

---

# FARINHA DE FOLHAS DE MANDIOCA I – EFEITO DA SECAGEM DAS

## FOLHAS SOBRE A ATIVIDADE DA LINAMARASE<sup>1</sup>

ANGELITA DUARTE CORRÊA<sup>2</sup>

CUSTÓDIO DONIZETE DOS SANTOS<sup>2</sup>

MARIA AUXILIADORA EFREM NATIVIDADE<sup>3</sup>

CELESTE MARIA PATTO DE ABREU<sup>2</sup>

ANDRÉA LUIZA RAMOS PEREIRA XISTO<sup>4</sup>

VÂNIA DÉA DE CARVALHO<sup>5</sup>

**RESUMO** – Estudou-se o efeito da temperatura de secagem de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Baiana) sobre a liberação do ácido cianídrico. Dois ensaios *in vitro* foram realizados: determinação do pH ótimo e medida da estabilidade térmica da linamarase, visando à escolha das temperaturas de secagem. O pH ótimo foi 6,0 e a linamarase manteve-se estável por duas horas entre 15 e 30°C. Em temperaturas maiores que 30°C, a enzima começou a perder a atividade. Baseando-se nos resultados obtidos, foram utilizadas as seguintes formas de secar as folhas, sendo colocadas em bandejas de papel e essas: 1 - sobre bancadas de madeira, em recinto fechado e arejado, à temperatura ambiente, por 14 horas (das 17 às 7 h) e, em seguida, ao sol, sobre piso de concreto; 2 - à sombra, sobre bancadas de madeira, em recinto fechado e arejado, à temperatura ambiente; 3 - ao sol, sobre piso de concreto; 4 - em estufa a 30°C; 5 - em

estufa a 40°C. Após secagem, retirou-se o pecíolo e as folhas foram moídas. Em seguida, determinou-se o teor de cianeto e mediram-se as atividades das linamarase e tripsina em cada amostra de farinha. O menor teor em cianeto foi encontrado para a farinha de folhas secas à sombra. A linamarase e a tripsina apresentaram maiores atividades nas farinhas de folhas secas ao sol e em estufa a 40°C, apresentando uma relação direta com o teor de cianeto. Esses resultados estão em contradição com a medida da estabilidade térmica da linamarase *in vitro*, já que ela permaneceu estável até 30°C. É provável que a perda de atividade dessa enzima no interior da folha de mandioca durante o período de secagem seja mais lenta do que quando se trabalha *in vitro*, o que levou a uma desnaturação mais rápida. Concluiu-se que o processo de secagem à sombra é o melhor para a eliminação de cianeto.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Folhas de mandioca, secagem, farinha, linamarase, cianeto.

## THE FLOUR OF CASSAVA LEAVES I - EFFECT OF LEAF-DRYING ON THE ACTIVITY OF LINAMARASE

**ABSTRACT** – The effect of the temperature of drying of cassava (*Manihot esculenta* Crantz cv. Baiana) leaves, on the release of hydrogen cyanide was studied. Two *in vitro* assays were accomplished: determination of the optimum pH and measure of the thermal stability of the linamarase. The optimum pH was 6,0 and the linamarase was shown to be stable for two hours, between 15 and 30°C. In temperatures higher than 30°C, the enzyme began to lose its activity. Starting from the obtained results, the leaves were placed in paper trays and the

following leaf-drying strategies were applied: 1 – on a wood bench, in a shut and aerated place, at room temperature for 14 hours (overnight), and soon after under the sun light, on a concrete floor ; 2 – under shadow, on a wood bench, in a shut and aerated place, at room temperature; 3 - under the sun light, on a concrete floor; 4 – in oven at 30°C; 5 - in oven at 40°C. After drying, the petiole was removed and the leaves were, ground and sieved using of 40-mesh sieve. Soon after, the level of cyanide

---

1. Parte do trabalho de tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS/UFLA, Caixa Postal 37 – 37200.000 – Lavras, MG, financiado pela FAPEMIG.

