridas como alimento ou na forma livre e em grande quantidade, ligam-se a membranas das microvilosidades intestinais provocando a degradação das células e das vilosidades e, conseqüentemente, interferindo na absorção de nutrientes (Sgarbieri, 1987).

Wobeto (2003) observou redução da atividade hemaglutinante em farinha de folhas de mandioca com a maturidade do vegetal, não tendo aos 17 meses, sido detectadas a atividade hemaglutinante para as cultivares Mantiqueira, IAC 289-70 e Mocotó.

## **2.7 Lipídeos plasmáticos e suas relações com doenças cardiovasculares**

A hipercolesterolemia é um fator de risco importante no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Intervenções terapêuticas no sentido de normalizar a colesterolemia são de grande importância na prevenção e diminuição da taxa de mortalidade apresentada por essa doença (Report..., 1988). As doenças coronárias são responsáveis por aproximadamente 70%-80% das mortes em indivíduos acima de 65 anos (Águila et al., 1997).

Pacientes com níveis de CT superiores a 240 mg/dL (6,2 mmol/L) e TAG acima de 200 mg/dL (2,3 mmol/L) apresentam hiperlipemia. No entanto, para se avaliar o risco cardiovascular, é preferível utilizar a concentração de colesterol na fração LDL (LDL-c). Numerosos estudos demonstraram que as concentrações plasmáticas de LDL-c encontram-se relacionadas, de forma direta e causal, com o risco coronário, enquanto que os valores de HDL-c estão relacionados de forma inversa. As concentrações plasmáticas de TAG entre 200

e 400 mg/dL (2,3-4,5 mmol/L) também estão associadas a um risco coronário elevado, especialmente no caso de estarem acompanhados de valores de HDL-c inferiores a 35 mg/dL (0,9 mmol/L), em homens e a 40 mg/dL (1,1 mmol/L), em mulheres (Carmena, 2000).

O colesterol, os ésteres do colesterol, bem como os TAG, são essencialmente insolúveis em água. Esses lipídeos precisam, entretanto, ser transportados de um tecido de origem (ou o fígado, onde são sintetizados, ou o intestino, onde são absorvidos) para os tecidos, nos quais eles serão armazenados ou consumidos (Lehninger et al., 1995).

Para esse transporte, o organismo utiliza as lipoproteínas plasmáticas (Figura 8), que são agregados de moléculas com forma aproximadamente esférica. São constituídas de componentes altamente hidrofóbicos em seu interior, como colesterol esterificado, TAG, além de vitaminas lipossolúveis, e moléculas periféricas, como fosfolipídeos e colesterol não esterificado. As proteínas designadas apoproteínas formam segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, podendo ser passíveis ou não de transferência para outras lipoproteínas, como a apoproteína periférica e integral (Quitão & Nakandakare, 1992).

Diferentes combinações de lipídeos e proteínas dão origem a partículas com densidades diferentes, variando de lipoproteínas com densidade muito baixa (VLDL) até lipoproteínas de alta densidade (HDL). Cada lipoproteína tem uma função específica, determinada por seu lugar de síntese, composição lipídica e conteúdo de apoproteína (Lehninger et al., 1995).

Os quilomícrons são as lipoproteínas maiores e as menos densas, contendo uma alta proporção de TAG. Sua função é transportar os ácidos graxos da dieta para os tecidos onde serão consumidos ou armazenados como combustíveis (Lehninger et al., 1995). Os quilomícrons formam a maior parte

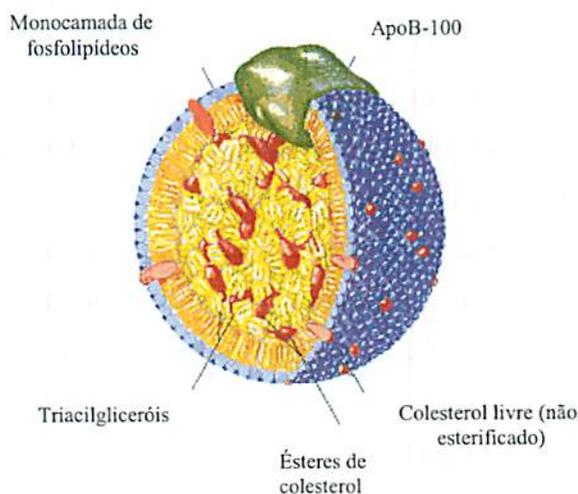


FIGURA 8 Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade (Lehninger et al., 1995).

das lipoproteínas e o número, o tamanho e a composição das partículas secretadas dependem do aporte e da natureza dos lipídeos absorvidos, ou seja, partículas grandes são formadas durante o pico de absorção dos lipídeos. A agregação dos quilomícons em formação ocorre no retículo endoplasmático das células do epitélio intestinal e, na face externa do sistema de membranas, ocorre a síntese da principal apolipoproteína dos quilomícons, a apoB-48. Uma vez constituídos, são transportados do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, onde incorporam novas proteínas em sua superfície, possivelmente a apoA-I e a apoA-IV, além de carboidratos que constituem a apoB-48 glicosilada (Camejo & Hurt-Camejo, 2000).

No plasma, as apoA-I e apoA-IV dos quilomícons são transferidas para a HDL, enquanto ocorre a transferência de apo-E e apolipoproteína do grupo C para os quilomícons. A apoE modula a associação dos quilomícons com a

superfície das células e as apoC-II e C-III regulam a atividade da lipoproteína lipase sobre seus TAG (Camejo & Hurt-Camejo, 2000).

Quando a dieta contém ácidos graxos acima do necessário como combustível estes são convertidos em TAG no fígado e unidos com apolipoproteínas específicas, colesterol e ésteres de colesterol, para formar a VLDL. Os carboidratos em excesso que chegam pela dieta também podem ser convertidos em TAG no fígado e exportados como VLDL. Estas lipoproteínas são transportadas do fígado para outros tecidos, onde liberam os ácidos graxos que serão utilizados como fonte de energia ou armazenados (adipócitos) em gotículas lipídicas intracelulares (Lehninger et al., 1995).

A perda dos TAG converte as VLDL em LDL. A LDL carrega o maior conteúdo de colesterol, transportando-o para regiões onde exerce papel fisiológico, como formação de membranas celulares, de hormônios esteroidais e de sais biliares. Cerca de 60% a 70% do CT do plasma encontram-se nesta fração, dos quais  $\frac{3}{4}$  estão sob a forma esterificada (Gotto et al., 1986).

A HDL é sintetizada no fígado como partículas pequenas ricas em proteína e contendo relativamente pouco colesterol e ésteres de colesterol. As HDL contêm a enzima lecitina-colesterol aciltransferase, que catalisa a formação de ésteres de colesterol a partir da fosfatidilcolina e colesterol, os quais entram no interior da HDL. Sua função é o transporte de colesterol livre, dos tecidos periféricos para o fígado (transporte reverso do colesterol). É denominado bom colesterol por sua função e isso torna seu controle muito importante (Leite, 1994).

Um nível sanguíneo elevado de LDL ou lipoproteínas ricas em colesterol pode levar a uma maior infiltração dessa lipoproteína para o espaço subendotelial onde sofre modificações principalmente oxidativas, tornando a lipoproteína reconhecida pelos receptores scavenger que captam impurezas, presentes nos macrófagos que, diferentemente dos receptores da LDL nativa,

não são regulados pelo conteúdo intracelular de colesterol. Assim, a captação de lipoproteínas acarreta acúmulo de colesterol intracelular nos macrófagos, originando as células espumosas das lesões ateroscleróticas iniciais (Steinberg et al., 1989).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Farinha de folhas de mandioca

#### 3.1.1 Colheita e preparo da amostra

Folhas maduras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Cacao), originárias da Fazenda Rio Grande, município de Lavras, MG, foram colhidas aleatoriamente aos 12 meses de idade da planta (Figura 9), no mês de dezembro de 2003 e transportadas para o Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. As folhas foram lavadas em água corrente e água destilada, colocadas em bancada para escorrer e, em seguida, secas em estufa ventilada à temperatura de 30°C a 35°C. Os pecíolos foram retirados após 24 horas de secagem. Em seguida, após um período de 48 horas,



FIGURA 9 Parte aérea de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Cacao).

as folhas foram trituradas em moinho. A farinha das folhas de mandioca (FFM) foi armazenada em recipiente de plástico e estocada em geladeira, até as análises e uso nas dietas experimentais. As análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.1.2 Composição centesimal**

As umidades das folhas frescas e da FFM foram determinadas por dessecação em estufa a 105°C até peso constante. O extrato etéreo (EE) foi determinado utilizando-se extrator contínuo tipo Soxhlet. A proteína bruta (PB) foi dosada pelo conteúdo de nitrogênio total, pelo método Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão 6,25. A cinza, resíduo mineral fixo, foi obtida pela incineração (550°C) em forno tipo mufla, de uma quantidade definida de FFM, determinando-se a porcentagem do resíduo (AOAC, 1995).

A fibra em detergente ácido (FDA) e a fibra em detergente neutro (FDN) foram quantificadas pelo método proposto por Van Soest, descrito por Silva (1990). Após digestão da amostra com soluções de detergente ácido e detergente neutro, os extratos foram filtrados em cadinhos filtrantes e lavados com água quente e acetona. Os cadinhos foram levados para a estufa (105°C) e a quantidade de fibras determinada por diferença de peso.

A lignina foi obtida a partir da FDA, utilizando-se o método do permanganato de potássio (Silva, 1990). Foram adicionadas soluções de desmineralização e permanganato de potássio aos cadinhos contendo a FDA que, em seguida, foram succionados e lavados com acetona. Os cadinhos foram levados para a estufa (105°C) e a quantidade de lignina determinada por diferença de peso.

A hemicelulose foi obtida por diferença entre FDN e FDA e a celulose foi obtida por diferença entre FDA e lignina.

O extrato não nitrogenado (ENN) foi calculado por diferença, levando-se em consideração o teor de FDN para a fibra.

### 3.1.3 Composição mineral

Para quantificar os minerais (Fe, Zn, Mn, Cu, Ca, Mg, P, K e S), a FFM foi submetida a uma digestão nitroperclórica, em blocos digestores com controle de temperatura (Malavolta et al., 1997). O fósforo e o enxofre foram determinados por colorimetria, potássio por fotometria de chama e ferro, zinco, manganês, cobre, magnésio e cálcio por espectrofotometria de absorção atômica.

### 3.1.4 Vitamina C e $\beta$ -caroteno

O teor de vitamina C na FFM foi determinado pelo método colorimétrico segundo Roe & Kuether, descrito por Strohecker & Henning (1967). A vitamina C foi extraída com ácido oxálico sob agitação e, após filtração, foi dosada no extrato, empregando-se o 2,4-dinitrofenilhidrazina e usando-se o ácido ascórbico como padrão.

