



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

TRICIA NORONHA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MÉTODO RÁPIDO DE ANÁLISE
SEMIQUANTITATIVA DE CIANETO TOTAL EM DERIVADOS DE MANDIOCA**

BELÉM

2018

TRICIA NORONHA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MÉTODO RÁPIDO DE ANÁLISE
SEMIQUANTITATIVA DE CIANETO TOTAL EM DERIVADOS DE MANDIOCA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos da Universidade
Federal do Pará, para obtenção do
grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Vânia
Carvalho

Coorientadora: Pesquisadora Dra.
Laura Figueiredo Abreu

BELÉM

2018

TRICIA NORONHA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MÉTODO RÁPIDO DE ANÁLISE
SEMIQUANTITATIVA DE CIANETO TOTAL EM DERIVADOS DE MANDIOCA**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Ana Vânia Carvalho
(UFPA - Orientadora)

Pesquisadora Dra. Laura Figueiredo Abreu
(EMBRAPA - Coorientadora)

Profa. Dra. Kelly das Graças Fernandes Dantas
(PPGQ/CEN/UFPA – Membro Externo)

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

Prof^a. Dra. Alessandra dos Santos Lopes
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno Suplente)

Pesquisadora Dra. Rafaella de Andrade Mattietto
(EMBRAPA – Membro Externo Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois nenhum obstáculo é grande quando confiamos em ti.

Aos meus pais por me darem valores que levarei por toda minha vida.

Ao meu irmão Thiago Noronha Cardoso e a Elaine Marroquim pelo carinho.

Às minhas tias Kátia Silene Tavares Noronha e Sílvia do Socorro Tavares Noronha por me apoiarem nos momentos difíceis, com amor e acreditando nos meus sonhos.

À minha avó Adilan Tavares Noronha pelo carinho e amor.

À minha Orientadora Ana Vânia Carvalho pela dedicação e por aceitar esse desafio.

À minha Coorientadora Laura Figueiredo Abreu pelas orientações, ensinamentos e carinho nesse meu sonho.

À professora Kelly das Graças Fernandes Dantas pela ajuda e carinho.

Ao Professor Nelson Rosa Ferreira pelas dicas e ajuda.

À Pesquisadora Dra. Rafaella de Andrade Mattietto pela força.

Aos meus tios Sergio Antônio Tavares Noronha, Rui Guilherme Tavares Noronha e Joaquim Monteiro Noronha Neto pelo incentivo e apoio.

Ao meu tio Sergio Mendes de Abreu pelos ensinamentos que irei levar sempre na minha vida.

Aos meus Primos Paulo Sergio Noronha, Samantha Noronha, Eduarda Noronha, Rômulo Noronha, Salomão Noronha, Fernanda Nascimento e Rômulo Cezar pelos momentos felizes.

Às minhas tias Andreia e Soraya pela ajuda.

Ao meu Amigo Breno Thomaz pelo companheirismo e carinho o qual me ajudou nesses dois anos de desafios.

À minha amiga Kelly Thaise pelos momentos de felicidade que tivemos.

Ao meu amigo Carlos Joaquim Barbosa da Rocha, pelos conselhos durante quase toda minha vida escolar.

Aos estagiários Paula Campos, Jeane, Dionice, Pamela, Dayane, Elisa, Dayene, André, Elisa, Larissa, Cristina, Flaviane, Renata, Elielma, Vania, Sheiniane e Siane.

À minha amiga Clesia (ABNT) pela ajuda e carinho.

Aos funcionários da Embrapa Amazônia Oriental: Lorena, Zezé e Neusa pelo aprendizado.

À Conceição da Paixão pelo carinho e ensinamento de como se dever ser um funcionário público no Brasil.

À Analista Julieta pelo carinho e ajuda.

Ao técnico responsável do BAG-mandioca da Embrapa Amazônia Oriental, José Edson Sampaio, pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar.

À curadora responsável pelo BAG-mandioca da Embrapa Amazônia Oriental Elisa Ferreira Moura pela ajuda.

Ao laboratório de Fitopatologia da Embrapa pelo apoio.

A todos os meus colegas de mestrado pela ajuda.

Enfim, a todos que de algum modo me ajudaram nesse trabalho.

Muito obrigada.

Pouco conhecimento faz com que as criaturas se sintam orgulhosas.

Muito conhecimento, que se sintam humildes.

É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.

Leonardo da Vinci.

RESUMO

Devido à mandioca ser uma matéria-prima rica em compostos cianogênicos, e por questões de segurança, torna-se necessário o conhecimento dos teores residuais de cianeto nos produtos finais de farinha, tucupi e maniva, visto que quando ingerido, pode causar intoxicação e desenvolvimento de doenças crônicas. Este estudo teve como objetivo propor um método rápido de análise semiquantitativa de cianeto total (kit) em derivados de mandioca. Foram realizadas determinações de cianeto total em raízes e folhas de mandioca e seus respectivos produtos derivados (farinha seca, tucupi e maniva), para avaliar a faixa de trabalho a ser proposta para o kit. Os componentes do kit foram desenvolvidos com base em metodologia espectrofotométrica amplamente utilizada em pesquisas com mandioca. Foi estabelecido o tempo de armazenamento dos componentes do kit desenvolvido e sua validação a partir das figuras de mérito linearidade, repetibilidade, faixa de trabalho e limite de detecção. A concentração de cianeto total nos derivados de mandioca apresentou comportamento distinto entre as amostras, indicando a predominância de compostos cianogênicos não glicosídicos e resíduos de linamarina. Uma forma adequada de enzima desidratada e parcialmente purificada foi obtida a partir de precipitação de extrato de entrecasca de mandioca com solvente etanol. O kit desenvolvido contém frascos conta-gotas com soluções tampão e alcalina, reagente de cor e enzima em papel de filtro, armazenada em embalagem laminada multicamada, que também configura como o recipiente de reação. Este formato foi capaz de apresentar respostas visualmente diferenciadas de cor, para as faixas de concentração de cianeto total presentes em amostras de tucupi, farinha e maniva. O estudo de estabilidade indicou que o kit deve ser armazenado sob refrigeração e utilizado no período máximo de 30 dias para análise de tucupi. Porém há a necessidade de ajustes para a análise de farinha e maniva. O kit apresentou linearidade entre 1,03 e 3,97 μg de HCN por embalagem de reação com coeficiente de correlação de 0,9898; faixa de trabalho entre 5 e 100 ppm; desvio padrão relativo menor que 3 %; limite de detecção de 5 ppm e índice de recuperação entre 88 e 94%.

Palavras-chave: Cianeto total, linamarase, produtos derivados de mandioca.

ABSTRACT

Because cassava is a raw material rich in cyanogenic compounds, and of safety issues, it is necessary to know the cyanide residues in the final products of flour, tucupi and maniva, since when ingested it can cause intoxication and development of chronic diseases. This work aimed to study a rapid and semi-quantitative method of analysis of total cyanide (kit) in cassava derivatives. Total cyanide determinations were carry out on roots and leaves of cassava, and their derived products (dry flour, tucupi and maniva) to evaluate the range of work to be proposed for the kit. The components of the kit were developed based on spectrophotometric methodology widely used in cassava research. It was established the storage time of the components of the developed kit and its validity from the figures of merit linearity, repeatability, working range and limit of detection. The total cyanide concentration in the cassava derivatives showed a distinct behavior among the samples, indicating a predominance of non - glycosidic cyanogenic compounds and linamarin residues. A suitable form of dehydrated and partially purified enzyme was developed from the precipitation of cassava weevil extract with ethanol solvent. The kit contains dropper bottles with buffer and alkaline solutions, color reagent, and enzyme on filter paper, stored in multilayer laminated packaging, which also sets up as the reaction vessel. This format was able to present visually differentiated color responses for the total cyanide concentration ranges in tucupi, flour and maniva samples. The stability study indicated that the kit should be stored under refrigeration and used in the maximum period of 30 days, for tucupi analysis, but with adjustments for the analysis of flour and maniva. The kit showed linearity between 1.03 and 3.97 μg of HCN per reaction package with correlation coefficient of 0.9898; working range between 5 and 100 ppm; relative standard deviation less than 3%; limit of detection of 5 ppm and recovery index between 88 and 94%.