2. Professores do Departamento de Química/UFLA.

3. Aluna de Doutorado em Química da Universidade de São Paulo.

4. Aluna de Mestrado, Curso de Agroquímica e Agrobiocímica - Departamento de Química/UFLA.

5. Professora do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA.

was determined and the activities of the linamarase and trypsin were measured, in each flour sample. The lowest level of cyanide was found in the flour leaves dried in the shadow. The linamarase and the trypsin presented higher activity levels in the flours of leaves dried under sun and those dried in oven at 40°C, evidencing a direct relationship with the level of cyanide. These results are in contradiction with the measure of the *in vitro* thermal

stability of linamarase, where it stayed stable only up to 30°C. It is probable, that the loss of activity of this enzyme in the interior of the cassava leaf during the drying period is slower than *in vitro*, which leads to a faster denaturation. The conclusion drawn was that the under-shadow drying process is the best choice for the elimination of cyanide.

**INDEX TERMS:** Cassava leaves, drying, flour, linamarase, cyanide.

## INTRODUÇÃO

As folhas de mandioca frescas contêm glicosídeos cianogênicos, linamarina e lotaustralina que, ao sofrerem hidrólise, liberam o ácido cianídrico, tóxico aos seres humanos. Essa liberação é acarretada pela ação da enzima linamarase em plantas cujos tecidos foram danificados mecanicamente ou quando a integridade fisiológica foi perdida, como no caso de murchamento das folhas, ou pela ação da  $\beta$ -glicosidase no trato digestivo de animais.

Animais podem detoxificar cianeto por várias vias metabólicas, sendo a principal a reação com tiosulfato para formar tiocianato. Essa conversão representa uma redução de 200 vezes em toxicidade. O tiocianato, entretanto, interfere no metabolismo de iodo, causando hipertireoidismo em animais (Langer, 1966; Sihombing *et al.*, 1971) e humanos (Ekpechi *et al.*, 1966).

Gómez & Valdivieso (1985) verificaram os efeitos da secagem ao sol sobre piso de concreto ou em estufa a 60°C sobre a eliminação de cianeto da folhagem de mandioca e concluíram que secagem ao sol reduziu mais o teor de cianeto que aquela a 60°C (82 a 94% *versus* 68 a 76%, respectivamente). Também observaram que a maior parte do cianeto presente na folhagem seca ao sol era constituída por cianeto livre (62 a 77%), ao passo que na folhagem seca a 60°C, havia apenas 24 a 36%.

Padmaja (1989) estudou o efeito de três temperaturas de secagem (45, 60 e 75°C) sobre o nível de cianeto de folhas de cinco variedades de mandioca e observou que os menores teores foram encontrados nas folhas secas a 60°C, variando de 7,7 a 15 mg/100 g de matéria seca. Também constatou que o murchamento do ramo todo sob sombra, por 16 horas, seguida pela secagem das folhas a 60°C, foi mais eficaz na redução dos níveis de cianeto. Porém, a picagem das folhas murchas, antes da secagem, acarretou a maior retenção de cianeto, comparada com a secagem da folha inteira murcha.

No Brasil, o “pó” de folhas de mandioca vem sendo utilizado como ingrediente de “multimisturas” ou adicionado à refeição (uma pitada de três dedos) no combate à desnutrição de crianças, sendo acrescentadas à merenda escolar ou incluídas em cestas básicas para famílias carentes, em várias regiões (Brandão & Brandão, 1989; Alternativas..., 1994). Todavia, até esta data não existem pesquisas em relação ao teor de cianeto nessas “multimisturas”. Além disso, o conteúdo de cianeto em folhas de mandioca de diferentes cultivares é muito variado, sendo essa variabilidade devida, principalmente, ao fator genético (Barrios & Bressani, 1967; Chew, 1972; Yeoh & Oh, 1979; Teles *et al.*, 1981; Ravindran & Ravindran, 1988). Portanto, a escolha da cultivar a ser processada também deve ser considerada como um fator importante.

Neste trabalho, estudou-se o efeito da temperatura de secagem das folhas de mandioca da cultivar Baiana, utilizada para o consumo da raiz tuberosa, sobre a liberação de cianeto.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram estabelecidas duas etapas neste experimento.