Para a determinação de  $\beta$ -caroteno, a FFM foi homogeneizada com uma mistura de acetona e hexano (4:6). O extrato obtido foi usado para a leitura de absorbância em espectrofotômetro a quatro comprimentos de onda: 453; 505; 645 e 663 nm (Nagata & Yamashita, 1992).

Os cálculos das concentrações de  $\beta$ -caroteno foram realizados utilizando-se a seguinte equação:

$$\beta\text{-caroteno (mg/100mL)} = 0,216 A_{663} - 1,22 A_{645} - 0,304 A_{505} + 0,452 A_{453}$$

A concentração mg/100 mL foi convertida para mg/100 g, considerando-se a quantidade de FFM utilizada (0,5g) e o volume no qual foi homogeneizada (15 mL).

### 3.1.5 Saponina

A saponina da FFM foi extraída com etanol sob agitação, à temperatura ambiente. O teor de saponina foi determinado pela reação da saponina com o

anissaldeído, em meio ácido, produzindo um composto de cor vermelha, cujo pico de absorvância ocorre em 430 nm (Baccou et al., 1977). A digitonina foi utilizada como padrão.

### **3.1.6 Polifenóis**

A extração de polifenóis da FFM foi realizada com metanol 50%, em refluxo por três vezes consecutivas, a 80°C. Os extratos de cada extração foram reunidos, evaporados até o volume de 10 mL e submetidos à dosagem de polifenóis utilizando-se o reagente de Folin-Denis, o qual é reduzido pelos fenóis a um complexo de coloração azul em solução alcalina, que é medido a 760 nm. O ácido tânico foi utilizado como padrão, conforme metodologia descrita por Goldstein & Swain (1963).

### **3.1.7 Oxalato**

O oxalato da FFM foi extraído a quente com ácido clorídrico, precipitado e quantificado pela titulação do oxalato de cálcio com permanganato de potássio (Loures & Jokl, 1990).

### **3.1.8 Cianeto**

A extração dos glicosídeos cianogênicos da FFM foi feita utilizando-se solução ácida e a concentração de cianeto medida após ação enzimática da linamarase obtida das folhas de mandioca, conforme metodologia descrita por Corrêa et al. (2002). O cianeto de potássio foi usado como padrão.

### **3.1.9 Atividade de hemaglutinina**

A extração das hemaglutininas da FFM foi realizada empregando-se solução salina, em agitação à temperatura ambiente. A análise foi feita em placa de microtitulação, fazendo-se uma série de diluições na base 2 e, em seguida,

adicionando-se a suspensão de eritrócitos 2% (sangue humano A, Rh<sup>+</sup>). Após 1 hora, procedeu-se a leitura visual da aglutinação e nova leitura foi realizada após 30 minutos. A hemaglutinação foi determinada visualmente como o correspondente ao máximo fator de diluição o qual mostrou capacidade de aglutinação (Calderón de la Barca et al., 1985).

### **3.1.10 Digestibilidade protéica *in vitro***

A FFM com teor de nitrogênio conhecido foi agitada com uma solução ácida de pepsina por 3 horas e após neutralização foi adicionada a solução de pancreatina, deixado-se em agitação por 21 horas. Ao finalizar a digestão, ácido tricloroacético a 10% foi adicionado para encerrar a ação enzimática e precipitar as proteínas não digeridas. Após centrifugação, dosou-se o nitrogênio no sobrenadante (Akeson & Stahmann, 1964). A caseína foi usada como controle e os resultados expressos em porcentagem.

### **3.2 Ensaio biológico**

Foram utilizados 32 ratos, machos albinos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, em fase de crescimento, com peso médio inicial de  $129,08 \pm 22,26$  g.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em sala com temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  (ciclo dia:noite 12 horas) e com acesso à ração e água *ad libitum*, por um período de 49 dias. O ensaio foi realizado no biotério do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA.

Após adaptação de 15 dias, com dieta padrão, os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, com oito animais por grupo, constituindo os tratamentos: controle - dieta padrão e três outros grupos experimentais com dietas contendo 5%, 10% e 15% de FFM. Em todos os

grupos, as dietas continham 1% de colesterol, mostrando-se isocalóricas e contendo o mesmo teor de proteína digestível.

As dietas experimentais (Tabela 1) foram preparadas de acordo com AIN-93G (Reeves et al., 1993) e analisadas em triplicata quanto aos teores de umidade, extrato etéreo, proteína bruta e cinza (AOAC, 1995) e FDN (Silva, 1990).

TABELA 1 Composição das dietas experimentais (g/100g)

Ingredientes	Grupos			
	Controle	5% FFM	10% FFM	15% FFM
Amido	40	40	40	40
Caseína <sup>1</sup>	20	19,5	19	18,5
Sacarose	10	10	10	10
Óleo	10	10	10	10
Celulose	5	3,5	2	0,5
Mistura mineral	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica	1	1	1	1
Metionina	0,5	0,5	0,5	0,5
Colesterol	1	1	1	1
Caolim	9	6	3	0
FFM	0	5	10	15
Total	100	100	100	100
kcal/100g	358,00	358,24	358,44	358,64
Fibra <sup>2</sup>	5,00	4,83	4,65	4,47
Proteína digestível <sup>2</sup>	15,00	15,05	15,11	15,16
Proteína bruta	15	16,11	17,23	18,35

<sup>1</sup>Contendo 75% de proteína bruta.

<sup>2</sup>Os teores de fibra (FDN - 26,50 g/100g) e proteína digestível (proteína bruta - 29,86 g/100g e digestibilidade protéica - 28,88%) encontrados na FFM foram descontados nos teores de celulose e caseína, respectivamente, para cada dieta.

### **3.2.1 Variáveis de desempenho**

O consumo de ração e o peso dos animais foram acompanhados semanalmente, calculando-se assim o consumo médio diário (CMD), o ganho de peso médio diário (GMD) e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), este último calculado pela divisão do ganho de peso do animal pelo total de alimento ingerido, conforme Pellett & Young (1980).

### **3.2.2 Sacrifício dos animais e colheita das amostras**

Ao término do experimento, os animais foram deixados em jejum por cerca de 12 horas e, em seguida, foram anestesiados com éter etílico por inalação em câmara fechada. O sangue foi retirado dos grandes vasos abdominais e, em seguida, centrifugado a 3.000 rpm, por 5 minutos, em centrífuga Eppendorf/Centrifuge 5415, para a obtenção do plasma, o qual foi armazenado em freezer a -10°C.

O fígado foi retirado por meio de laparotomia mediana, lavado em solução salina 0,9%, pesado, e estocado a -25°C para posteriores análises de umidade, extrato etéreo, colesterol total (CT) e estudo histopatológico.

### **3.2.3 Análises no sangue**

As análises de CT no sangue dos animais experimentais foram realizadas no início do experimento e ao fim de cada semana. As demais análises, no sangue e fígado, apenas ao fim da última semana.

#### **3.2.3.1 Colesterol total**

A dosagem de CT no sangue dos animais foi feita pelo método da colesterol oxidase, utilizando-se o kit enzimático-colorimétrico Bioclin®. Os ésteres de colesterol foram hidrolisados e, após oxidação, reagiram com 4-aminoantipirina, dando origem a um composto avermelhado, cuja intensidade é

diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra. As leituras de absorvância foram feitas a 500 nm.

### **3.2.3.2 Colesterol na fração HDL**

Para a dosagem de colesterol na fração HDL (HDL-c), foi utilizado o sistema para precipitação de proteínas. Neste método o colesterol na fração VLDL (VLDL-c), o colesterol na fração LDL (LDL-c) e os quilomícrons foram precipitados pelo ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio, após centrifugação. O HDL-c foi determinado no sobrenadante, utilizando-se a mesma metodologia de dosagem de CT.

### **3.2.3.3 Triacilgliceróis**

Os triacilgliceróis (TAG) foram determinados utilizando-se o kit enzimático-colorimétrico Bioclin<sup>®</sup>. Os TAG presentes na amostra foram hidrolisados e quantificados pela formação de um composto final colorido, cujo pico de absorvância ocorre em 500 nm.

### **3.2.3.4 Colesterol nas frações VLDL + LDL e relação entre colesterol na fração HDL e colesterol total**

O VLDL-c + LDL-c foi determinado pela fórmula:

$$\text{VLDL-c} + \text{LDL-c} = \text{CT} - \text{HDL-c}$$

A relação entre os teores de HDL-c e CT foi também determinada.

### **3.2.3.5 Atividades de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina**

As atividades de aspartato aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1), alanina aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) e fosfatase alcalina (FA; EC 3.1.3.1) foram medidas usando um kit comercial Bioclin<sup>®</sup>. O oxaloacetato ou piruvato

produzidos pela ação das enzimas AST ou ALT, respectivamente, reagiram com a dinitrofenilhidrazina. A intensidade de coloração da hidrazona formada em meio alcalino é proporcional à quantidade de oxaloacetato ou piruvato, em função da atividade enzimática. A leitura foi feita a 505 nm.

- A FA presente na amostra hidrolisa a timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. A atividade enzimática é proporcional à quantidade de timolftaleína formada que, em meio básico, adquire cor azul, cujo pico de absorbância se dá em 590 nm.

### 3.2.3.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinada como um marcador da peroxidação lipídica, utilizando o coeficiente de extinção molar  $1,56 \times 10^5$ , segundo método do Instituto Adolf Lutz (1985). O pigmento produzido na reação colorimétrica, cujo pico de absorção se dá em 535 nm, é resultante da condensação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico e uma de dialdeído malônico (Figura 9) (Araújo, 2004).

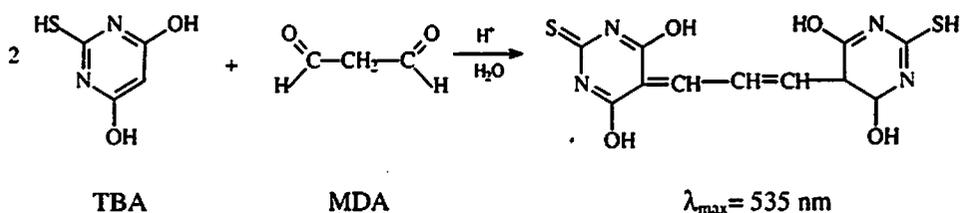


FIGURA 10 Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o dialdeído malônico (MDA).

### **3.2.4 Análises no fígado**

#### **3.2.4.1 Umidade e extrato etéreo**

A umidade e o teor de extrato etéreo foram determinados utilizando-se as metodologias propostas pela AOAC (1995). Os fígados foram secos a 65 °C até peso constante, finamente triturados e desengordurados com éter etílico em cartuchos de celulose, durante seis horas, em extrator tipo Soxhlet.