Keywords: Total cyanide, linamarase, cassava products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de farinha do grupo seca.....	19
Figura 2. Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de farinha do grupo d'água.....	20
Figura 3. Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de tucupi.....	21
Figura 4. Fluxograma de fabricação de maniva.....	22
Figura 5. Estrutura química da linamarina.....	22
Figura 6. Ação da enzima responsável pela liberação do cianeto.....	23
Figura 7. Superfície de contorno para o rendimento de precipitação de enzima.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparo dos tubos para a determinação de cianeto total.....	30
Tabela 2. Preparo dos tubos para a determinação de cianeto não glicosídico.	31
Tabela 3. Preparo dos tubos para a determinação de cianeto livre.	32
Tabela 4. Variáveis independentes e níveis de variação.	34
Tabela 5. Delineamento experimental completo 2 ² , e seus valores codificados e reais.	34
Tabela 6. Cianeto total (ct), não glicosídico (cng) e livre(cl) das raízes e farinha de mandioca.....	41
Tabela 7. Cianeto total (ct), não glicosídico (cng) e livre(cl) das raízes, manipueira, manipueira decantada e tucupi de mandioca.	42
Tabela 8. Cianeto total (ct), não glicosídico (cng) e livre(cl) das folhas in natura e manivas cozidas de mandioca.	43
Tabela 9. Rendimento de precipitação de enzima linamarase obtidos a partir de planejamento experimental completo 2 ²	44
Tabela 10. Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística (p) sobre o rendimento de precipitação de enzima.....	44
Tabela 11. Análise de variância (anova) para o ajuste de um modelo linear de precipitação de enzima.	45
Tabela 12. Médias, desvios padrão (dp) e desvio padrão relativo (dpr) das pesagens de amostras de farinha e maniva.	47
Tabela 13. Quantidades de soluções necessárias na reação, medidas em gotas....	48
Tabela 14. Valores dos parâmetros de cromaticidade I*, a* e b* em relação ao teor de cianeto total (ct) de amostras de tucupi, farinha e maniva em diferentes quantidades.	49
Tabela 15. Gabarito de cores equivalentes ao teor de cianeto total (ppm) em farinha, tucupi e maniva	49
Tabela 16. Repetibilidade do kit utilizando amostras de tucupi, farinha e maniva. ...	50
Tabela 17. Resultado dos testes de adição e recuperação de hcn do kit de análise.	51

Tabela 18. Valores de cianeto total das amostras de tucupi, farinha e maniva, utilizadas nos testes de estabilidade.	52
Tabela 19. Variação dos valores (vv) de cianeto total (ct) obtidas para as amostras de tucupi analisadas com reagentes do kit, quando armazenados à 10°C, em relação ao método de referência.	52
Tabela 20. Variação dos valores (vv) de cianeto total (ct), obtidas para as amostras de tucupi analisadas com reagentes do kit quando armazenados à 30°C em relação ao método de referência.	53
Tabela 21. Variação dos valores (vv) de cianeto total (ct), obtidas para as amostras de maniva analisadas com reagentes do kit, quando armazenados à 10°C, em relação ao método de referência.	54
Tabela 22. Variação dos valores (vv) de cianeto total (ct), obtidas para as amostras de maniva analisadas com reagentes do kit, quando armazenados à 30°C, em relação ao método de referência.	54
Tabela 23. Variação dos valores (vv) de cianeto total (ct), obtidas para as amostras de farinha analisadas com reagentes do kit, quando armazenados à 10°C, em relação ao método de referência.	55
Tabela 24. Variação dos valores (vv) de cianeto total (ct), obtidas para as amostras de farinha analisadas com reagentes do kit, quando armazenados à 30°C, em relação ao método de referência.	56
Tabela 25. Atividade enzimática da linamarase em papel de filtro, durante o armazenamento a 10 e 30°C, por dois meses.	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	16
2.1	GERAL	16
2.2	ESPECÍFICOS	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	IMPORTÂNCIA DA MANDIOCA PARA A AMAZÔNIA	17
3.2	PRODUTOS DERIVADOS DE MANDIOCA NO ESTADO DO PARÁ	18
3.2.1	Processamento de farinha de mandioca seca	18
3.2.2	Processamento de farinha de mandioca d'água	20
3.2.3	Processo de fabricação do tucupi	20
3.2.4	Processo de fabricação de maniva	21
3.3	GLICOSÍDEOS CIANOGENICOS E TOXICIDADE	22
3.4	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE CIANETO	24
3.5	PRECIPITAÇÃO DE ENZIMAS POR SOLVENTES ORGÂNICOS	25
3.6	Validação e figuras de mérito	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Matéria-prima e produtos derivados	28
4.2	MÉTODOS	29
4.2.1	Determinação do teor de cianeto total, não glicosídico e livre dos derivados de mandioca (ESSERS et al., 1993)	29
4.2.2	Desenvolvimento do método rápido semiquantitativo de análise de cianeto total	32
	Visando a conversão dos glicosídeos cianogênicos, houve a necessidade de obter uma forma adequada de enzima desidratada para compor o kit, cujos testes estão descritos a seguir.	33
4.2.3	Validação e figuras de mérito	37
4.2.4	Teste de estabilidade de soluções e da enzima linamarase em papel de filtro	38
4.2.5	Análise estatística	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

5.1 DETERMINAÇÃO DE CIANETO TOTAL (CT), não glicosídico (CNG) e livre (CL) EM PRODUTOS DERIVADOS DE MANDIOCA.	41
5.2 TESTES PARA OBTENÇÃO DE LINAMARASE EM PAPEL DE FILTRO	44
5.3 TESTE DE EFICIÊNCIA DA ENZIMA LINAMARASE EM PAPEL DE FILTRO	46
5.4 DEFINIÇÕES DOS PESOS DAS AMOSTRAS DOS PRODUTOS DERIVADOS DE MANDIOCA A SEREM ANALISADOS POR MEIO DO KIT	47
5.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO RÁPIDO DE ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DE CIANETO TOTAL EM DERIVADOS DE MANDIOCA .	48
5.7 VALIDAÇÃO E FIGURAS DE MÉRITO.....	50
5.8 MÉTODO adição e recuperação	51
5.8 TESTE DE ESTABILIDADE	52
5.8.1 Atividade enzimática da linamarase em papel de filtro utilizada nos testes de estabilidade	57
6. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

O estado do Pará possui uma culinária peculiar e muito apreciada em todo o Brasil e por alguns países do mundo. Destaque para os produtos alimentícios produzidos a partir da mandioca, tais como a farinha seca, farinha d'água, tucupi, caldo bastante consumido e apreciado na culinária paraense, e a maniva que é uma massa produzida a partir das folhas moídas.

No entanto, a planta da mandioca possui um alto teor de glicosídeos específicos que ao serem hidrolisados liberam cianeto, um composto tóxico que ocasiona problemas de saúde (CEREDA, 2004). O cianeto causa intoxicação aguda que pode levar à morte, aumenta a ocorrência do bócio e cretinismo, em regiões de alta carência do iodo, e konzo, que é a perda parcial das funções motoras dos membros inferiores ou superiores e ainda implica na ocorrência da neuropatia em crianças (NHASSICO et al., 2008).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) e a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) estabeleceram um limite máximo de 10 mg de HCN/kg de farinha, em base seca (JECFA et al., 1993). Por muito tempo não existia definição de limites de ingestão para os demais produtos derivados consumidos com regularidade no estado do Pará, como é o caso do tucupi e da maniva. Contudo, a Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ, através da Instrução Normativa n. 1/2016, definiu para a maniva o limite de 0,5 mg de HCN/Kg, bem abaixo da recomendação para farinha. Para o tucupi, a Instrução Normativa n.1/2008 indica que os limites para tucupi serão definidos em atos complementares (ADEPARÁ, 2008; 2016).

Atualmente, a determinação de cianeto total nos derivados de mandioca é dificultada em razão de metodologias complexas e por possuírem custo elevado ou serem inadequadas, tornando-as inacessíveis para os seus processadores.

Dentre as metodologias utilizadas, a enzimática adotada por Essers et al. (1993) é a mais utilizada por ser capaz de identificar o cianeto total, o cianeto não-glicosídico e o cianeto livre (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2011). Além desta, existem também os métodos rápidos e semiquantitativos (kits) desenvolvidos com base em

reações colorimétricas de König, que são mais indicados para análise de águas residuais com baixas concentrações de cianeto livre.