### Etapa I

Nesta etapa foram determinadas as condições ótimas de ação *in vitro* da linamarase (pH e estabilidade térmica), visando a escolher a temperatura de secagem das folhas de mandioca que resultasse em maior liberação do cianeto. As folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Baiana) maduras e frescas, originárias do Sítio Santa Maria, município de Ijaci/MG, foram colhidas pela manhã, transportadas para o laboratório do

Departamento de Química da UFLA, em caixa de isopor contendo gelo e processadas logo em seguida.

a) Umidade (AOAC, 1990) – foi utilizado o método de perdas de água por dessecação em temperatura de 100 a 105°C na amostra de folhas frescas de mandioca, em triplicata.

b) Obtenção da linamarase (Santos, 1985, com adaptações) – uma folha de mandioca fresca foi cortada com uma tesoura em pedaços de cerca de 0,25 cm<sup>2</sup> e homogeneizados. Pesou-se 1,0 g, que foi triturado em gral de porcelana contendo 0,1 g de ácido ascórbico e 0,2 g de polivinilpirrolidona-insolúvel (Sigma), em banho-de-gelo, até se obter uma massa homogênea. Em seguida suspenderam-se em 10 mL de tampão citrato-fosfato 20 mmol/L, pH 6,0 e centrifugaram-se a 2.000 x g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, dividido em porções e congelado até ser utilizado.

c) Obtenção da curva de pH (Santos, 1985, com adaptações) – alíquotas de 0,2 mL do extrato enzimático foram incubadas a 30°C, com 0,2 mL do substrato, p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (10 mmol/L), preparado em tampão citrato-fosfato 0,2 mol/L, variando o pH de 3,0 a 7,0, em intervalos de 0,5 unidades. A reação foi interrompida pela adição de 1,6 mL de NaOH 0,2 mol/L, nos tempos 10, 20, 30 e 40 min. Controles sem enzima (branco de substrato) e sem substrato (branco de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. A leitura espectrofotométrica foi feita a 400 nm, contra água. Considerou-se como pH ótimo (100% de atividade) aquela inclinação da reta do gráfico (absorbância x tempo) que apresentou maior valor.

d) Medida da estabilidade térmica da linamarase – alíquotas de 0,2 mL do extrato enzimático foram incubadas nas temperaturas de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 e 70°C, por duas horas, antes da realização do ensaio nas mesmas condições descritas no item c, mas apenas em pH 6,0. A curva-padrão foi obtida com alíquotas de 0,05 a 0,40 mL da solução aquosa de p-nitrofenol (0,0174 g/500 mL) para um volume de 0,40 mL. A leitura espectrofotométrica foi feita a 400 nm, contra água. A atividade calculada foi expressa em μmol de substrato hidrolisado por minuto (U) por 100 g de matéria seca (MS).

## Etapa II

Em função dos resultados obtidos na etapa I, as folhas de mandioca foram colhidas com o pecíolo, pela manhã (exceto aquelas a serem submetidas à secagem pela forma 1), no mês de abril (fase de acúmulo de amido), transportadas em caixas de isopor contendo gelo,

até o local da secagem, sendo colocadas em bandejas de papel e sendo secas das seguintes formas:

- 1 - sobre bancadas de madeira, em recinto fechado e arejado, à temperatura ambiente, por 14 horas (das 17 às 7 h), e, em seguida, ao sol, sobre piso de concreto;
- 2 - à sombra, sobre bancadas de madeira, em recinto fechado e arejado, à temperatura ambiente;
- 3 - ao sol, sobre piso de concreto;
- 4 - em estufa a 30°C;
- 5 - em estufa a 40°C.

Após a secagem, retiraram-se os pecíolos, e as folhas foram moídas em liqüidificador e passadas em peneira de 40 mesh, sendo o resíduo triturado em gral de porcelana. As farinhas foram embaladas em recipientes de vidro envoltos com papel-alumínio e hermeticamente fechados, até as análises.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições (Pimentel Gomes, 1990).

## Análises

a) Umidade (AOAC, 1990) – foi utilizado o método de perdas de água por dessecação em temperaturas de 100 a 105°C na amostra de folhas frescas de mandioca, e na farinha de folhas, em triplicata.

b) Cianeto - Extrato enzimático para a obtenção da linamarase – foi preparado como descrito no item b da Etapa I. Em seguida, foi dialisado com tampão citrato-fosfato 50 mmol/L, pH 6,0, para remover os glicosídeos cianogênicos. A atividade da enzima foi medida como descrita no item d da Etapa I.