#### **3.2.4.2 Colesterol total**

As amostras de fígado secas e trituradas foram submetidas à extração lipídica com clorofórmio e metanol (2:1), conforme Folch et al. (1957). A dosagem foi realizada da mesma forma que para as análises sanguíneas.

#### **3.2.4.3 Análise histopatológica**

Um fragmento de fígado de cada rato foi fixado em formalina 10%. Os fragmentos foram embebidos em parafina, seccionados (5µm) e corados com hematoxilina e eosina (método HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio e identificadas quanto a presença de esteatose hepática (infiltração gordurosa) com lesão leve (+), moderada (++) ou acentuada (+++).

### **3.2.5 Análise estatística e procedimentos gerais**

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, que foram grupo controle e grupos contendo 5%, 10% e 15% de FFM, com oito repetições, representando, cada animal, uma parcela experimental.

Utilizou-se a análise de variância para as análises estatísticas dos resultados e quando significativa, o teste de Scott-Knott com  $p \leq 0,05$  foi

empregado para comparação a entre as médias, usando o programa Sisvar (Ferreira, 1999).

Para as variáveis CT, CMD, GMD, CEA e peso corpóreo usou-se o esquema de parcelas subdivididas no tempo. Para a descrição destas variáveis em função do período experimental (semanas), foram feitas análises de regressão.

Na Figura 11 é mostrado o fluxograma dos procedimentos gerais realizados com os animais experimentais.

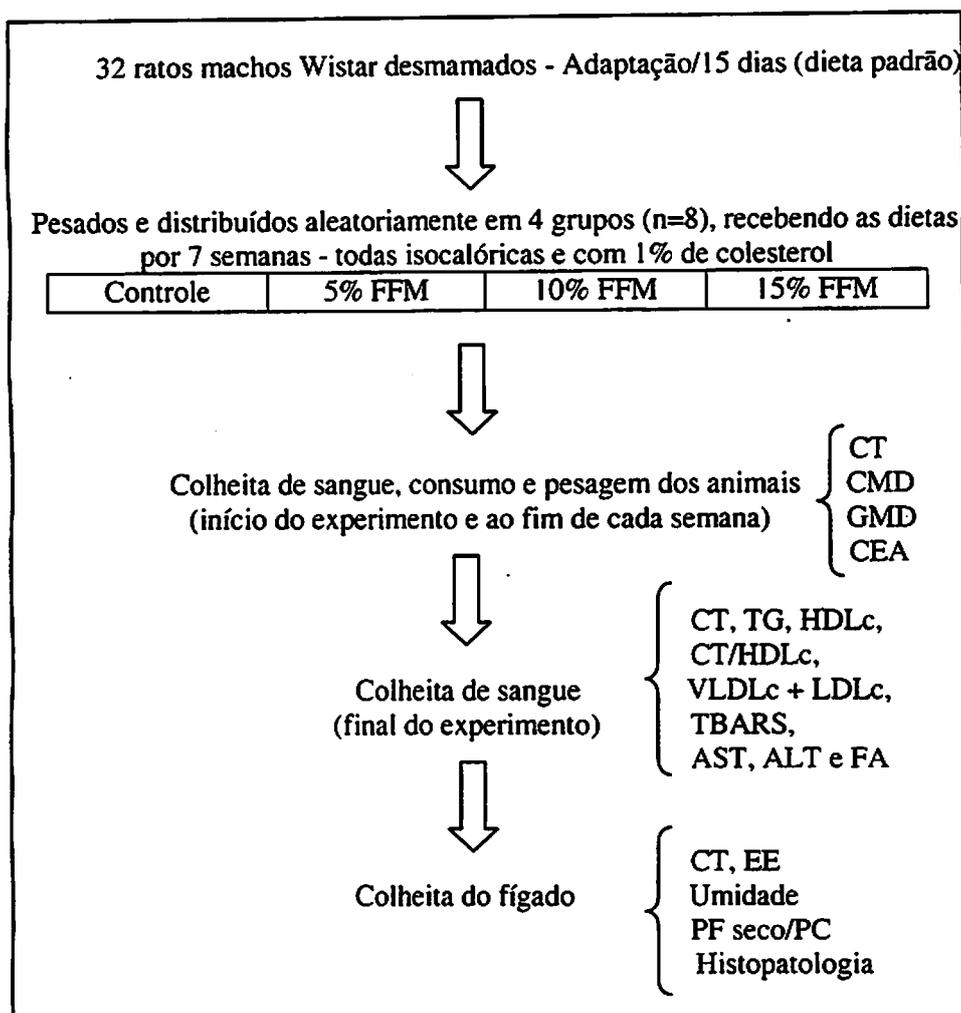


FIGURA 11 Fluxograma dos procedimentos gerais realizados com os animais experimentais

FFM - farinha de folhas de mandioca

CT - colesterol total

CMD - consumo médio diário

GMD - ganho médio diário

CEA - coeficiente de eficiência alimentar

TAG - triacilglicerol

HDL-c - colesterol na fração HDL

VLDL-c - colesterol na fração VLDL

LDL-c - colesterol na fração LDL

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

EE - extrato etéreo

AST - aspartato aminotransferase

ALT - alanina aminotransferase

FA - fosfatase alcalina

PF seco/PC - peso do fígado seco/peso corporal

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Farinha de folhas de mandioca

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da composição centesimal da farinha de folhas de mandioca (FFM).

TABELA 2 Composição centesimal da farinha de folhas de mandioca (FFM)

Constituintes	g/100g de FFM <sup>1</sup>
Umidade <sup>2</sup>	8,31 ± 0,04
Extrato etéreo	9,20 ± 0,03
Proteína bruta	29,86 ± 0,10
Fibra (FDN <sup>3</sup> )	26,50 ± 2,61
Cinza	6,15 ± 0,52
ENN <sup>4</sup>	19,98 ± 2,74

<sup>1</sup> Média de três determinações ± desvio-padrão.

<sup>2</sup> Umidade das folhas frescas de mandioca: 67,93 ± 0,06 g/100g

<sup>3</sup> FDN - fibra detergente neutro

<sup>4</sup> ENN - extrato não nitrogenado

O teor de proteína bruta (32,56 g/100g de matéria seca - MS) está dentro da faixa de variação relatada em outros trabalhos (18,94 a 34,82 g/100g MS), para as folhas de outros cultivares de mandioca (Rogers & Milner, 1963; Carvalho et al., 1986; Madruga & Câmara, 2000; Corrêa, 2000; Ortega-Flores et al., 2003a; Wobeto, 2003).

Os teores de extrato etéreo e cinza na FFM (10,03 e 6,71 g/100g MS) estão de acordo com os encontrados na literatura, que variaram de 6,64 a 15,24 g/100g MS e 4,65 a 7,39 g/100g MS, respectivamente (Rogers & Milner, 1963; Ross & Enriquez, 1969; Madruga & Câmara, 2000; Ortega-Flores et al., 2003a).

Na Tabela 3 são apresentados os teores dos componentes da fibra alimentar da FFM, com base na matéria seca.

TABELA 3 Componentes da fibra alimentar da farinha de folhas de mandioca (FFM)

Componentes	g/100g MS <sup>1</sup>
FDN <sup>2</sup>	28,90 ± 2,85
FDA <sup>3</sup>	22,35 ± 0,68
Lignina	16,80 ± 0,40
Celulose	5,55 ± 0,28
Hemicelulose	6,55 ± 1,55

<sup>1</sup> MS - matéria seca; média de três determinações ± desvio-padrão.

<sup>2</sup> FDN - fibra detergente neutro

<sup>3</sup> FDA - fibra detergente ácido

Reed et al. (1982), avaliando a composição química de folhas de mandioca, encontraram teores para FDN (35,40 g/100g MS), lignina (7,20 g/100g MS) e FDA (19,10 g/100g MS) diferentes dos encontrados neste trabalho. No entanto, Corrêa (2000) encontrou valores de FDN (32,82 g/100g MS) próximos aos deste trabalho e para FDA (26,81 g/100g MS) foram também diferentes. Essas diferenças encontradas, provavelmente, são inerentes à cultivar e devido à idade da planta e à maturidade das folhas.

Na Tabela 4 estão expressos os teores dos minerais Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca, P, K e S da FFM. O teor de Fe foi inferior aos encontrados por Wobeto (2003) e Fonseca (1996), que variaram de 125,4 a 290,3 mg/kg de MS e se apresentaram dentro da faixa citada por Chavez et al. (2000), de 61,5 a 151 mg/kg MS.

A absorção de Fe no solo diminui quando aumentam-se as concentrações de Zn, Ca e Mg (Fonseca, 1996). Dessa forma, o menor teor de

Fe da FFM pode estar relacionado aos elevados teores de Zn e Ca, que foram maiores que os encontrados por Fonseca (1996) e Wobeto (2003), que variaram para Zn de 31,33 a 68 mg/kg de MS e para Ca de 0,72 a 1,06 g/100g MS. Além da maior concentração de Zn e Ca no solo, o pH pode também ter influenciado a absorção deste mineral pela planta.

TABELA 4 Teores de minerais da farinha de folhas de mandioca

Minerais	Teores <sup>1</sup>
Ferro	105,77 ± 1,39 (mg/kg MS)
Zinco	91,89 ± 6,47 (mg/kg MS)
Manganês	333,69 ± 3,95 (mg/kg MS)
Cobre	14,02 ± 1,35 (mg/kg MS)
Magnésio	0,25 ± 0,00 (g/100g MS)
Cálcio	1,43 ± 0,01 (g/100g MS)
Fósforo	0,19 ± 0,01 (g/100g MS)
Potássio	1,19 ± 0,02 (g/100g MS)
Enxofre	0,31 ± 0,01 (g/100g MS)

<sup>1</sup>Média de três determinações ± desvio-padrão.

Nwokolo (1987), para obter informações sobre a biodisponibilidade dos minerais da FFM, elaborou um ensaio com pintos, no qual foi determinada a digestibilidade verdadeira dos mesmos. As folhas de mandioca apresentaram alta biodisponibilidade de Ca (78%), moderadamente alta de P (62,2%), Cu (59,7 %) e Mg (58,6 %), média de K (49,1 %) e baixa de Zn (43,7 %), Mn (40,3 %) e Fe (38,3 %).

O teor de Mn encontrado na FFM foi superior aos encontrados na literatura (50,3 a 192,87 mg/kg de MS) (Chavez et al., 2000; Wobeto, 2003) e os de Cu, Mg e Ca estão dentro da faixa de variação (4,05 a 29,1 mg/kg, 0,16 a

0,35 g/100g e 0,8 a 2,32 g/100g de MS, respectivamente) para FFM de outras cultivares e diferentes idades do vegetal (Wobeto, 2003; Madruga & Câmara, 2000; Carvalho et al., 1986).