Diante disto, o desenvolvimento e avaliação de um método rápido de análise semiquantitativa, para quantificar cianeto total em unidades de processamento de derivados de mandioca, é necessário.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estabelecer um método rápido de análise semiquantitativa de cianeto total em produtos derivados de mandioca.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar a faixa de concentração dos diferentes compostos cianogênicos presentes em farinha, tucupi e maniva produzidos no Estado do Pará;
- Desenvolver todos os componentes de um método rápido para determinação semiquantitativa de cianeto total em produtos de farinha de mandioca, tucupi e maniva;
- Determinar o tempo de armazenamento dos componentes do método rápido desenvolvido;
- Validar o método rápido semiquantitativo de cianeto total.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMPORTÂNCIA DA MANDIOCA PARA A AMAZÔNIA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é muito produzida, principalmente na África, Ásia e América Latina (SEAB, 2016). Planta cultivada, predominantemente, para a subsistência dos trabalhadores rurais, é uma das principais fontes de carboidratos disponíveis aos estratos sociais de baixa renda (ALBUQUERQUE et al, 2012), tendo importante participação na geração de emprego e renda.

A produção de mandioca, apesar de estabelecida em diversas regiões do mundo, no Brasil é uma das mais promissoras, devido às condições climáticas e disponibilidade de área para cultivo. Na região norte do Brasil, mais especificamente na mesorregião nordeste do estado do Pará, o cultivo da planta é amplamente difundido pela agricultura familiar, com produção voltada ao autoconsumo, alimentação animal e venda de excedentes como forma de geração e/ou complemento de renda. Contudo, as famílias produtoras utilizam pouca ou nenhuma tecnologia no seu processo de produção, o que impacta negativamente na qualidade e segurança alimentar dos produtos obtidos e em seu rendimento de produção (SILVA; SILVA; SILVA, 2014).

A Amazônia é a região do mundo onde a mandioca apresenta o maior número de formas de aproveitamento ou utilização, aspecto este que tem levado alguns estudiosos a admitir a região como local de origem da domesticação desta planta. É, de fato, bem extensa a relação das formas pelas quais a mandioca é utilizada na região, devido a grande contribuição dada pelo elemento indígena dentro do setor culinário (CAMARÃO et al., 1993).

Apesar da grande diversidade, o sistema produtivo da cadeia da mandioca apresenta três tipologias básicas: a unidade doméstica, a unidade familiar e a unidade empresarial. Essa classificação leva em consideração as interconexões entre a origem da mão-de-obra, o nível tecnológico, a participação no mercado e o grau de intensidade do uso de capital na exploração (ESPM/SEBRAE, 2008).

A unidade doméstica é caracterizada por usar mão-de-obra familiar, não utilizar tecnologias modernas e pouco participar do mercado. A unidade familiar, ao contrário

da doméstica, já adota algumas tecnologias, tem uma participação significativa no mercado e dispõe de capital de exploração em nível mais elevado. Já na unidade empresarial, a contratação de mão-de-obra de terceiros é a característica marcante, correspondendo, juntamente com as unidades do tipo familiar, pela maior parte da produção de raízes no Brasil (PEDUZZI, 2009).

3.2 PRODUTOS DERIVADOS DE MANDIOCA NO ESTADO DO PARÁ

O beneficiamento da mandioca é uma atividade que começou a ser praticada no Brasil pelos seus primeiros habitantes, os índios. Especificamente no estado do Pará, maior produtor nacional de mandioca, existe uma variedade de pequenas agroindústrias de beneficiamento da mandioca que desempenham importante papel no desenvolvimento do estado (SEAB, 2016).

As atividades agroindustriais garantem emprego e renda aos produtores, familiares e demais agentes envolvidos, o que por sua vez movimentava a economia das localidades onde estão inseridas. Tais agroindústrias desenvolveram técnicas que possibilitam transformar certos tipos de mandioca, considerados impróprios para o consumo humano, em alimentos, os quais são consumidos na forma de farinha e outros derivados (FAO, 2016). Porém, um grande empecilho para um maior desenvolvimento dessas agroindústrias é que a maioria destes estabelecimentos se caracteriza por ter uma estrutura familiar tradicional, com instalações impróprias aos atuais padrões de higiene e qualidade, além de equipamentos rudimentares e inexistência de uma gestão capacitada.

Os principais produtos derivados da mandioca são a farinha, o tucupi e a maniva. Seus processos de obtenção estão descritos a seguir.

3.2.1 Processamento de farinha de mandioca seca

A farinha de mesa é o derivado da mandioca mais amplamente difundido no país, sendo consumida de diferentes maneiras, em todas as regiões brasileiras.

A tecnologia de fabricação da farinha (Figura 1) é simples, mas exige alguns cuidados no seu desenvolvimento. A seleção da matéria-prima adequada, a higiene e os cuidados durante todo o processo de fabricação, são fatores fundamentais para garantir um produto de qualidade. O rendimento médio é de 25 a 30 %, dependendo

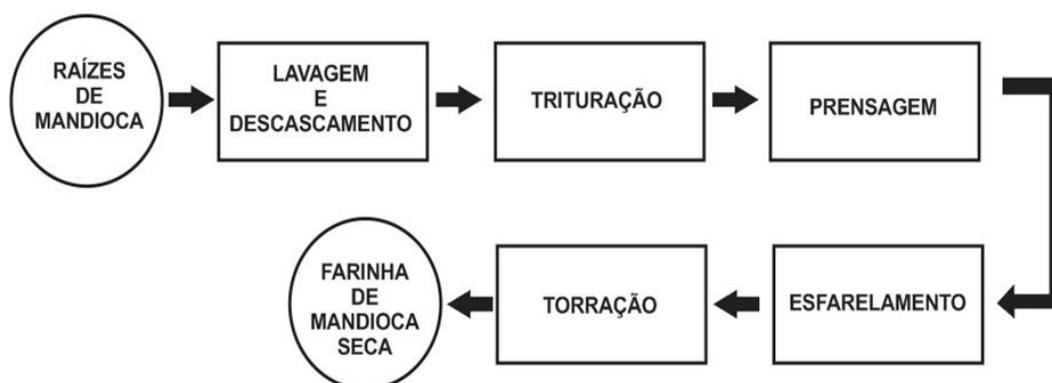
da variedade de mandioca e da eficiência dos equipamentos utilizados (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2005).

As raízes, antes do processamento, devem ser lavadas em água corrente, para eliminar as impurezas, e o descascamento é feito manualmente utilizando-se facas de aço inoxidável, seguido da lavagem para retirada da casca ou impurezas ainda remanescentes. A etapa seguinte é a trituração, a qual geralmente é realizada em “caititus”, que são cilindros de madeira contendo serras de aço que funcionam como trituradores (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2005).

A etapa de prensagem tem como objetivo obter a massa com menor teor de umidade e com isso evitar o começo da fermentação, o escurecimento da farinha e diminuir a umidade da massa ralada. A prensagem pode ser realizada em prensas manuais ou em prensas hidráulicas (SOUZA; BRAGANÇA, 2000).

Ao sair da prensa, a massa ralada está compactada, havendo necessidade de ser desaglomerada manualmente ou utilizando um tipo de ralador, permitindo assim a peneiragem. Em sequência, a massa é colocada, em bateladas, no forno para a eliminação do excesso de água e realizar a torração a qual tem como função desenvolver o sabor torrado na farinha, além de gelatinizar parcialmente o amido (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2005).

Figura 1. Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de farinha do grupo seca.

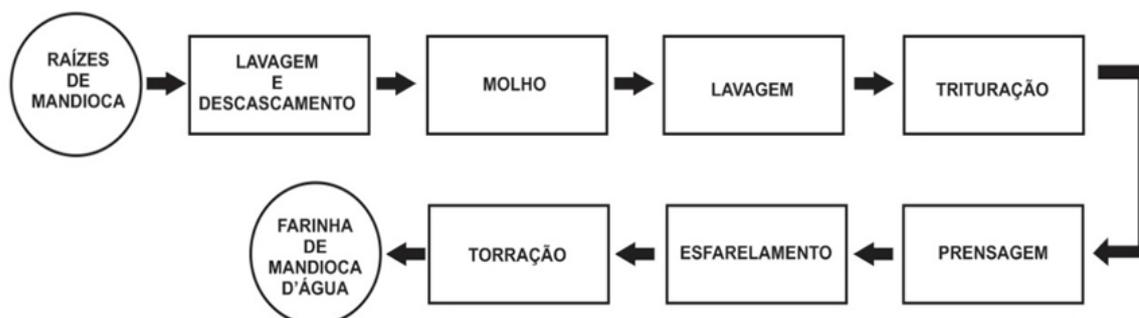


Fonte: Adaptado de Chisté et al.(2005).

3.2.2 Processamento de farinha de mandioca d'água

A farinha d'água é produzida (Figura 2) a partir da raiz que fica imersa em tanques com água ou em igarapés por cerca de quatro dias, antes de passar por todos os processos similares aos da farinha seca (COHEN; OLIVEIRA; CHISTÉ, 2007).