- Preparo dos extratos contendo glicosídeos cianogênicos para a dosagem de cianeto (Ikediobi *et al.*, 1980, com algumas adaptações) – 1,0 g da farinha de folhas foi misturada com 25 mL de HCl 0,1 mol/L e agitados por 15 minutos em agitador magnético, à temperatura ambiente. Essa mistura foi filtrada por tela de náilon e o pH do extrato foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 0,2 mol/L. A seguir, centrifugou-se a 2.000 x g, por 15 minutos e o sobrenadante foi recolhido e congelado até ser analisado.

- Determinação de cianeto (Wood, 1966) – foram pipetados 0,15 mL do extrato contendo os glicosídeos cianogênicos, 0,05 mL do extrato enzimático e a mistura incubada a 30°C, por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 0,8 mL de uma mistura recente de ácido pícrico saturado (1,4 g/100 mL a 30°C) e carbonato de sódio 5 g/100 mL na proporção 1:1. Deixou-se em repouso por 10 minutos, adicionou-se 1,5 mL de água e aqueceram-se os tubos com as soluções durante 12 minutos em banho-

maria em ebulição. A leitura foi feita em 530 nm usando o cianeto de potássio como padrão. Além do branco reagente, fez-se branco de extrato contendo os glicosídeos cianogênicos (sem enzima) e branco do extrato enzimático (sem glicosídeos cianogênicos). Os resultados foram expressos em mg de cianeto/100 g de MS.

c) Atividade da linamarase na farinha de folhas – o extrato enzimático foi obtido agitando-se por 30 minutos, em agitador magnético, dentro da geladeira, 0,3 g da farinha de folhas de mandioca em 10 mL de tampão citrato-fosfato 20 mmol/L, pH 6,0, contendo 0,1 g de ácido ascórbico e 0,2 g de polivinilpirrolidona-insolúvel. Em seguida, o extrato foi filtrado por tela de náilon e centrifugado a 2.000 x g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e mediu-se a atividade da enzima, como descrito no item **d** da Etapa I.

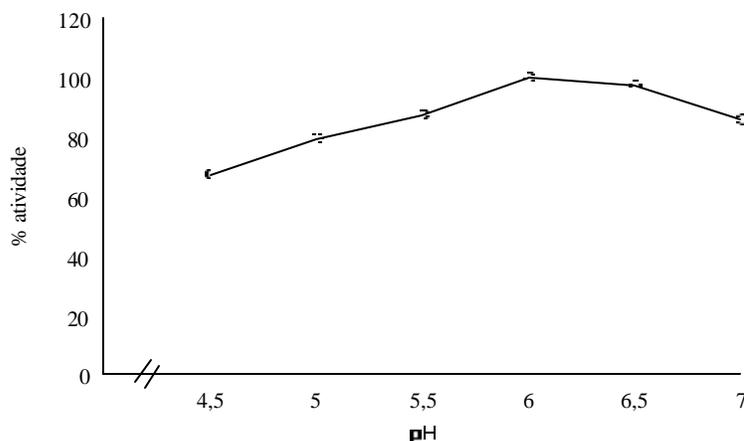
d) Atividade da tripsina na farinha de folhas (Erlanger *et al.*, 1961) – o extrato enzimático foi obtido agitando-se por 15 minutos, em agitador magnético, a 4°C, 1,0 g da farinha de folhas de mandioca em 15 mL de água destilada. O extrato foi filtrado por tela de náilon, centrifugado a 2.000 x g por 15 minutos, e congelado até ser analisado. Alíquotas de 0,2 mL do extrato enzimático foram utilizadas para determinar a atividade de tripsina a 37°C, juntamente com 1,0 mL do substrato benzoil-dL-arginina-p-nitroanilida – BApNA (0,435 g/L) e 1,0 mL de tampão tris 0,2 mol/L, pH 8,5, e a reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido acético 30 mL/100 mL. Em cada determinação, a mistura de reação foi incubada por 0, 30, 60, 120 e 240 minutos. Controles sem enzima (branco de substrato), sem substrato (branco de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 410 nm. A atividade foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do p-nitroanilina (8800) e foi expressa em nmol de substrato hidrolisado/minuto (mU) por 100 g de MS.