Os níveis de P e K observados estão na faixa relatada na literatura (0,12 a 0,33 e 1,12 a 1,68 g/100g MS) para a FFM (Fonseca, 1996; Câmara & Madruga, 2001; Wobeto, 2003).

Chavez et al. (2000) encontraram, nas folhas de 20 clones de mandioca, teores de S de 0,26 a 0,30 g/100g de MS, valores próximos ao observado neste trabalho (0,31 g/100g MS).

Os fatores que provavelmente influenciaram as eventuais diferenças nos valores dos minerais analisados na FFM foram a maturidade do vegetal, as características genéticas das cultivares, pH e níveis destes nutrientes no solo.

As folhas de mandioca são particularmente ricas em Fe, Zn, Mn, Mg e Ca (Ravindran, 1993). A FFM estudada possui teores mais elevados destes minerais que hortaliças folhosas convencionais, o que pode ser observado nos dados da Tabela 5.

**TABELA 5** Comparação entre alguns minerais de hortaliças folhosas (mg/100g em matéria fresca) e a farinha de folhas de mandioca analisada neste trabalho

Minerais	Espinafre <sup>1</sup>	Couve comum <sup>2</sup>	Repolho <sup>3</sup>	Folhas de brócolis <sup>2</sup>	Agrião <sup>1</sup>	FFM
Fe	3,8	1,17	0,7	1,65		3,39
Zn		0,33		0,67		2,95
Mn		0,57			4,00	10,70
Mg	64,00	40,14				80,17
Ca		302,70	43,00		168,00	458,61

<sup>1</sup>Franco (1992).

<sup>2</sup>Santos (2000).

<sup>3</sup>Chitarra & Chitarra (1990).

Os teores de Vitamina C e  $\beta$ -caroteno (257,64 e 14,11 mg/100g MS) da FFM estão de acordo com os dados da literatura (1,70 a 419,00 e 4,74 a 137,38 mg/kg MS, respectivamente) para FFM de diferentes cultivares (Carvalho et al., 1986; Chavez et al., 2000; Corrêa, 2000; Wobeto, 2003).

• O teor de vitamina C (82,62 mg/100g matéria fresca - MF) na FFM compara-se aos da couve-flor (82,00 mg/100g MF) e couve (92,00 mg/100g MF) e são superiores aos do repolho (43,00 mg/100g MF), do rabanete (28,00 mg/100g MF) e do espinafre (41,00 mg/100g MF) (Chitarra & Chitarra, 1990).

O teor de  $\beta$ -caroteno (4,52 mg/100g MF) da FFM deste trabalho compara-se ao da cenoura crua (4,58 mg/100g MF), sendo superior ao da couve-chinesa (1,34 mg/100g MF) e relativamente inferior ao de algumas hortaliças folhosas, como mostarda (6,04 mg/100g MF) e taioba (6,57 mg/100g MF) (Almeida & Penteado, 1987; Minazzi-Rodrigues & Penteado, 1989).

Na Tabela 6 são mostrados os teores de saponina, polifenóis, oxalato, cianeto, atividade hemaglutinante e digestibilidade protéica *in vitro* da FFM.

TABELA 6 Fatores antinutricionais e digestibilidade protéica *in vitro* da farinha de folhas de mandioca (FFM).

Constituintes	FFM <sup>1</sup>
Saponina	1,07 ± 0,09 (g/ 100g MS)
Polifenóis	4,72 ± 0,64 (g/ 100g MS)
Oxalato	1,59 ± 0,12 (g/ 100g MS)
Cianeto	123,64 ± 13,42 (mg/100g MS)
Atividade hemaglutinante <sup>2</sup>	2
Digestibilidade protéica <i>in vitro</i>	28,88 ± 0,18 (%)

<sup>1</sup> Média de três determinações ± desvio-padrão.

<sup>2</sup> O resultado indica a maior diluição do extrato que ainda produziu aglutinação visível em sangue (tipo A Rh<sup>+</sup>). O número expressa o expoente da base 2, referente à diluição.

Wobeto (2003) encontrou níveis de saponina na FFM, independente da cultivar e aos 12 meses de idade da planta, variando de 1,74 a 4,41 g/100g de MS. O método utilizado para ambos os trabalhos foi o mesmo. Dessa forma a diferença observada, provavelmente, deve-se à cultivar analisada, dentre outros fatores.

Os teores de polifenóis e oxalato e a digestibilidade protéica *in vitro* da FFM estão dentro da faixa de variação encontrada na literatura (2,27 a 10,64 g/100g MS, 1,35 a 2,88 g/100g MS e 28,91% a 52,63%, respectivamente) para diferentes cultivares e processamentos (Padjama, 1989; Fonseca, 1996; Corrêa, et al., 2002; Wobeto, 2003).

O teor de cianeto na FFM foi superior aos encontrados por Corrêa (2000), cultivar Baiana, para folhas secas em estufa a 30°C e 40°C (36,22 e 56,46 mg/100g MS, respectivamente) e aos encontrados por Wobeto (2003), para diferentes cultivares e idades da planta e folhas secas à sombra (12,38 a 35,02 mg/100g MS). No entanto, Ravindran & Ravindran (1988) encontraram para folhas maduras secas ao sol e em seguida em estufa a 60°C por 24 horas, valores superiores (780 mg/100g MS). Esta ampla variação deve-se, provavelmente, às diferenças genética entre cultivares, às idades da planta, à fertilidade do solo, e às formas de secagem das folhas.

A dose letal (DL<sub>50</sub>) de cianeto por via oral varia de 0,5 a 3 mg/kg de peso corporal (Wogan & Marletta, 1993). Assim para o cianeto encontrado na FFM estudada, a ingestão de 15 g de farinha para um indivíduo de 70 kg, que corresponde a 0,26 mg de cianeto/kg de peso corporal, ou como vem sendo usada na formulação de novos produtos na proporção de 3%, poderia ser considerada segura. Porém, é necessário ressaltar a toxicidade crônica atribuída ao consumo de doses menores de cianeto em um intervalo de tempo maior.

Foi encontrada atividade hemaglutinante na FFM até a segunda diluição na base 2 (2<sup>2</sup>), porém, Wobeto (2003) detectou hemaglutinação em FFM até a

primeira diluição na base 2 (2<sup>1</sup>). Segundo Wobeto, as espécies vegetais apresentam toxidez bastante variável e testes toxicológicos seriam recomendáveis com a hemaglutinina da FFM.

## **4.2 Ensaio biológico**

### **4.2.1 Dietas e variáveis de desempenho**

A adição da quantidade máxima de 15% FFM usada nas dietas experimentais foi baseada no estudo feito por Ortega-Flores et al. (2003a), que utilizaram a FFM como fonte protéica. Eles empregaram três níveis de FFM: 12,5g, 25g e 50g por 100g da dieta. Os resultados mostraram que apenas a dieta com 12,5 g de FFM não apresentou redução significativa quando comparada ao grupo controle em relação aos parâmetros coeficiente de eficiência alimentar (CEA), ganho de peso médio diário (GMD) e consumo médio diário (CMD). Portanto, valores próximos a 12,5g de FFM por 100g da dieta não trariam prejuízos para o desenvolvimento dos animais.

As dietas oferecidas aos animais em fase experimental foram submetidas à análise de composição centesimal, a qual segue apresentada na Tabela 7.

Observa-se que os teores de proteína bruta aumentaram da dieta controle para as dietas contendo 5%, 10% e 15% de FFM, pois levou-se em conta o teor em proteína bruta e a digestibilidade protéica *in vitro* da FFM na elaboração das mesmas.

Os teores de FDN da FFM foram considerados na elaboração das dietas e, portanto, os grupos com quantidades crescentes de FFM apresentaram praticamente a mesma concentração de FDN.

TABELA 7 Composição centesimal das dietas experimentais em g/100g<sup>1</sup>

Constituintes	Dietas			
	Controle	5% FFM	10% FFM	15% FFM
Umidade	9,22 ± 0,05	8,08 ± 0,28	9,12 ± 0,06	9,31 ± 0,10
Lipídeos	10,36 ± 0,28	11,74 ± 0,84	10,95 ± 0,60	10,52 ± 0,68
Proteína bruta	14,71 ± 0,67	16,79 ± 0,52	18,67 ± 0,19	19,81 ± 0,35
Cinza	10,67 ± 0,42	8,50 ± 0,14	6,18 ± 0,26	3,21 ± 0,16
FDN <sup>2</sup>	5,89 ± 0,21	5,52 ± 0,37	5,97 ± 0,46	5,23 ± 0,13
ENN <sup>3</sup>	49,36 ± 0,38	49,09 ± 1,82	49,70 ± 1,11	51,89 ± 1,01

<sup>1</sup>Média de 3 determinações ± desvio-padrão

<sup>2</sup>FDN - fibra detergente neutro

<sup>3</sup>ENN - extrato não nitrogenado

Na Tabela 8 estão apresentadas as médias do CMD, GMD e CEA. As análises de variâncias para estas variáveis, utilizando-se o esquema de parcelas subdivididas no tempo, mostraram diferenças significativas, a 1% de probabilidade, pelo teste F, apenas para o tempo (Tabela 1, Anexo).

TABELA 8 CMD e GMD e CEA dos ratos com as dietas, durante a fase experimental

Dietas <sup>1</sup>	CMD (g)	GMD (g)	CEA
Controle	14,92	2,97	0,187
5% FFM	15,01	2,93	0,198
10% FFM	14,86	2,92	0,198
15% FFM	14,73	2,93	0,204

<sup>1</sup>Controle - dieta padrão e dietas contendo 5%, 10% e 15% de FFM, todas com 1% de colesterol.

CMD - consumo médio diário

GMD - ganho de peso médio diário

CEA - coeficiente de eficiência alimentar



Ross & Enriquez (1969), avaliando o valor nutritivo de FFM adicionada às dietas nas proporções 0%, 3%, 5%, 10%, 15% e 20% em pintos, não encontraram diferenças significativas para o ganho de peso até a proporção 15% de FFM nas dietas. Ortega-Flores et al. (2003a) observaram que não houve diferenças significativas para tratamentos sobre o consumo da ração, ganho de peso e CEA quando 12,5 g de FFM/100g da dieta, correspondente a 2,5% como fonte de proteína, foram adicionados em dietas para ratos. Estes dados estão de acordo com os encontrados neste trabalho.

A adição de FFM não causou redução na ingestão das dietas, o que implica que, nestes três níveis analisados (5%, 10% e 15%), o sabor da FFM não interferiu na sua aceitação pelos animais.

Na Figura 12 são mostrados os dados do CEA dos grupos durante a fase experimental. No início do experimento, os valores do CEA foram maiores e, com o passar das semanas, foram decrescendo e, ao final do experimento, se mostraram próximos a zero, indicando que, no decorrer da última semana, não houve conversão líquida de alimento em peso corporal.