Figura 2. Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de farinha do grupo d'água.



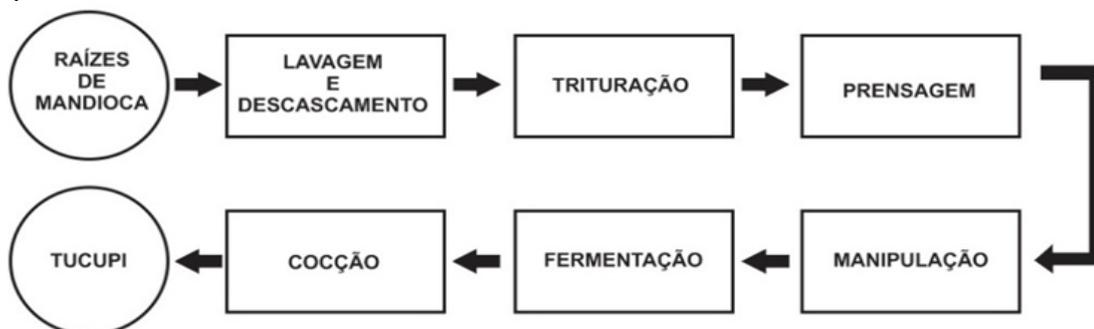
Fonte: Adaptado de Chisté et al.(2007).

3.2.3 Processo de fabricação do tucupi

A produção de tucupi (Figura 3) inicia-se com a recepção das raízes de mandioca, que posteriormente são lavadas, descascadas, trituradas e prensadas, para a remoção da fração líquida denominada de manipueira. A manipueira é deixada em repouso por um ou dois dias à temperatura ambiente, para que ocorra a fermentação. Durante o repouso, há a decantação do amido, que posteriormente é removido (COHEN; OLIVEIRA; CHISTÉ, 2007). Após a etapa de fermentação, é realizada a cocção do líquido com condimentos para obtenção do tucupi. Segundo Campos (2016), o tempo de fermentação e cocção varia muito de fabricante para fabricante.

O tempo de cocção, juntamente com o tempo de fermentação, são as etapas do processo que mais influenciam na redução dos compostos cianogênicos, devido à ação da enzima linamarase sobre a linamarina (CAMPOS, 2016).

Figura 3. Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de tucupi.



Fonte: Adaptado de Cohen et al. (2007).

3.2.4 Processo de fabricação de maniva

Enquanto em todo o país as folhas da mandioca são consideradas co-produtos, em cidades do Pará, principalmente, elas são utilizadas como alimento (CARVALHO, 2005).

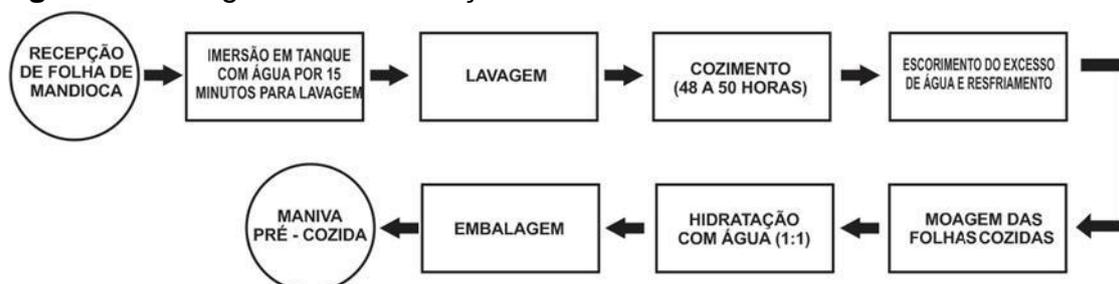
A massa feita das folhas moídas é chamada de maniva, utilizando-se comumente as folhas mais novas, de diferentes variedades (SACOLA BRASILEIRA, 2014).

O processamento tem início com a imersão das folhas em tanque com água, passando por uma segunda lavagem em água corrente e, então, seguem para o cozimento em tacho aberto.

Após o cozimento, a água é drenada e as folhas cozidas resfriadas em temperatura ambiente. A moagem das folhas é realizada em equipamento elétrico (similar ao utilizado para moer carnes), com auxílio de adição de água (Figura 4) (MODESTO JUNIOR; ALVES; ABREU, 2018). Esta forma de processamento vem sendo adotada por processadores com grande volume de matéria prima.

Muitas unidades de processamento de maniva ainda utilizam o processo tradicional, onde as folhas são primeiramente trituradas para depois serem cozidas,. Entretanto, não se tem estudo definitivo do efeito desta inversão de etapas em termos de residual de cianeto, valor nutricional ou características sensoriais.

Figura 4. Fluxograma de fabricação de maniva.

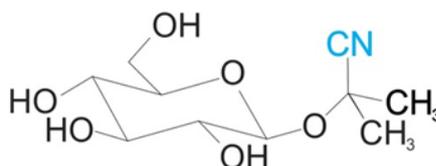


Fonte: Adaptado de Modesto et al. (2018).

3.3 GLICOSÍDEOS CIANOGENICOS E TOXICIDADE

A mandioca possui um nível tóxico de glicosídeos cianogênicos formados por 95 % de linamarina do teor total de cianogênio (Figura 5) e 5 % de lotaustralina. Todos os tecidos da mandioca possuem linamarina, que é sintetizada a partir do aminoácido valina (MIDIO; MARTINS, 2000).

Figura 5. Estrutura química da linamarina.



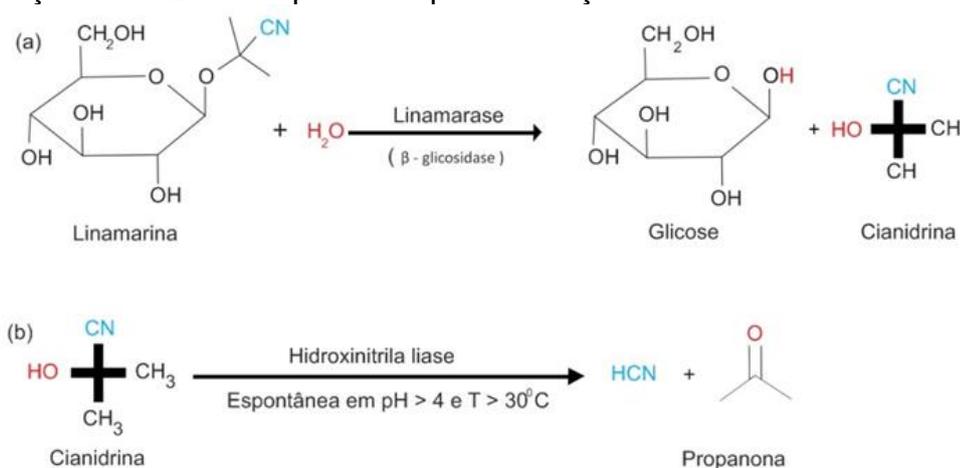
Fonte: Adaptado de Oliveira (2010).

Com a ruptura da estrutura celular da raiz, as enzimas presentes (linamarase) degradam os compostos cianogênicos (linamarina e lotaustralina), liberando o cianeto na forma de ácido cianídrico (Figura 6), que é o princípio tóxico da mandioca. A ingestão ou mesmo a inalação representa sério perigo à saúde, podendo ocorrer casos extremos de envenenamento ou intoxicações crônicas (CAGNON; CEREDA; PANTAROTTO, 2002).

Durante a ingestão, com auxílio da enzima endógena rodanase, os mamíferos têm a capacidade de converter o íon cianeto a tiocianato, que é facilmente eliminado na urina. Quanto esta capacidade de detoxificação do organismo é superada, ocorre a intoxicação aguda (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000).

Uma das mais conhecidas intoxicações crônicas por cianeto envolve o sistema nervoso e é chamada de neuropatia atáxica tropical (TAN), que é representada por uma perda gradual dos movimentos do corpo, perda de visão e descoloração de discos ópticos da retina em ambos os olhos, surdez bilateral e polineuropatia (MIDIO; MARTINS, 2000).

Figura 6. Ação da enzima responsável pela liberação do cianeto.



Fonte: Adaptado de Oliveira (2010).