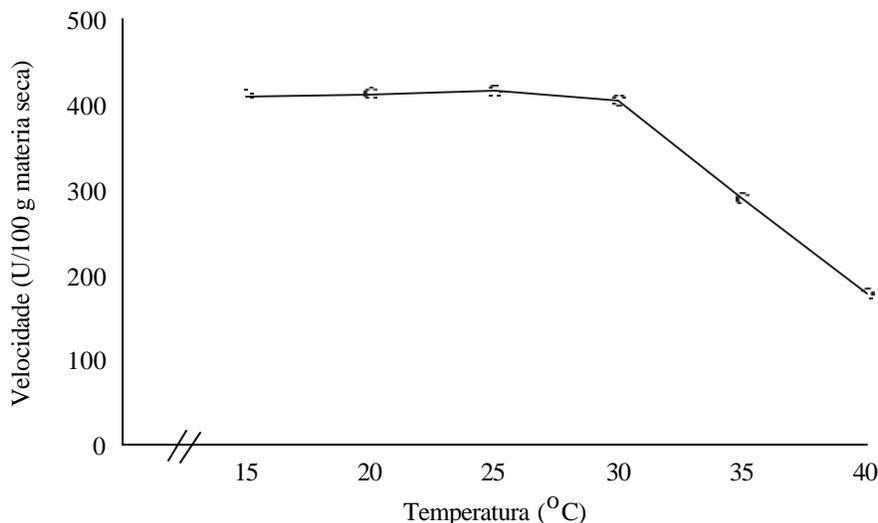
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de umidade das folhas frescas e das farinhas de folhas de mandioca foram, em média, iguais a 70,50 e 9,40 g/100 g, respectivamente.

Na Figura 1 verifica-se a atividade da enzima em função do pH. A linamarase, atuando nos pH 3,0, 3,5 e 4,0, apresentou de atividade 1, 12 e 40,5%, respectivamente. Observou-se que o pH ótimo da enzima foi 6,0. Esse valor está dentro daqueles registrados na literatura entre 6,0 e 7,3 (Cooke *et al.*, 1978; Eksittikul & Chulavatanol, 1988; Yeoh, 1989; Mkpung *et al.*, 1990).

Uma vez determinado o pH ótimo, nas condições de ensaio empregadas, pôde-se medir a estabilidade térmica da enzima. De acordo com a Figura 2, verificou-se que a atividade enzimática manteve-se estável por 2 horas, entre 15 e 30°C. Em temperaturas maiores que 30°C, a enzima começou progressivamente a perder atividade. Após 2 horas a 35 e a 40°C, a enzima perdeu 30 e 57% da sua atividade, respectivamente, e a 50, 60 e 70°C, a enzima perdeu totalmente a sua atividade. Já Yeoh (1989) encontrou uma redução de 34% na atividade da linamarase de folhas de mandioca, após 30 minutos a 55°C, e uma redução de 50%, após 1 h a 50°C. Por esses dados, verifica-se que a enzima pode perder a sua atividade, dependendo da temperatura e do tempo de exposição. Mkpung *et al.* (1990) também mediram a atividade da linamarase em folhas de mandioca frescas de 10 variedades e encontraram valores que variaram entre 320 e 3.430 U/100g MS, estando o valor médio encontrado para a cultivar Baiana (411 U/100 g MS) dentro da referida faixa.



**FIGURA 1** – Atividade da linamarase em função do pH.**FIGURA 2** – Estabilidade térmica da linamarase por 2 horas à diferentes temperaturas.

Tomando como base esses resultados, escolheram-se as formas de secagem das folhas de mandioca mencionadas em Material e Métodos.

A análise de variância dos teores de cianeto e das velocidades de reação da linamarase e da tripsina da farinha de folhas de mandioca resultou em diferenças significativas, a 1% de probabilidade, pelo teste F, quando as folhas foram submetidas às diferentes formas de secagem. Na Tabela 1 são apresentados os resultados médios dos teores de cianeto e das velocidades da linamarase e da tripsina, obtidos para as farinhas de folhas de mandioca.