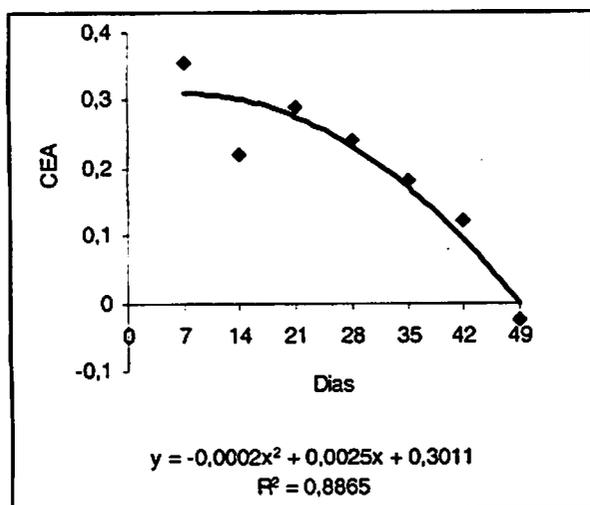


FIGURA 12 CEA dos ratos com as dietas, durante a fase experimental.

Na Figura 13 está representada a curva de crescimento dos ratos tratados por 7 semanas com dieta controle e contendo 5%, 10% e 15% de FFM. A análise de variância para os pesos dos animais no decorrer da fase experimental (curva de crescimento) mostrou diferença significativa, a 1% de probabilidade, pelo teste F apenas para o tempo (Tabela 2, Anexo).

concentração de colesterol na dieta leva a uma menor atividade desta enzima (Lehninger et al., 1995) e, provavelmente este foi o fator responsável pela redução do CT sanguíneo nas últimas semanas (Figura 13).

Na Tabela 9 são apresentados os teores médios das frações lipídicas no sangue dos ratos experimentais. As análises de variância dos teores de CT, colesterol na fração HDL (HDL-c), colesterol nas frações VLDL + LDL (VLDL-c + LDL-c) e relação HDL-c/CT no sangue, ao final do experimento, não mostraram diferenças significativas, pelo teste F (Tabela 3, Anexo).

Apesar do grupo controle ter apresentado as menores médias para CT e VLDL-c+LDL-c e as maiores para HDL-c e relação HDL-c/CT, elas não foram estatisticamente diferentes das dietas com FFM.

TABELA 9 Teores médios de parâmetros lipídicos (mg/dL) e de TBARS (nmol/mL) no sangue dos ratos, após 7 semanas com as dietas experimentais

Dietas <sup>1</sup>	CT	TAG	HDL-c	HDLc/CT	VLDL-c +LDL-c	TBARS <sup>2</sup>
Controle	77,65	23,70	49,03	0,613	31,60	0,98 a
5% FFM	91,32	26,02	45,34	0,528	46,39	0,93 a
10% FFM	83,84	23,58	45,82	0,559	38,61	0,75 b
15% FFM	85,17	29,73	42,40	0,489	44,50	0,55 b

<sup>1</sup>Controle - dieta padrão e dietas contendo 5%, 10% e 15% de FFM, todas com 1% de colesterol.

<sup>2</sup> Letras diferentes na coluna indicam que as médias diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

CT - colesterol total

TAG - triacilglicerol

HDL-c - colesterol na fração HDL

VLDL-c + LDL-c - colesterol nas frações VLDL e LDL

Vilas Boas (1979) avaliou o efeito da presença de fibras de folhas de mandioca sobre o CT sanguíneo em ratos, aos 15 dias, 30 dias e 45 dias. As

dietas apresentaram 6%, 19,2% e 28,8% de FFM e 0,2% de colesterol. Observou-se aumento de CT aos 30 dias e redução aos 45 dias para o grupo controle (sem FFM) e para os grupos alimentados com dieta contendo 19,2% e 28,8% de FFM. Na Figura 13 observa-se o mesmo comportamento. As dietas não reduziram o nível do CT sanguíneo dos ratos. Ao contrário, ocorreu um aumento significativo em relação ao grupo controle. A autora concluiu que o aumento do CT pode ser uma consequência de algum fator que favoreça a sua absorção e que a concentração de fibras na dieta pode não ter sido suficiente para reduzir a absorção do colesterol.

Considerando-se o teor de lignina da FFM, as dietas com 15%, 10% e 5% de FFM apresentaram 2,31, 1,54 e 0,77 g de lignina/100g de dieta, respectivamente. Valencia & Chavez (1997), investigando o efeito da suplementação de 1,25% de lignina, por um período de 4 semanas, observaram que os níveis de TAG no plasma foram significativamente reduzidos no grupo controle e no grupo com alta ingestão de colesterol. No entanto, neste trabalho não foi observado tal efeito, provavelmente devido ao tipo de lignina das folhas de mandioca. Segundo Marquéz (2004), quanto maior a hidrofobicidade da molécula de lignina, maior é sua capacidade para formar complexos com colesterol e ou ácidos biliares. Ou, talvez, porque a lignina da FFM, por estar contida na matriz do alimento, foi impedida de exercer sua ação.

Rao & Kendall (1986), avaliando o efeito da saponina (*Quillaja saponaria* Molina), demonstraram que um teor de 0,75% adicionado à dieta, em ratos, reduziu significativamente a concentração de TAG e CT no soro, comparados com o controle (sem colesterol), após 24 semanas. Considerando a quantidade de saponinas na FFM, as dietas com 15%, 10% e 5% de FFM continham 0,147, 0,098 e 0,049g/100g, respectivamente, quantidades relativamente inferiores. Os mesmos autores relataram que um período de 8 semanas não foi suficiente para reduzir os lipídeos sanguíneos. Jenkins & Atwal

(1994), analisando o efeito de diferentes tipos de saponinas, sarsaponin, gypsophila e quillaja, na proporção 0,1%, 0,3% e 0,9%, em pintos, por 28 dias, sobre as concentrações de CT e HDL-c, também não encontraram diferenças significativas entre os tratamentos. Assim, além dos menores níveis de saponinas ingeridos pelos animais, um período de 7 semanas provavelmente não foi suficiente para reduzir os lipídeos sanguíneos.

Zdunczyk et al. (2002), avaliando a atividade biológica de extratos de polifenóis de diferentes fontes, como catequinas de chá verde e taninos condensados de feijão faba, adicionados à dieta na proporção de 0,8g de polifenóis/100g de dieta, verificaram que apenas o extrato de catequina diminuiu o CT e a LDL-c no sangue. Sabe-se que folhas de mandioca são ricas em polifenóis e especialmente taninos condensados (Reed et al., 1982). Considerando-se a quantidade de polifenóis na FFM, 4,33 g/100g, as dietas com 15%, 10% e 5% de FFM apresentaram 0,66; 0,44 e 0,22 g de polifenóis/100g de dieta, respectivamente. Parece que esses teores de polifenóis, além de menores em relação ao estudo citado e sendo principalmente taninos, não foram suficientes para reduzir os teores de CT e a LDL-c + VLDL-c no sangue dos animais experimentais.

O uso de plantas medicinais com atividade antioxidante está diretamente relacionado ao conteúdo de taninos e flavonóides e, conseqüentemente, à sua atividade de sequestrar radicais livres (Fenglin et al., 2004). Como a FFM analisada apresentou uma quantidade considerável de polifenóis (4,33 g/100g), além da vitamina C (236,23 mg/100g) e  $\beta$ -caroteno (12,94 mg/100g), ao final do experimento, analisaram-se os teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sangue como marcador da peroxidação lipídica.

O grupo controle apresentou o teor médio de TBARS de 0,98 nmol/mL, e os grupos com 5%, 10% e 15% de FFM, 0,93 nmol/mL; 0,75 nmol/mL; 0,56 nmol/mL, respectivamente (Tabela 9). A análise de variância para estes dados

mostrou diferença significativa a 1% para o teste F (Tabela 4, Anexo). Os grupos contendo 10% e 15% de FFM não foram estatisticamente diferentes entre si, porém, foram menores ( $p \leq 0,01$ ) que os outros dois grupos. Constatou-se que as dietas contendo acima de 10% de FFM inibiram a formação de dialdeído malônico, mostrando que houve ação antioxidante dos compostos presentes nesta farinha.

#### 4.2.3 Atividades de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e análises no fígado

Na Tabela 10 estão apresentados os valores médios para as atividades destas enzimas no sangue. A análise de variância mostrou-se não significativa (Tabela 4, Anexo) para as enzimas fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e significativa para a alanina aminotransferase (ALT).

TABELA 10 Atividades de enzimas<sup>1</sup> no sangue dos ratos, após 7 semanas com as dietas experimentais

Dietas <sup>2</sup>	FA (U/L)	AST (U/mL)	ALT (U/mL)
Controle	62,56	133,62	42,21 a
5% FFM	71,45	149,62	89,08 b
10% FFM	61,30	141,20	78,91 b
15% FFM	56,50	144,28	69,94 b

<sup>1</sup> Letras diferentes na coluna indicam que as médias diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>2</sup> Controle - dieta padrão e dietas contendo 5%, 10% e 15% de FFM, todas com 1% de colesterol.

FA - fosfatase alcalina

AST - aspartato aminotransferase

ALT - alanina aminotransferase

A enzima AST é uma enzima encontrada em maior quantidade nas mitocôndrias, cerca de 80%, e não é liberada tão rápido como a ALT, a qual é

uma enzima puramente citosólica. AST está presente em altas concentrações em um grande número de tecidos, tal como coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas. A ALT é primariamente limitada ao citosol dos hepatócitos e é considerada um indicador altamente sensível de dano hepatocelular e, dentro de limites, pode fornecer uma taxa quantitativa do grau de danificação sofrido pelo fígado (Al-Habori et al., 2002). Dessa forma, o aumento apenas na atividade da enzima ALT deve-se provavelmente, à sua maior incidência no citoplasma dos hepatócitos e, portanto, pode ser liberada mais facilmente que AST, a qual se encontra majoritariamente nas mitocôndrias.

Hervás et al. (2003) estudaram a toxicidade de extratos de taninos do vegetal Quebracho, em cabras, nas proporções 0; 0,5; 1,5 e 3g de tanino/kg do peso corporal, administrado intra-ruminalmente uma vez ao dia, por um período de 21 dias. As atividades das enzimas FA e AST não sofreram alterações em todos os níveis de taninos. Já a atividade da ALT aumentou significativamente para o grupo que recebeu a dose 1,5g de tanino/kg de peso corporal. Comparando-se os teores de taninos ministrados às cabras com os teores de polifenóis ingeridos diariamente pelos ratos: 0,148; 0,296 e 0,444g de polifenóis/kg de peso, para as dietas com 5%, 10% e 15% de FFM, respectivamente, observa-se que foram inferiores. Como o período experimental do estudo citado foi maior, pode ser que os taninos na FFM tenham contribuído para a maior atividade da enzima ALT.