Em levantamentos feitos pelo Comitê Misto de Peritos FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA, 1993), considera-se como dose letal ingerida por um ser humano valores entre 0,5 e 3,5 mg de HCN/kg de peso corpóreo, ou ainda uma única ingestão de 60 mg de HCN. Pela dificuldade de estabelecer um valor definitivo de ingestão para produtos de mandioca, apenas a farinha de mesa tem um valor limite de HCN total (ou potencial) estabelecido em norma, segundo a OMS e a FAO, de 10 mg de HCN/kg de farinha, em base seca (JECFA, 1993).

Por muito tempo não existia definição de limites de ingestão para os demais produtos derivados consumidos com regularidade no estado do Pará, como é o caso do tucupi e da maniva. Contudo, a Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ, através IN n. 1/2016, definiu para a maniva o limite de 0,5mg de HCN/Kg, bem abaixo da recomendação para farinha. Já na IN n.1/2008 há indicação de que os limites para tucupi serão definidos em atos complementares (ADEPARÁ, 2008; 2016).

3.4 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE CIANETO

Existem métodos disponíveis na literatura para quantificação de cianeto em diferentes tipos de matrizes, como em águas residuais e em alimentos. Contudo, quando são aplicados na matriz mandioca, outros procedimentos são necessários (ESSERS et al., 1993).

As etapas seguintes são comuns em todas as metodologias disponíveis para a análise em mandioca: amostragem, homogeneização, extração, transformação dos compostos cianogênicos em HCN ou CN^- , isolamento, quantificação e cálculo a partir de padrões.

Dentre as metodologias, destacam-se dois métodos quantitativos, o método oficial da AOAC e o método enzimático de Essers et al. (1993). O método oficial de quantificação de cianeto é o método de destilação a vapor com subsequente titulação do HCN (cianeto livre), descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). Este método compreende a autólise da mandioca triturada, por imersão em água, e incubação por 20 horas à 37°C, seguido de destilação a vapor para isolar o HCN e subsequente titulação com solução de nitrato de prata (AOAC, 1990).

Atualmente, o método enzimático descrito e adaptado por Essers et al. (1993) é o mais utilizado. Compreende as etapas de homogeneização, filtração, neutralização, hidrólise enzimática e leitura espectrofotométrica, após reação colorimétrica, via reagente de cor à base de isonicotinato e ácido 1,3-dimetilbarbitúrico. Este método elimina a dependência da atividade natural da enzima endógena da mandioca, a linamarase. Essa enzima, ao ser adicionada na reação, aumenta a rapidez e a eficácia da conversão de compostos cianogênicos em cianeto. Além disso, tem a capacidade de determinar o cianeto total (glicosídeos cianogênicos, α -hidroxinitrila e cianeto livre), o cianeto não glicosídico (α -hidroxinitrila e cianeto livre) e o cianeto livre (HCN) (ESSERS et al., 1993).

Existem kits de determinação de cianeto desenvolvidos baseados nos métodos colorimétricos, considerados métodos rápidos e semiquantitativos. São fornecidos e comercializados pelas empresas Hanna e Merck. Estes kits têm como fundamentação a reação dos íons cianeto com agentes corantes para formar o cloreto cianogênico, o qual reage com o ácido barbitúrico na presença de piridina para formação de uma cor

violeta (reação de König). A concentração de cianeto é medida semiquantitativamente por comparação visual com uma escala de cores que equivalem a faixas de concentração de cianeto pré-determinadas. São mais indicados para análise de águas residuais com baixas concentrações de cianeto livre (MERCK MILLIPORE, 2016).

Os kits disponíveis no mercado tem sua utilização limitada para derivados de mandioca, pois determina apenas o cianeto livre em amostras. Uma conformação ideal de metodologia, que seria útil para as unidades de processamento de mandioca, seria a união do conceito prático dos kits rápidos com a possibilidade de determinação do cianeto total presente nos produtos derivados da mandioca.

Contudo, a produção de enzimas para utilização em análises requer métodos de separação e purificação complexos e onerosos. A precipitação de enzimas, com uso de solventes, pode ser uma alternativa para a obtenção de um material com pureza intermediária que possa atender ao nível de sensibilidade de um método semiquantitativo.

3.5 PRECIPITAÇÃO DE ENZIMAS POR SOLVENTES ORGÂNICOS

As proteínas podem sofrer precipitação por solvente orgânico, devido à diminuição da atividade de água na solução, ocasionada pela substituição da água pelo solvente orgânico. Quando se adiciona solvente orgânico, há uma diminuição na constante dielétrica da solução, fortalecendo-se as forças de atração entre as cargas opostas das moléculas de proteína (ROBERT; LAVENANT; RENARD, 2002).

A desvantagem do uso deste método é a possível desnaturação das proteínas. Ainda assim, isso pode ser minimizado através da redução da temperatura para valores geralmente em torno de 0° C, já que, em baixas temperaturas, a flexibilidade das biomoléculas é menor, diminuindo assim a capacidade de penetração do solvente e de qualquer desnaturação irreversível das enzimas (MARIÑO-BOHÓRQUEZ, 2014).

Segundo Robert et al. (2002), as principais mudanças observadas na estrutura secundária das proteínas foi a formação de β -folhas intermoleculares e a perda de α -hélice e β -folhas intramoleculares, devido às interações hidrofóbicas, com 50 % (v/v) de etanol, à temperatura ambiente. A exposição do núcleo hidrofóbico das proteínas, em solução alcoólica, aumenta com o aumento do comprimento da cadeia alifática de

álcoois e, deste modo, a tendência ao desdobramento das proteínas é maior (HERSKOVIIIS; JAILLET; GADEGBKU, 1970).

Segundo o estudo de Sashi; Yasin; Bhuyan (2012), o valor do pH da solução tem alta influência no processo de agregação das biomoléculas, pois um aumento na carga líquida da proteína tende a diminuir a velocidade do processo pela repulsão entre moléculas carregadas e, especificamente em meio alcalino, as moléculas de solvente, além de interagirem com os grupos hidrofóbicos da proteína, vão interagir por ligações de hidrogênio com grupos peptídeos –NH, formando a estrutura de β -folhas intermoleculares.

3.6 VALIDAÇÃO E FIGURAS DE MÉRITO

No desenvolvimento de um método analítico, a etapa de validação tem o objetivo de estimar a sua eficiência de execução em laboratório (LA ROCA et al., 2007).

Segundo a resolução da diretoria colegiada do INMETRO (2016), a validação analítica é a avaliação sistemática de um método, por meio de ensaios experimentais, de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos. Entretanto, a validação de um método deve apresentar resultados confiáveis e adequados à sua finalidade de forma documentada.

Na validação, existem critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento, conhecidos como parâmetros ou figuras de mérito. Dentre esses, estão a linearidade, a faixa de trabalho, a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e o limite de detecção (ANVISA, 2017).

A linearidade é demonstrada a partir das respostas analíticas obtidas da relação diretamente proporcional da concentração do analito, em uma amostra. Essa análise é realizada com no mínimo cinco pontos de concentrações diferentes para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata (ANVISA, 2017).

Os resultados da linearidade podem ser mostrados no analito, a partir de gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística e equação da

reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados, entre outros métodos (ANVISA, 2017).

Na precisão, avalia-se a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Os parâmetros que expressam a precisão são a repetibilidade e também a reprodutibilidade (ANVISA, 2017).

Os resultados da precisão são mostrados pela dispersão dos resultados, calculando-se os desvios padrão relativos (DPR) (ANVISA, 2017). O limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E PRODUTOS DERIVADOS

Para determinar a faixa de cianeto total, não glicosídico e livre dos derivados de mandioca, foram adquiridas raízes e folhas de mandioca e seus respectivos produtos derivados (farinha seca, tucupi e maniva), em unidades de processamento localizadas em quatro municípios do nordeste paraense (Castanhal, Inhangapi, Santa Izabel e Santa Maria).

Para as análises referentes à farinha, foram coletadas em cada unidade de processamento, seis raízes descascadas, do início do processo de fabricação, e cinco sacos de um quilograma de farinha de mesa branca seca.

Para a análise de maniva, foram coletados cinco quilogramas de folhas in natura, no início do processamento e cinco sacos, de um quilograma cada, com maniva cozida antes (MC1) e após a trituração (MC2).

Para as análises referentes ao tucupi, foram coletadas seis raízes descascadas do início do processamento, dois litros de manipueira recém extraída, dois litros de manipueira decantada e dois litros de tucupi. As manipueiras e o tucupi foram acondicionados em garrafas PET de 1 litro, com tampa e rosca.

Para a produção de extrato enzimático de linamarase, e para os testes de obtenção de enzima desidratada, foram adquiridas amostras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do cultivar BRS Poti do Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental. As raízes foram coletadas com períodos de 11 a 13 meses de plantio.