A farinha das folhas secas à sombra apresentou o teor de cianeto mais baixo (19,39 mg/100g de MS), seguida pela seca em estufa a 30°C (36,22 mg/100g de MS). Observou-se que quanto mais lenta a secagem, maior foi a liberação de ácido cianídrico, visto que para a secagem das folhas, foram necessários cerca de:

- ✓ 5 dias, à sombra (2);
- ✓ 44 h (inclusive as 14 h de sol), para as folhas colocadas sobre bancadas de madeira à tarde e depois ao sol na manhã seguinte (1);
- ✓ 28 h para as secas em estufa a 30°C (4);
- ✓ 26 h (com 14 h de sol) para as secas ao sol (3);
- ✓ 24 h para as secas em estufa a 40°C (5).

Durante a secagem, com o murchamento das folhas, ocorre liberação de ácido cianídrico por causa da ação da enzima linamarase sobre o glicosídeo cianogêni-

co. Portanto, quanto mais tempo a linamarase puder atuar sobre os glicosídeos cianogênicos, maior será a liberação do ácido cianídrico, e para isso ocorrer, é necessária a presença de água, uma vez que a linamarase é uma enzima hidrolítica. Isso deve explicar o porque de a secagem à sombra ocasionar maiores perdas. Todavia, os níveis que permaneceram após as diferentes formas de secagem ainda tornam a farinha de folhas de mandioca tóxica, uma vez que teores de 5 a 10 mg HCN/100 g são considerados tóxicos, segundo Ikediobi *et al.* (1980). Considerando-se que, de modo geral, 100 g da “multimistura” contêm 3 g de “pó” de folhas (Madruga & Camara, 1997), e caso se utilize a farinha produzida neste trabalho, teria-se um teor de 1,7 mg de cianeto (secagem a 40°C) para um consumo de 100 g da “multimistura”/dia, o que não é tóxico. Também a adição de uma pitada de três dedos, equivalente a 1,5 g de “pó” de folhas por refeição (Alternativas..., 1994), não acarretaria problemas de toxicidade.

A linamarase apresentou maior atividade na farinha cujas folhas foram secas ao sol (3.520 U/100 g MS) e em estufa a 40°C (3.380 U/100 g MS). Esses resultados estão em contradição com aquele obtido no estudo da estabilidade térmica dessa enzima, em que ela permaneceu estável somente até 30°C. É provável que a perda de atividade dessa enzima no interior da folha de mandioca durante o período de secagem seja mais lenta do que

quando se trabalha *in vitro*, que levou a uma desnaturação mais rápida.

**TABELA 1** – Teores médios de cianeto e velocidades médias da linamarase e tripsina das farinhas de folhas de mandioca submetidas a diferentes formas de secagem.

Observou-se também uma relação direta entre o teor de cianeto e a atividade da linamarase. A fim de

Secagem*	Em 100 g de matéria seca		
	Cianeto mg	Linamarase U	Tripsina mU
1	50,85 ab	1.876 b	365,52 b
2	19,39 d	1.729 b	397,68 b
3	49,25 b	3.519 a	698,42 a
4	36,22 c	1.663 b	352,79 b
5	56,46 a	3.337 a	703,00 a

Teores médios de umidade (g/100 g) da folha fresca : 70,50 e das farinhas de folhas: 9,40.

\* Secagem: 1- colocadas sobre bancadas de madeira, em recinto fechado e arejado, à temperatura ambiente, por 14 horas (das 17 às 7 h) e, em seguida, ao sol, sobre piso de concreto; 2 - à sombra, sobre bancadas de madeira, em recinto fechado e arejado, à temperatura ambiente; 3 - ao sol, sobre piso de concreto; 4 - em estufa a 30°C; 5 - em estufa a 40°C.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (teste de Tukey, p ≤ 0,05).

buscar uma explicação para esse resultado, mediu-se também a atividade da tripsina (enzima proteolítica). Essa apresentou o mesmo comportamento da linamarase, ou seja, maior atividade (703 mU/100 g MS) nas farinhas das folhas secas ao sol e em estufa a 40°C. De acordo com esses resultados, houve diminuição da atividade dessas enzimas quando as temperaturas de secagem foram menores. Uma vez que a linamarase, quando em solução, perdeu a sua estabilidade térmica a partir de 30°C, talvez a permanência da enzima por mais tempo na presença de água (maior tempo de secagem) tenha levado a uma diminuição da sua atividade, o mesmo ocorrendo com a tripsina.