Okafor et al. (2002) investigaram os efeitos bioquímicos da exposição ocupacional e dietética do cianeto, a partir do processamento em grande escala e ingestão de mandioca, em humanos. Pessoas envolvidas no processamento de mandioca por mais de seis meses e consumidores freqüentes e infreqüentes de mandioca foram usados para um estudo de caso. Ocorreu um aumento em mais de 10% acima do normal de atividade da AST em 40% dos processadores; no entanto, esta diferença não foi significativa. As atividades de ALT e FA ficaram

dentro dos valores normais em todos os casos estudados. Neste trabalho, o cianeto presente na FFM e demais componentes, no período de 7 semanas, não provocou diferenças significativas nas atividades das enzimas AST, ALT e FA.

Para verificar possíveis danos hepatocelulares causados por substâncias tóxicas presentes na FFM, fez-se também o estudo histopatológico, complementando-se os dados obtidos nas análises enzimáticas (AST, ALT e FA).

O estudo histopatológico revelou vacuolização do citoplasma dos hepatócitos, vista predominantemente na região perilobular, para todos os grupos. No entanto, a frequência de animais com vacuolização acentuada foi superior nos grupos que receberam dietas com FFM (Figura 15). O acúmulo intracelular de água também produz vacúolos no citoplasma dos hepatócitos, mas o menor teor de umidade para os grupos com dieta contendo FFM e o maior teor de extrato etéreo indicam a ocorrência de degeneração gordurosa nos hepatócitos.

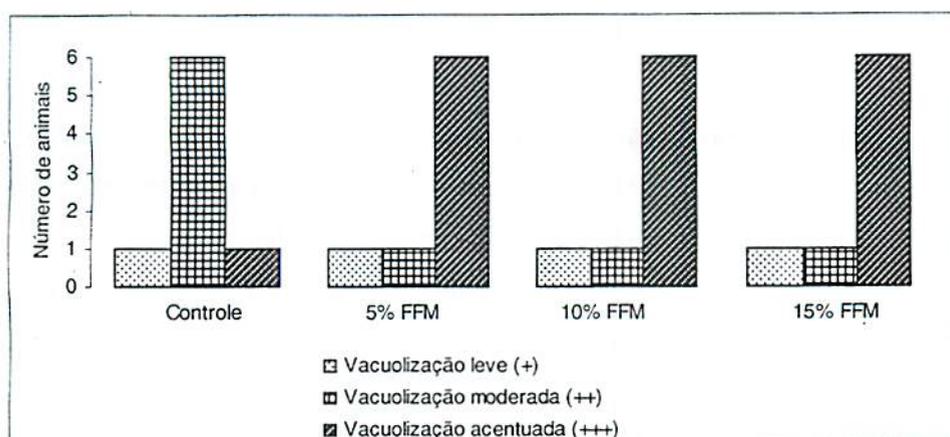


FIGURA 15 Distribuição das lesões observadas na análise histopatológica do fígado dos ratos, após 7 semanas de experimento.

Nas fotos da Figura 16 observa-se a vacuolização do citoplasma dos hepatócitos para cada nível de intensidade, leve (+), moderada (++) e acentuada (+++).

A vacuolização ou degeneração dos hepatócitos (esteatose hepática) ocorre todas as vezes que um agente interfere no metabolismo dos ácidos graxos da célula, aumentando sua síntese ou dificultando sua utilização, transporte ou excreção (Brasileiro Filho, 2004).

Nos estados de hipóxia, há redução da síntese de ATP. A hipóxia pode ser causada pelo cianeto, o qual se liga ao  $Fe^{3+}$  da citocromo oxidase e inibe a etapa citocromo a-citocromo  $a_3$ , interrompendo o metabolismo oxidativo (Midio & Martins, 2000). Nesses casos, a esteatose decorre, em boa parte, do aumento da síntese de ácidos graxos a partir do excesso de acetil-CoA, cuja oxidação no ciclo de Krebs está diminuída. Esses ácidos graxos encontram grande quantidade de glicerolfosfato, originado da glicólise acelerada pela redução da síntese de ATP e formam os TAG, que se acumulam no citoplasma (Brasileiro Filho, 2004). Este seria um mecanismo proposto para o acúmulo de lipídeos hepáticos nos ratos alimentados com folhas de mandioca, as quais apresentaram teores de cianeto considerados elevados.

Sousa et al. (2002) estudaram o efeito da exposição prolongada (15 dias) de cianeto de potássio em ratos nas doses 0,12; 0,36; 1,20 e 3,60mg de CN<sup>-</sup>/kg de peso corporal/dia, adicionado à água. Uma redução significativa no ganho de peso foi encontrada para o grupo exposto a 3,60mg de CN<sup>-</sup>/kg de peso corporal/dia quando comparado ao controle. O estudo histopatológico revelou degeneração dos hepatócitos para os grupos tratados com 1,20 e 3,60mg de CN<sup>-</sup>/kg de peso corporal/dia. Considerando-se o teor de cianeto quantificado na FFM (113,37 mg/100g) e ainda que cada animal ingeriu, em média, 15 g de dieta/dia e pesou, em média, 216 g, eles estariam ingerindo aproximadamente 3,93; 7,86 e 11,79mg de CN<sup>-</sup>/kg de peso corporal/dia. Possivelmente, o cianeto da FFM

apresentou o mesmo efeito hepatotóxico, sem, contudo, interferir no ganho de peso dos animais.

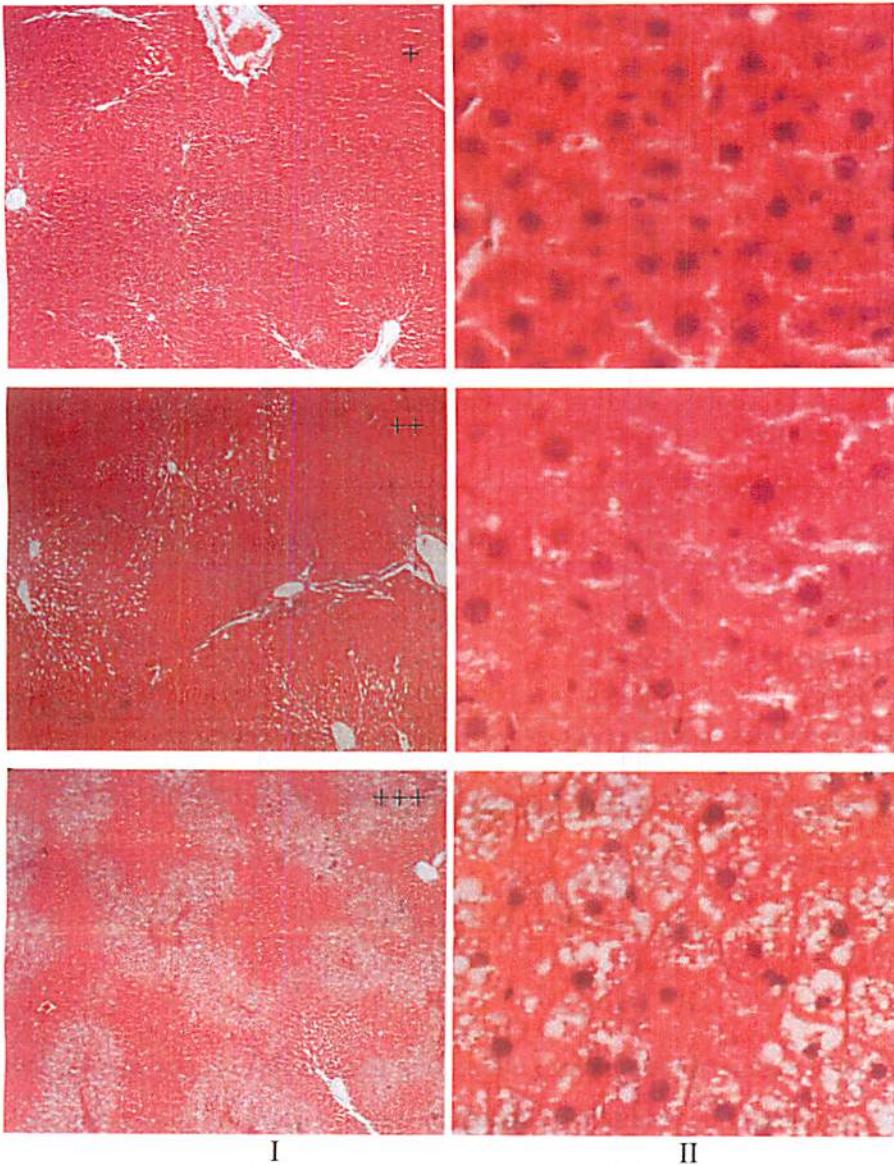


FIGURA 16 Vacuolização do citoplasma dos hepatócitos para cada nível de intensidade, leve (+), moderada (++) e acentuada (+++), corados com hematoxilina e eosina, x 40 (I) e x 400 (II).

Na Tabela 11 são apresentados os teores médios de umidade, extrato etéreo (EE), CT e relação peso do fígado seco/peso corporal. Na análise de variância da umidade, EE, CT e a relação peso do fígado seco/peso corporal, observaram-se diferenças significativas a 1% ou a 5% de probabilidade, pelo teste F, em todos os parâmetros estudados (Tabela 5, Anexo).

Comparando-se a dieta controle com as dietas contendo FFM, verifica-se que a controle foi significativamente diferente das demais (Tabela 11). Ela apresentou maior teor de umidade e menores teores de lipídeos e colesterol total e menor relação peso fígado/peso corporal.

TABELA 11 Teores médios<sup>1</sup> de umidade, EE, CT no fígado e relação PF seco/PC

Dietas <sup>2</sup>	Umidade g/100g	EE g/100g MS	CT mg/g MS	PF seco/PC
Controle	62,65 b	34,41 a	27,66 a	1,067 a
5% FFM	57,51 a	49,32 b	34,71 b	1,517 b
10% FFM	56,49 a	53,24 b	37,43 b	1,592 b
15% FFM	59,56 a	44,29 b	34,95 b	1,419 b

<sup>1</sup> Letras diferentes na coluna indicam que as médias diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>2</sup> Controle - dieta padrão e dietas contendo 5%, 10% e 15% de FFM, todas com 1% de colesterol.

EE - extrato etéreo

CT - colesterol total

PF seco/PC - peso do fígado seco/peso corporal

O maior teor de extrato etéreo nos fígados dos grupos que receberam FFM confirmam os resultados obtidos no estudo histopatológico e nas análises enzimáticas, cuja presença dos glicosídeos cianogênicos pode ter sido responsável pelo maior acúmulo de TAG neste órgão.