Para as análises de cor e estabilidade, foram adquiridas, periodicamente, amostras de tucupi, farinha seca e maniva, em supermercados da cidade de Belém, com períodos de 1 a 4 semanas de produção.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Determinação do teor de cianeto total, não glicosídico e livre dos derivados de mandioca (ESSERS et al., 1993).

Obtenção da enzima linamarase e determinação de atividade enzimática

A enzima utilizada para a análise foi obtida de acordo com metodologia descrita por Cooke (1979), a partir de 200 g de entrecasca de mandioca da variedade BRS Poti, obtida no Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Oriental.

A partir da Equação 01, calculou-se o correspondente valor de μmol de HCN liberado por minuto.

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = (X \cdot F) / (0,1 \cdot 30) \quad \text{Eq. (01)}$$

Em que:

U: unidade de atividade enzimática, ou seja, 1 μmol de HCN liberado por minuto;

X (μmol de HCN L^{-1}): quantidade μmol de HCN liberado nos 30 minutos de incubação, obtido a partir da curva analítica ($X = (A_{605} - b)/a$);

F: fator de diluição (10^2 ; 10^3 ou 10^4);

30: tempo em minutos de reação, pois a definição de unidade de atividade enzimática é μmol de produto liberado por minuto à 30°C .

Preparo de extratos da raiz de mandioca e seus respectivos derivados (farinha, tucupi e maniva)

Para a obtenção dos extratos, as amostras de raízes, folhas, farinha, maniva, manipueira e tucupi passaram pelo processo de quarteamento para homogeneização e obtenção da massa necessária. Utilizou-se cerca de 70 g de raiz, 40 g de farinha, 20 g de maniva, 20 mL de manipueira e 20 mL de tucupi. Adicionou-se, a cada amostra, 250 mL de solução extratora (solução etanólica de ácido fosfórico 0,1 M) para trituração. Para as amostras de maniva, foi adicionada solução de NaCl à solução extratora. Os extratos foram centrifugados (Centrífuga Excelsa Baby II / modelo 206 – R) a $5.100 \times g$, por 10 minutos, e os sobrenadantes acondicionados em frascos de PEAD, com tampa e rosca, e mantidos sob congelamento até o momento da análise (ESSERS et al., 1993).

Curva analítica e cálculo dos resultados

A curva analítica foi construída a partir de uma solução padrão de 2µg/mL de KCN. Foram estabelecidos seis pontos equivalentes a uma faixa de 0,19 a 1,15 µg de HCN, por tubo de reação.

Dosagem de cianeto total, não glicosídico e livre

As concentrações de cianeto total (linamarina + acetona-cianidrina + HCN), não glicosídico (acetona-cianidrina + HCN) e livre (HCN) foram determinadas tanto na matéria-prima quanto no produto final.

As análises foram realizadas em triplicata, seguindo a metodologia espectrofotométrica de Essers et al. (1993). O cianeto total é determinado pelo princípio da hidrólise dos compostos cianogênicos presentes no meio de extração, pela enzima linamarase, em cianidrina. A cianidrina é transformada a cianeto em solução alcalina. A quantidade total de cianeto é determinada pelo método colorimétrico, no qual o cianeto é oxidado a haleto de cianogênio pela cloramina T. Esta substância reage com o ácido isonicotínico para produzir um produto intermediário o qual se hidrolisa para produzir o dialdeído conjugado. Este dialdeído reage com a amina primária ou com compostos que possuem grupamento metileno ativo, como o ácido 1,3-dimetilbarbitúrico, formando um substância colorida.

A determinação do cianeto total se inicia com a adição de 0,1 mL do extrato obtido, em tubo de ensaio contendo 0,4 mL de tampão fosfato pH 7,0 e seguido da adição de 0,1 mL da enzima linamarase obtida pela metodologia de Cooke (1979). Os tubos foram mantidos à 30° C, por 15 minutos, em banho de água. Após esta etapa, foram adicionadas as demais soluções, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Preparo dos tubos para a determinação de cianeto total.

Solução	Branco	Amostra
---------	--------	---------

Solução NaOH 0,2 M (mL)	0,6	0,6
Aguardar cinco minutos		
Solução tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 (mL)	2,8	2,8
Solução cloramina T (mL)	0,1	0,1
Aguardar cinco minutos		
Isonicotinato/1,3-dimetilbarbitúrico (mL)	0,6	0,6
Aguardar 10 minutos		
Ler absorbância em 605 nm		

A partir da Equação 02, calculou-se o correspondente valor de HCN em $\mu\text{g/g}$ (mg/Kg ou ppm) nas amostras.

$$\text{Cianeto} = (\mu\text{gHCN/g}) = X.V.F/ m.v \quad \text{Eq. (02)}$$

Em que:

X: μg de HCN presente na reação, obtido a partir da curva analítica ($X = (A_{605} - b) / a$);

V: volume total do extrato em mL (volume de meio de extração + volume de água na amostra);

F: fator de diluição da amostra, quando necessário;

m: massa da amostra (g);

v: volume de extrato utilizado na análise (mL).

Os resultados foram expressos em mg HCN/kg de amostra. Para obter o teor de umidade das amostras, foi determinada a umidade em estufa à 105°C (AOAC, 2002).

Para a determinação de cianeto não glicosídico, 0,1 mL do extrato obtido foi adicionado em tubo de ensaio contendo 0,4 mL de tampão fosfato pH 6,0. Após esta etapa, foram adicionadas as demais soluções, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Preparo dos tubos para a determinação de cianeto não glicosídico.

Solução	Branco	Amostra
Solução NaOH 0,2 M (mL)	0,6	0,6

Aguardar cinco minutos		
Solução tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 (mL)	2,9	2,9
Solução cloramina T (mL)	0,1	0,1
Aguardar cinco minutos		
Isonicotinato/1,3 dimetilbarbitúrico (mL)	0,6	0,6
Aguardar 10 minutos		
Ler absorbância em 605 nm		

A partir da Equação 02, calculou-se o correspondente valor de HCN em $\mu\text{g/g}$ (mg/Kg ou ppm) nas amostras.

A determinação do cianeto livre inicia-se com a adição de 0,6 mL do extrato obtido, em tubo de ensaio contendo 3,4 mL de tampão fosfato pH 6,0. Após esta etapa foram adicionadas as demais soluções, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Preparo dos tubos para a determinação de cianeto livre.

Solução	Branco	Amostra
Solução cloramina T (mL)	0,1	0,1
Aguardar cinco minutos		
Isonicotinato/1,3 dimetilbarbitúrico (mL)	0,6	0,6
Aguardar 10 minutos		
Ler absorbância em 605 nm		

A partir da Equação 02 calculou-se o correspondente valor de HCN em $\mu\text{g/g}$ (mg/Kg ou ppm) nas amostras.

4.2.2 Desenvolvimento do método rápido semiquantitativo de análise de cianeto total

O método rápido semi-quantitativo (kit) teve como base a metodologia de Essers et al. (1993). Foi desenvolvido um protótipo visando a determinação de cianeto total, em derivados de mandioca, a partir da percepção visual de formação de coloração azul, durante a reação. Os reagentes foram adicionados respeitando a ordem descrita por Essers et al. (1993). As adaptações do método foram feitas a partir de testes utilizando amostras dos produtos derivados de mandioca (farinha, tucupi e maniva), visando estabelecer as quantidades adequadas de amostras e reagentes, para uso prático em unidades de processamento. Os testes foram seguidos por

leituras espectrofotométricas, a 605 nm de comprimento de onda, para verificação e ajustes das faixas de absorvância.

Visando a conversão dos glicosídeos cianogênicos, houve a necessidade de obter uma forma adequada de enzima desidratada para compor o kit, cujos testes estão descritos a seguir.

Também foram realizados testes para estabelecer a massa ideal de produtos de mandioca a ser utilizada no kit, para atingir inicialmente uma faixa de trabalho em torno de 10 mg HCN/kg, conforme recomendação da FAO/WHO, como limite seguro para consumo da farinha de mandioca.

Ensaio para obtenção de enzima linamarase em papel de filtro

Para definir o processo de obtenção da enzima linamarase em papel de filtro, foi realizado um experimento de delineamento experimental em duplicata, com três repetições no ponto central, visando a determinação da melhor concentração e proporção de etanol, para um maior rendimento de precipitação da enzima, conforme descrito a seguir.