### CONCLUSÕES

Das temperaturas estudadas neste trabalho, a secagem das folhas de mandioca à sombra acarretou a maior liberação de ácido cianídrico. Todavia, para a cultivar Baiana, poderia-se secar as folhas nas diferentes formas empregadas neste trabalho, se for para usar a farinha no preparo de “multimisturas” ou adicionadas como pitadas nas refeições; caso contrário, deve-se ter o cuidado de selecionar outras cultivares de mandioca que tenham ní-

veis iniciais mais baixos de cianeto nas folhas, evitando-se, assim, qualquer risco de toxidez.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERNATIVAS alimentares II. Belo Horizonte: Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal de Abastecimento, 1994. 49 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists*. 15.ed. Arlington, 1990. 2 v.

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, jun./set.1967.

BRANDÃO, C.T.; BRANDÃO, R.F. *Alternativas alimentares*. Brasília: CNBB – Pastoral da Criança, 1989. 51 p.

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

- COOKE, R.D.; BLAKE, G.G.; BATTERSHILL, J.M. Purification of cassava linamarase. **Phytochemistry**, Oxford, v.17, n.3, p.381-383, Mar. 1978.
- EKPECHI, O.L.; DIMITRIADOU, A.; FRASER, R. Goitrogenic activity of cassava (a staple Nigerian food). **Nature**, London, v.210, n.11, p.1137-1138, June 1966.
- EKSITTIKUL, T.; CHULAVATNATOL, M. Characterization of cyanogenic  $\beta$ -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Archives Biochemistry and Biophysic**, San Diego, v.266, n.1, p.263-269, Oct. 1988.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives Biochemistry and Biophysic**, San Diego, v.95, n.1, p.271-278, 1961.
- GÓMEZ, G.; VALDIVIESO, M. Cassava foliage: chemical composition, cyanide content and effect of drying on cyanide elimination. **Journal of the Science Food and Agricultural**, Chichester, v.36, n.6, p.433-441, June 1985.
- IKEDIABI, C.O.; ONYIA, G.O.C.; ELUWAH, C.E. A rapid and inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and cassava products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.44, n.12, p.2803-2809, Dec. 1980.
- LANGER, P. Antithyroid action in rats of small doses of some naturally occurring compounds. **Endocrinology**, Bethesda, v.79, p.1117-1122, Dec. 1966.
- MADRUGA, M.S.; CAMARA, F.S. Multimistura: teor de proteínas e aminoácidos. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2., 1997, Campinas. **Resumos...** Campinas: FEA-UNICAMP, 1997. p. 177.
- MKPONG, O.E.; YAN, H.; CHISM, G.; SAYRE, R.T. Purification, characterization, and localization of linamarase in cassava. **Plant Physiology**, Rockville, v.93, n.1, p.176-181, May 1990.
- PADMAJA, G. Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in cassava leaves. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, London, v.37, n.3, p.712-716, May/June 1989.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 467 p.
- 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.
- SANTOS, C.D. dos. **Fisiologia e bioquímica da digestão em *Erinnyis ello* (Lepoptera:Sphingidae)**. 1985. 178 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SIHOMBING, D.T.H.; CROMWELL, G.L.; HAYS, V.W. Effect of added thiocyanate and iodine to corn-soybean meal diets on performance and thyroid status of pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.33, n.4, p.1154, Nov. 1971.
- TELES, F.F.F.; KIMO, J.W.; BATISTA, C.M.; SILVEIRA, A.J. da. Clorofila total e toxidez cianogênica de folhas de mandiocas (*M. esculenta* Crantz) cultivadas em Minas Gerais. **Revista Seiva**, Viçosa, v.41, n.89, p.72-76, 1981.
- WOOD, T. The isolation, properties, and enzymic breakdown of linamarin from cassava. **Journal of the Science Food and Agricultural**, London, v.17, n.1, p.85-90, Jan. 1966.
- YEOH, H.H. Kinetic properties of  $\beta$ -glucosidase from cassava. **Phytochemistry**, Oxford, v.28, n.3, p.721-724, Mar. 1989.
- YEOH, H.H.; OH, H.Y. Cyanide content of cassava. **Malaysian Agricultural Journal**, Kuala Lumpur, v.52, p.24-28, 1979.