Machado et al. (2003), estudando o efeito de probiótico no peso do fígado de ratos alimentados com dieta contendo 1% colesterol e 0,1% de ácido cólico, observaram indução de fígado gorduroso nos animais, com aumento de peso e alteração de sua coloração normal. Neste trabalho, a cor do fígado não foi analisada, mas os maiores teores de extrato etéreo e CT nos grupos contendo FFM indicam o acúmulo de gordura no fígado.

Witthawaskul et al. (2003) estudaram a toxicidade subaguda de saponinas isoladas de *Schefflera leucantha* Vinguier em ratos, em uma dose oral de 1.000mg/kg de peso corporal/dia, por um período de 14 dias. Os resultados mostraram aumento no peso do fígado e na atividade das enzimas ALT, AST e FA no grupo tratado com saponina quando comparado ao grupo controle. Os autores concluíram que as saponinas têm um impacto direto sobre as funções do fígado e que uma avaliação adicional de toxicidade crônica é recomendada. Considerando a quantidade de saponinas na FFM, 980mg/100g, as dietas com 5%, 10% e 15% FFM continham 49, 98 e 147 mg de saponina/100g, respectivamente. Se cada rato ingeriu aproximadamente 15 g da dieta/dia e pesava, em média, 216g, a dose de saponinas ingerida foi 34,03, 68,06 e 102,08mg/kg de peso corporal/dia, respectivamente. Quando comparam-se as saponinas da dieta com 15% de FFM, com a quantidade de saponinas ingerida no trabalho citado, constata-se que é cerca de 10 vezes menores. Como houve uma grande diferença no tempo de duração dos experimentos, 14 e 49 dias, sugere-se que uma das causas para o aumento no peso do fígado nos grupos alimentados com FFM pode ser devido a saponina, cuja diferença nas quantidades foi compensada pelo maior tempo de exposição à substância.

As saponinas presentes na FFM não tiveram efeito sobre o perfil lipídico sanguíneo, provavelmente pela menor quantidade ingerida pelos animais e menor tempo experimental, comparados a outros estudos (Rao & Kendall, 1986; Jenkins & Atwal, 1994). No entanto, um maior período experimental poderia

reduzir CT e TAG sangüíneos, mas também levaria a um déficit da função hepática, ocasionado pelo maior acúmulo desses lipídeos no fígado.

## 5 CONCLUSÕES

Dietas isocalóricas contendo até 15% de farinha de folhas de mandioca e 1% de colesterol, cuja proteína digestível e fibra foram corrigidas, não apresentam efeitos significativos sobre o desenvolvimento dos animais e sobre o perfil lipídico sanguíneo. Além disso, interferem no metabolismo lipídico provocando degeneração gordurosa dos hepatócitos e aumentando a atividade da enzima alanina aminotransferase. Já as dietas contendo 10% e 15% de FFM apresentaram atividade antioxidante.

Apesar deste efeito positivo, para se recomendar o uso da farinha de folhas de mandioca como antioxidante, mais estudos devem ser realizados para identificar as substâncias causadoras das lesões hepáticas.

## **6 PERSPECTIVAS**

**A partir das constatações deste trabalho sugere-se:**

**a caracterização química e a realização de testes toxicológicos com os polifenóis, saponinas e hemaglutininas da folha de mandioca;**

**a realização de um ensaio biológico com a utilização de extratos brutos e ou purificados da folha de mandioca, a fim de investigar a atividade antioxidante e efeito hipolipidêmico;**

**avaliar o grau de toxicidade dos glicosídeos cianogênicos da farinha de folhas de mandioca em comparação ao cianeto de potássio.**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁGUILA, M.M. et al. Comparação morfológica e bioquímica entre ratos envelhecidos alimentados com dieta hiperlipídica e com óleo de canola (rica em ácido graxo n-3). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v.68, n.3, p.155-161, 1997.
- AKESON, W.R.; STAHMANN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.83, p.257-261, 1964.
- AL-HABORI, M. et al. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Ethno-Pharmacology**, Sana's, v.83, p.209-217, 2002.
- AL-MAMARY, M. et al. *In vivo* effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzyme and mineral absorption. **Nutritional Research**, Sana's, v.21, p.1393-1404, 2001.
- ALMEIDA, L.B. de; PENTEADO, M. de V.C. Carotenóides com atividade pró-vitamínica A de cenouras (*Daucus carota* L.) comercializadas em São Paulo, Brasil. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.23, n.2, p.133-141, 1987.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2004. 478p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of the analytical chemists**. 16.ed. Washington, 1995.
- BACCOU, J.C.; LAMBERT, F.; SAUVAIRE, Y. Spectrometric method for the determination of total steroidal sapogenin. **Analyst**, London, v.102, p.458-465, 1977.
- BARCELOS, M.F.P. **Substâncias tóxicas naturais em alimentos**. Lavras: UFLA, 2002. p.79-85. (Textos Acadêmicos).

BARRIOS, E.A.; BRESSANI, R. Composición química de la raíz y de la hoja de algunas variedades de yuca Manihot. **Turrialba**, San José, v.17, n.3, p.314-320, 1967.

BATE-SMITH, E.C.; SWAIN, T. **Comparative biochemistry**. New York: Academic, 1962. v.3.

BAYDAS, G. et al. Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation, and homocysteine levels in rats. **Archives of Medical Research**, Elazig, v.33, p.515-519, 2002.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 238p.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia geral**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.53-59.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. USA, 2001. 1367p.

CAI, Y. et al. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, Lanzhou, v.120, p.109-117, 2002.

CALDERÓN de la BARCA, A.M.; OCHOA, J.L.; VALENCIA, M.E. Effect of extration of a hemagglutinin on the nutritive value of amaranthus leucocarpus seeds. **Journal of Food Science**, v.50, p.1700-1772, 1985.

CÂMARA, F.S.; MADRUGA, M.S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin and aflotoxin contentes of Brazilian (Natal) multimistura preparation. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n.1, p.33-36, 2001.

CAMEJO, G.; HURT-CAMEJO, E. Mecanismos aterogênicos das lipoproteínas. In: **Hiperlipemias clínica e tratamento**. São Paulo: Americana, 2000. 42p. Fascículo 1.

CARMENA, R. Hiperlipoproteinemias: conceito e classificação. In: **Hiperlipemias clínica e tratamento**. São Paulo: Americana, 2000. 42p. Fascículo 1.

CARVALHO, V.D. de. et al. Efeito da época de colheita na produtividade e teores de vitamina C e  $\beta$ -caroteno da parte aérea de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.8, n.1, p.25-32, 1989.

CARVALHO, V. D. de. et al. Características nutritivas de fenos do terço superior e das folhas de cultivares de mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.5, n.1, p.63-70, 1986.

CHAVEZ, A. L. et al. Iron, carotene, and ascorbic acid in cassava roots and leaves. **Food and Nutrition Bulletin**, v.21, n.4, p.410-413, 2000.

CHEEKE, P.R. Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. In: WALLER, G.R.; YAMASAKI, K.(Ed.) **Saponins used in Food and Agriculture**. New York: Plenum, 1996. p.47-56.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320p.

CHEW, M. Y. Cyanide content of tapioca (*Manihot utilissima*) leaf. **Malaysian Agricultural Journal**, Kuala Lumpur, v.48, p.354-356, 1972.

CORRÊA, A.D. **Farinha de folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Baiana) – efeito de processamento sobre alguns nutrientes e antinutrientes**. 2000. 108p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CORRÊA, A.D. et al.. Farinha de folhas de mandioca - I – Efeito da secagem das folhas sobre a atividade da linamarase. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.2, p.368-374, 2002.

CORRÊA, A.D. et al., Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, n. 2, p. 159-164, 2004.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONER, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Berkeley: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1250- 1318.

EUFRÁSIO, M.R. **Ação de diferentes tipos de fibras sobre frações lipídicas do sangue e fígado de ratos**. 2003. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FENGLIN, H. et al. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, Hefei, v.75, p.14-23, 2004.

FERREIRA, D. F. **SISVAR: Sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 1999, 64p.

FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A. Simple method for isolation and purification of total lipids from animals tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.226, n.1, p.407-411, 1957.

FONSECA, H.M.T. **Composição química de folhas de mandioca (*M. esculenta* Crantz) tolerantes e suscetíveis ao estresse hídrico**. 1996. 90p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

FRANCO, G.V.E. **Tabela de composição química dos alimentos**. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 230p.

GOLDSTEIN, J.L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v.2, p.371-383, 1963.

GOMEZ, G.; VALDIVIESO, M. Cassava foliage: chemical composition, cyanide content and effect of drying on cyanide elimination. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v.36, p.433-441, 1985.

GOTTO, J.R.; POWNALL, H.J.; HAVEL, R.J. Introduction to the plasma lipoproteins. **Methods Enzymol.**, New York, v.128, p.3-141, 1986.

HALLIWEL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, 1996.

HERVÁS, G. et al. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. **Journal Comp. Pathology**, Leon, v.129, p.44-54, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo, 1985. 533 p.

JENKINS, J.K; ATWAL, A.S. Effects of dietary on fecal bile acids and neutral sterols, and availability of vitamins A and E in the chick. **Journal Nutr. Biochem.**, Ottawa, v.5, p.134-137, 1994.

JOHNSON, I.T. et al. Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport *in vitro*. **Journal Nutrition**, v.116, p.22-70, 1986.

KAYASHIMA, T.; KATAYAMA, T. Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, Higashi, v.1573, p.1-3, 2002.

KITTS, D.D. Bioactive substance in food: identification and potential use. **Canadia Journal of the Physiology and Pharmacology**, v.72, p.423-434, 1994.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. Tradução de Loodi, W. R.; Simões, A. A. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p. Título original: Principles of biochemistry.

LEITE, F.P. **Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Loyola, 1994.

BIRK, Y; PERI I. Saponins. In: LIENER, I.E. (Ed.). **Toxic constituents of pant foodstuffs**. 2.ed. New York: Academic, 1980. 161-182p.

LOREZI, J.O.; DIAS, C.A.C. Cultura da mandioca. **Boletim Técnico CATI**, Campinas, n.211, p.41, 1993.

LOURES, A; JOKL, L. Microtécnica para determinação de ácido oxálico em folhas e derivados. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 6., Curitiba, 1990. **Resumos...** Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná, 1990. p.59.

LUCK, G. et al. Polyphenols, astringency and proline rich proteins. **Phytochemistry**, v.37, p.357-371, 1994.

MACHADO, D.F. et al.. O. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, 2003.

MADRUGA, M.S.; CÂMARA, F.S. The chemical composition of multimistura as a food supplement. **Food Chemistry**, v.68, p.41-44, 2000.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: Potafos, 1997. 319p.



MÁRQUEZ, L.R. **A fibra terapêutica**. 2.ed. 2004. 175p.