Obtenção de enzima linamarase em papel de filtro

O extrato bruto enzimático foi obtido a partir de 200 g de entrecasca de mandioca do cultivar BRS Poti, utilizando um processador. Em seguida, realizou-se a filtração à vácuo e o filtrado foi dividido em béqueres em sete alíquotas iguais de 40 mL. Em cada béquer foram adicionadas três diferentes concentrações de etanol, em três proporções diferentes, conforme delineamento experimental descrito no item a seguir. Os béqueres com as misturas extrato:etanol foram colocados sob refrigeração, por quinze minutos, para precipitação da enzima. Em seguida, os precipitados foram filtrados a vácuo, em papel filtro qualitativo (Quanty, 60 g/cm²). Para a determinação do rendimento, os papéis de filtro contendo a enzima precipitada foram secos durante uma hora em estufa com circulação e remoção de ar (Tecnal, modelo TE – 394/1) a 40° C, resfriados em dessecador e pesados em balança analítica (Shimadzu modelo AUW220D).

Para eliminar qualquer resíduo, os papéis de filtro foram previamente tratados, passando-se água destilada e etanol 90 % e em seguida secos, da mesma forma como descrito anteriormente.

Delineamento experimental composto central de 2²

A concentração de etanol (X1) e a proporção de etanol (X2) foram estabelecidas como variáveis independentes, estudadas em dois níveis e um ponto central, em tiplicata (Tabela 4), totalizando sete ensaios (Tabela 5). Como resposta, considerou-se o rendimento de precipitação da enzima linamarase expresso em porcentagem (m/v).

Tabela 4. Variáveis independentes e níveis de variação.

Variáveis Independentes	Níveis de variação		
	-1	0	+1
X ₁ – Concentração de Etanol (%)	65	80	95
X ₂ – Proporção de Etanol (%)	30	50	70

Tabela 5. Delineamento experimental completo 2², e seus valores codificados e reais.

Experimento	Concentração de Etanol (%)	Proporção de Etanol (%)
T1	65 (-1)	30 (-1)
T2	95 (+1)	30 (-1)
T3	65 (-1)	70 (+1)
T4	95 (+1)	70 (+1)
T5	80 (0)	50 (0)
T6	80 (0)	50 (0)
T7	80 (0)	50 (0)

Avaliação da atividade linamarase no ponto ótimo

Devido à inviabilidade econômica de se determinar a atividade de todas as enzimas produzidas a partir do delineamento experimental, foi escolhida a enzima com o melhor rendimento de precipitação a partir do delineamento experimental e realizados testes utilizando-se amostras de tucupi, farinha e maniva comerciais. A eficiência do processo de obtenção e da atividade da enzima linamarase desidratada, em papel de filtro, foi determinada verificando-se o comportamento da cor de reação,

ao final de cada análise, conforme Essers et al. (1993), com testes com e sem (branco) adição das amostras.

Adaptação das amostras dos produtos derivados de mandioca a serem analisados por meio do kit

A realização dos testes para definição da média do peso das amostras de farinha e maniva, utilizando uma colher que mede, aproximadamente, 0,1 g de amostra, foi executada a fim de verificar o desvio da média dos pesos medidos na colher do protótipo. Para as amostras de tucupi utilizou-se conta gotas, para medição de uma gota.

Foram utilizados oito voluntários, sendo que quatro voluntários fizeram dez medições para cada amostra de farinha (V1, V2, V3 e V4) e quatro fizeram dez medições para cada amostra de maniva (V5, V6, V7 e V8), em um total de 40 repetições para cada produto. Os pesos de cada medição foram determinados utilizando uma balança analítica (Shimadzu, modelo AUW220D).

A partir da Equação 03, determinaram-se as dispersões dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições. Os resultados foram expressos em porcentagem.

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \cdot 100 \qquad \text{Eq. (03)}$$

Em que:

DP: desvio padrão

CMD: concentração média determinada

Análise de amostras e definição de parâmetros de cor utilizando o kit

Com o propósito de definir os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , equivalentes às faixas de concentração de cianeto total, em análises utilizando o kit, foram realizadas adaptações para adequação das amostras de farinha, tucupi e maniva.

As amostras de farinhas foram trituradas, utilizando uma colher de metal de cozinha, e medidas na colher do protótipo, com as quantidades de 1/2, 1 e 2 colheres.

As amostras de maniva foram medidas na colher do protótipo com as quantidades de 1 e 2 colheres.

Foi utilizada alíquota equivalente a uma gota ($\approx 0,05$ mL) das amostras de tucupi, em cinco diferentes diluições (0; 1:1; 1:3; 1:9 e 1:19) com água destilada.

Em seguida, as amostras de farinha, tucupi e maniva, separadamente, foram analisadas utilizando-se o kit.

Após o complexo colorido azul ser formado, ao final da reação, foi determinada a sua absorbância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis), com auxílio do acessório de fibra ótica (modelo *dip probe coupler*), a 605 nm. Os resultados foram calculados de acordo com a Equação 4, e expressos em ppm.

Comparativamente, foram feitas análises de cor, para obtenção dos parâmetros de L^* , a^* e b^* , de acordo com o sistema CIELAB, em colorímetro Chroma Meter CR - 400/410 (Konica Minolta). A reação para formação do complexo colorido foi realizada em béqueres de 10 mL, revestidos lateralmente com papel kraft, para conter a dispersão da luz. O colorímetro foi posicionado de tal forma que a leitura fosse realizada no sentido de baixo para cima, no béquer.

A curva analítica foi construída a partir de uma solução padrão de 3 $\mu\text{g/mL}$ de KCN. Foram estabelecidos cinco pontos equivalentes a uma faixa de 5 a 100 ppm de HCN, por embalagem do kit.

A partir da Equação 04, calculou-se o correspondente valor de HCN em $\mu\text{g/g}$ (mg/Kg ou ppm), nas amostras.

$$\text{Cianeto Total } (\mu\text{gHCN/g}) = X / m \quad \text{Eq. (04)}$$

Em que:

X: μg de HCN presente na reação é obtido a partir da curva analítica ($X = (A_{605} - b)/a$);

m: massa da amostra (g) ou (mL).

A enzima utilizada para a análise foi obtida de acordo com o tópico *Obtenção de enzima linamarase em papel de filtro*, descrito anteriormente, a partir de 200 g de entrecasca de mandioca da variedade BRS Poti.

A partir da Equação 01 calculou-se o correspondente valor de μmol de HCN liberado por minuto.

4.2.3 Validação e figuras de mérito

As figuras de mérito avaliadas para a validação foram: linearidade, faixa de trabalho, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e limite de detecção. Estes parâmetros foram avaliados de acordo com orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2016).

Linearidade

A linearidade foi avaliada por teste da concentração de HCN em ppm. A análise da concentração de HCN em ppm foi realizada em triplicata, utilizando um espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis), com auxílio do acessório de fibra ótica, modelo *dip probe coupler*, a 605 nm. Os valores em ppm foram calculados de acordo com a Equação 4, descrita anteriormente.

A linearidade foi demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas (absorbância) diretamente proporcionais a cinco concentrações (5,10, 25, 50 e 100 ppm) diferentes de KCN (INMETRO, 2016).

Precisão

A precisão do kit foi medida por meio da repetibilidade, sendo realizadas medições de cianeto total em amostras comerciais de produtos derivadas de mandioca, adquiridas na cidade de Belém.

As condições de medição foram realizadas pelo mesmo operador, o mesmo sistema de medição e as mesmas condições de operação (INMETRO, 2016).

A partir da Equação 03, determinaram-se as dispersões dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Faixa de trabalho

A faixa de trabalho foi estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e considerando o limite de 10ppm como referência de um produto seguro (INMETRO, 2016).

Limite de detecção

Como o kit é um método visual, o limite de detecção foi determinado pela menor concentração para a qual é possível constatar o efeito visual esperado (INMETRO, 2016).

Método de adição e recuperação

O método de adição e recuperação, utilizando-se o kit de análise, foi realizado adicionando-se quantidades conhecidas de uma solução padrão de KCN, juntamente às amostras de tucupi, farinha e maniva comercial. As adições de padrões foram adicionadas nas concentrações de HCN de 0,50 µg/mL, 1,00 µg/mL e 1,50 µg/mL.

As amostras foram analisadas em triplicata e, o resultado das médias de diferentes concentrações da adição e recuperação, foi calculado através da Equação 05.

$$\text{Recuperação (\%)}: (C_1 - C_2 / C_3). 100 \quad \text{Eq. (05)}$$

Em que:

C₁: concentração do analito na amostra fortificada;

C₂: concentração do analito na amostra não fortificada;

C₃: concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

4.2.4 Teste de estabilidade de soluções e da enzima linamarase em papel de filtro

Esta etapa teve o objetivo de avaliar o tempo de validade dos reagentes preparados e embalados, que foram utilizados para a realização das análises com o kit desenvolvido.