MASSEY, L.K.; ROMAN-SMITH, H.; SUTON, R.A.L. Effects of dietary oxalate and calcium on urinary oxalate and risk of formation of calcium oxalate kidney stones. **Journal American Diet. Association**, v.93, n.8, p.901-907, 1993.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRG/Florianópolis UFSC, 1999, 821p.

McMAHON, J. M.; WHITE, W. L. B.; SAYRE, R. T. Cyanogeneses en cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal Experimental Botany**, Oxford, v.46, n.288, p.731-741, 1995.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 291p.

MINAZZI-RODRIGUES, R. S.; PENTEADO, M. de V. C. Carotenóides com atividade pró vitamínica A em hortaliças folhosas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.25, p.39-52, 1989.

MIURA, Y. et al. Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an *ex vivo* study in humans. **Journal Biochemistry**, Shizuoka, v.11, p.216-222, 2000.

MONTGOMERY, R.D. Cyanogens. In. LIENER, I.E. (Ed.). **Toxic constituents of plants foodstuffs**. 2.ed. New York: Academic, 1980. p.143-157.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomatoes fruit. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Tokio, v.39, n.10, p. 925-928, 1992.

NWOKOLO, E. Leaf meals of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) and sian weed (*Euopatorium odoratum* L.) as nutrient sources in poultry diets. **Nutrition Reports International**, Port Harcourt, v.36, n.4, p.819-826, 1987.

OKAFOR, P.N; OKOROWKWO, C.O; MADUAGWU, E. N. Occupational and dietary exposure of humans to cyanide poisoning from large-scale cassava processing and ingestion of cassava foods. **Food and Chemical Toxicology**, Ibadan, v.40, p.1001-1005, 2002.

OLIVEIRA, J.E.D.; SANTOS, A.C.; WILSON, E.D. **Nutrição Básica**. São Paulo: Sarvier, 1982. 286p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y sustancias tóxicas naturales: 39º informe del comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios**. Ginebra, 1992. 50p.

ORTEGA-FLORES, C. I. et al. Avaliação da qualidade protéica da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v.25, p.47-59, 2003.a

ORTEGA-FLORES, C. I. et al. Biodisponibilidade do  $\beta$ -caroteno da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.473-477, 2003.b

OSUNTOKUM, B.O. Cassava diet, chronic cyanide intoxication and neuropathy in Nigerien Africans. **World Rev. Nutr. Dietet.**, v.36, p.141-173, 1981.

PADMAJA, G. Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in cassava leaves. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Trivandrum. v.37, p.712-716, 1989.

PELLET, P.L.; YOUNG, V.R. **Nutritional evaluation of protein foods: Report of a working group sponsored by The International Union of Nutritional Science and the United Nations University World Hunger Programme**. Tokyo: The United Nations University, 1980. 153 p.

PRAWAT, H. et al. Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. **Phytochemistry**, Oxford, v.40, p.1167-1173, 1995.

QUINTÃO, E.C.R. **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992. 276p.

QUITÃO, E.; NAKANDAKARE, E.R. **Manual de referências em dislipidemias**. [S. l.: s.n.], p.106, 1992.

RAO, A.V.; KENDALL, C.W. Dietary saponins and serum lipids. **Food Chemistry**, Toronto, v.24, n.5, p.441, 1986.

RAVINDRAN, G.; RAVINDRAN, V. Changes in the nutritional composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves during maturity. **Food Chemistry**, Oxford, v.27, p.299-309, 1988.

RAVINDRAN, V. Cassava leaves as animal feed: potencial and limitations. Great Britain, **Journal Science Food Agricultural**, v.61, p.141-150, 1993.

REED, J.D. et al. Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.33, p.213-220, 1982.

REED, P.B. **Nutrition: an applied science**. St. Paul: West, 1980. 747p.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F.H.; FAHEEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN- 76 A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

REPORT of the National Cholesterol Education Program Expert Panel of Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. **Arch. Inter. Med.**, Chicago, v.148, p.36-69, 1988.

ROGERS, D. J.; MILNER, M. Amino acid profile of manioc leaf protein in relation to nutritive value. **Economic Botany**, New York, v.17, p.211-217, 1963.

ROSS, E.; ENRIQUEZ, F. Q. The Nutritive value of cassava leaf meal. **Poultry Science**, Hawaii, v.48, n.3. p.846-853, 1969.

SANTOS, M.A.T. dos. **Caracterização química das folhas de brócolis e couve-flor (*Brassica oleracea* L.) para utilização na alimentação humana**. 2000. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal de Lavras..

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: \_\_\_\_\_. **Farmacognosi da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/Florianópolis: UFSC, 1999. 821p.

SECRETARIA DO ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, Goiás.  
INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:

<<http://www.sectec.gov.br/links/institutos/ibge.htm>>. Acesso em :21 jan. 2005.

SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. São Paulo: Almed. 1987. 387p.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos: propriedades, degradação, modificação.** São Paulo: Varela, 1996. 203p.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L.F. **Introducción a la toxicología de los alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1996. p. 203.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (Métodos químicos e biológicos).** Viçosa: UFV, 1990. 166p.

SILVA, M.A.M. **Efeito das fibras dos farelos de trigo e aveia sobre o perfil lipídico no sangue e fígado de ratos.** 2002. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUSA, B. A. Does prolonged oral exposure to cyanide promote hepatotoxicity and nephrotoxicity? **Toxicology**, São Paulo, v.174, p.87-95, 2002.

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. **New England Journal Medical**, Boston, v.320, p.915-924, 1989.

STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Analises de vitaminas: métodos comprovados.** Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428p.

VALENCIA, Z.; CHAVEZ, E. R. Lignin as a purified dietary fiber supplement for piglets. **Nutrition Research**, Quebec, v.17, n.10, p.1517-1527, 1997.

VILAS BOAS, L. M. A. **Efeito da presença de fibras de mandioca na dieta sobre alguns parâmetros nutricionais e bioquímicos.** 1979. 68p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

WITTHAWASKUL, P. Acute and subacute toxicities of saponin mixture isolated from *Schefflera leucantha* Viguier. Chiang Mai, **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.115-121, 2003.

WOBETO, C. **Nutrientes e antinutrientes da farinha de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em três idades da planta.** 2003. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica)Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WOGAN, G.N.; MARLETTA, M.A. Componentes perjudiciales o potencialmente perjudiciales de los alimentos. In: FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1993. p.775-811.

ZDUNCZYK, Z. et al. Biological activity of polyphenol extracts from different plant sources. **Food Research International**, Madrid, v.35, p.183-186, 2002.

## ANEXO

	<b>Página</b>
TABELA 1A Resumo da análise de variância para o CMD e GMD e CEA dos grupos, durante a fase experimental.....	72
TABELA 2A Resumo da análise de variância para o CT e PC dos grupos, durante a fase experimental.....	73
TABELA 3A Resumo da análise de variância para alguns parâmetros lipídicos no sangue, após 7 semanas com as dietas experimentais.....	73
TABELA 4A Resumo da análise de variância da atividade das enzimas e teor de TBARS no sangue, após 7 semanas com as dietas experimentais.....	74
TABELA 5A Resumo da análise de variância dos teores de umidade, EE, CT no fígado e relação PF seco/PC dos grupos, após 7 semanas com as dietas experimentais.....	74

TABELA 1 Resumo da análise de variância para o CMD, GMD e CEA dos grupos, durante a fase experimental

FV	GL	QM		
		CMD	GMD	CEA
Tratamento	3	0,79 <sup>NS</sup>	0,02 <sup>NS</sup>	0,0038 <sup>NS</sup>
Resíduo 1	21	10,03	1,52	0,0102
Tempo	6	130,58**	97,44**	0,4928**
Resíduo 2	42	3,16	1,31	0,0077
Tempo x Trat	18	4,93 <sup>NS</sup>	1,67 <sup>NS</sup>	0,0078 <sup>NS</sup>
Resíduo 3	133	6,72	1,23	0,0086
CV 1 (%)		21,27	41,96	51,16
CV 2 (%)		11,95	38,90	44,33
CV 3 (%)		17,42	37,81	46,92

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste F.

CMD – consumo médio diário

GMD – ganho de peso médio diário

CEA – coeficiente de eficiência alimentar

**TABELA 2** Resumo da análise de variância para o CT e PC dos grupos, durante a fase experimental

FV	GL	QM	
		CT	PC
Tratamento	3	633,11 <sup>NS</sup>	167,25 <sup>NS</sup>
Resíduo 1	21	894,12	1175,83
Tempo	7	22053,83**	92392,13**
Resíduo 2	49	392,12	189,51
Tempo x Trat	21	216,14 <sup>NS</sup>	106,34 <sup>NS</sup>
Resíduo 3	154	323,66	1499,61
CV 1 (%)		42,83	15,81
CV 2 (%)		28,36	6,35
CV 3 (%)		25,77	17,86

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste F.

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

CT – colesterol total

PC – peso corporal (curva de crescimento)

**TABELA 3** Resumo da análise de variância para alguns parâmetros lipídicos no sangue, após 7 semanas com as dietas experimentais

FV	GL	QM				
		TAG	CT	HDL-c	VLDL-c +LDL-c	HDL-c/CT
Tratamento	3	66,16 <sup>NS</sup>	251,74 <sup>NS</sup>	59,14 <sup>NS</sup>	355,18 <sup>NS</sup>	0,021 <sup>NS</sup>
Resíduo	28	24,72	241,51	92,23	302,87	0,018
CV (%)		19,30	18,39	21,04	43,21	24,75

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste F.

TAG – triacilglicerol

CT – colesterol total

HDL-c – colesterol na fração HDL

VLDL-c + LDL-c – colesterol nas frações VLDL e LDL

TABELA 4 Resumo da análise de variância da atividade das enzimas e teor de TBARS no sangue, após 7 semanas com as dietas experimentais

FV	GL	QM			
		FA	AST	ALT	TBARS
Tratamento	3	311,44 <sup>NS</sup>	357,48 <sup>NS</sup>	3241,65*	0,29**
Erro	28	339,37	155,67	790,89	0,06
CV (%)		29,26	8,78	40,15	30,47

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste F.

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

FA – fosfatase alcalina

AST – aspartato aminotransferase

ALT – alanina aminotransferase

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TABELA 5 Resumo da análise de variância dos teores de umidade, EE, CT no fígado e relação PF (MS)/ PC dos grupos após 7 semanas com as dietas experimentais

FV	GL	QM			
		Umidade	EE	CT	PF seco /PC
Tratamento	3	58,89**	530,20**	141,20*	0,431**
Erro	28	6,85	53,87	45,89	0,075
CV (%)		4,43	16,20	20,10	19,68

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

EE – extrato etéreo

CT – colesterol total

PS seco/PC – peso do fígado seco/peso corporal