Cada reagente foi armazenado em condições de temperatura que simulam o ambiente de seu armazenamento. Como a região amazônica apresenta temperaturas normalmente elevadas, foi considerada a temperatura de armazenamento de 30° C, comparativamente a uma temperatura de refrigeração de 10° C, mantidas com auxílio de câmaras de incubação tipo BOD (Solab Mod. SL-224/364)(MOURA; GERMER, 2004).

Em intervalos de 30 dias, foram realizadas análises, simultaneamente, de cianeto total, utilizando o kit de análise e a metodologia de referência de Essers et al. (1993), em amostras comerciais de produtos derivados de mandioca, adquiridas na cidade de Belém (PA). As análises foram realizadas em sextuplicatas dos reagentes armazenados, em comparação com reagentes recém preparados (controle), totalizando três meses de testes.

Admitiu-se o fim da estabilidade quando foi observada uma variação dos valores obtidos de cianeto total (CT), maior do que 5 %, em relação aos resultados obtidos quando utilizado o reagente controle (BRASIL, 2011).

Para os cálculos de variação de valores (VV) de cianeto total em relação ao método de referência utilizou-se a Equação 06.

$$VV (\%) = [(CTMR - CTkit).100]/CTMR \quad \text{Eq.(06)}$$

Em que:

CTMR: Valores de cianeto total obtidos pelo método de referência;

CTKit: Valores de cianeto total obtidos pelo kit

Atividade enzimática da enzima linamarase em papel de filtro utilizada nos testes de estabilidade.

Além das análises comparativas com enzima recém-preparada, foram realizadas determinações da atividade enzimática da linamarase em papel de filtro, durante dois meses de armazenamento.

A partir da Equação 07, calculou-se o correspondente valor de μmol de HCN liberado por minuto.

$$\text{Atividade enzimática (U/cm}^2\text{)} = (X \cdot F) / (1 \cdot 30) \quad \text{Eq. (07)}$$

Em que:

U: unidade de atividade enzimática, ou seja, 1 μmol de HCN liberado por minuto;

X (μmol de HCN L^{-1}): quantidade μmol de HCN liberado nos 30 minutos de incubação, obtido a partir da curva analítica ($X = (A_{605} - b)/a$);

F: fator de diluição (10^2 ; 10^3 ou 10^4);

30: tempo em minutos de reação, pois a definição de unidade de atividade enzimática é μmol de produto liberado por minuto à 30°C .

4.2.5 Análise estatística

Para os testes de obtenção de enzima linamarase em papel de filtro foi realizada análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$).

Nos resultados de determinação de cianeto total, em produtos derivados de mandioca, foi realizada a comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando-se o programa *Statistica 7.0*.

As análises de validação e as figuras de mérito foram realizadas em sextuplicata e consideradas de acordo com orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DE CIANETO TOTAL (CT), NÃO GLICOSÍDICO (CNG) E LIVRE (CL) EM PRODUTOS DERIVADOS DE MANDIOCA.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da concentração de cianeto total, não glicosídico e livre das raízes e farinha de mandioca.

Tabela 6. Cianeto total (CT), não glicosídico (CNG) e livre (CL) das raízes e farinha de mandioca.

Amostra	CT (ppm)	CNG (ppm)	CL (ppm)	Umidade (%)
Raiz RF1	124,98±22,00 ^a	24,26±0,80 ^a	1,52±0,21 ^b	54,12±0,08 ^b
Farinha F1	9,15±0,65 ^c	10,72±0,87 ^b	1,46±0,11 ^b	6,23±0,09 ^c
Raiz RF2	84,27±1,36 ^b	24,71±3,97 ^a	3,95±0,76 ^a	58,12±0,10 ^a
Farinha F2	4,30±0,38 ^d	3,17±0,12 ^c	0,69±0,11 ^c	4,21±0,14 ^d

F1 e F2 (Farinha 1 e 2); RF1 e RF2 (Raiz descascada/F1 e F2);.

Resultados média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey a p >0,05).

Os resultados indicam que, a partir de raízes consideradas perigosamente venenosas, com teores maiores que 80 mg de HCN/kg, houve redução efetiva dos teores de cianeto total durante o processamento das farinhas analisadas, que apresentaram valores abaixo do limite estabelecido pela FAO, de 10 mg de HCN/kg. Na etapa de trituração, a enzima linamarase entra em contato com o substrato, enquanto na etapa de prensagem os glicosídeos responsáveis por formar o HCN (linamarina e a lotaustralina) são removidos, por serem solúveis em água. Por outro lado na etapa de torração, o HCN por ser volátil é eliminado, devido ao aumento da temperatura (Cereda, 2003).

Chisté *et al.* (2010), ao estudarem a determinação de cianeto total durante as etapas de processamento da farinha de mandioca, obtiveram uma dosagem de cianeto total de 50 mg HCN/kg em raízes trituradas e 36 mg HCN/kg na massa prensada, evidenciando uma redução significativa durante a etapa de prensagem, até o produto final, que apresentou valor de cianeto de 9,0 mg de HCN/kg.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados da concentração de cianeto total, não glicosídico e livre das raízes, manipueira, manipueira decantada e tucupi de mandioca.

Tabela 7. Cianeto total (CT), não glicosídico (CNG) e livre (CL) das raízes, manipueira, manipueira decantada e tucupi de mandioca.

Amostra	CT (ppm)	CNG (ppm)	CL (ppm)	Umidade (%)
Raiz RT1	249,33±6,73 ^a	62,69±4,18 ^b	1,02±0,20 ^f	72,05±0,08 ^e
Manipueira M1	43,97±1,33 ^d	45,36±0,97 ^c	45,46±3,49 ^a	95,62±0,07 ^c
Manipueira MD1	34,86±1,64 ^e	34,92±1,58 ^d	34,28±0,77 ^c	97,78±0,06 ^b
Tucupi T1	11,17±2,37 ^g	11,44±0,12 ^e	3,98±0,09 ^{ef}	97,85±0,02 ^b
Raiz RT2	157,50±36,96 ^b	34,32±1,22 ^d	0,95±0,15 ^f	70,00±0,21 ^f
Manipueira M2	86,30±2,44 ^c	74,90±6,55 ^a	13,45±1,15 ^d	91,33±0,25 ^d
Manipueira MD2	34,99±2,60 ^e	39,65±2,03 ^{cd}	38,41±1,20 ^b	98,61±0,17 ^a
Tucupi T2	14,95±1,07 ^f	11,06±1,74 ^e	6,89±0,49 ^e	98,69±0,02 ^a

T1 e T2 (Tucupi 1 e 2); RT1 e RT2 (Raiz descascada /T1 e T2); M1 e M2 (Manipueira recém extraída/T1 e T2); MD1 e MD2 (Manipueira decantada/T1 e T2); Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey a $p > 0,05$).

As raízes de mandioca para a produção de tucupi também apresentaram teores de cianeto total alto, o que caracterizou as mandiocas como impróprias para o consumo direto, sem o devido tratamento de destoxificação. Contudo, a partir da obtenção das manipueiras, observou-se uma diminuição significativa do teor de cianeto total, evidenciando uma maior taxa de redução durante as etapas de trituração e prensagem. Por isso, a realização da análise de cianeto durante a etapa de fermentação da manipueira (decantação da fécula) mostra-se de suma importância, visto que, neste ponto pode-se estabelecer um maior controle da qualidade do produto final. Como o tucupi apresentou valor próximo de 10 mg de HCN/kg, partindo-se de uma manipueira com 34 mg de HCN/kg, estima-se que o ponto ideal de início do processo de fervura seria quando a manipueira decantada apresentasse valores abaixo de 30 mg de HCN/kg.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da concentração de cianeto total, não glicosídico das folhas in natura e manivas cozidas de mandioca.

Tabela 8. Cianeto total (CT), não glicosídico (CNG) e livre (CL) das folhas in natura e manivas cozidas de mandioca.

Amostra	CT (ppm)	CNG (ppm)	CL (ppm)	Umidade (%)
Folha de mandioca	97,46±5,37 ^a	95,01±6,63 ^a	3,70±0,12 ^a	76,18±0,03 ^c
Maniva MC1	12,96±0,84 ^b	2,20±0,33 ^b	2,51±0,03 ^b	80,18±0,37 ^b
Maniva MC2	1,77±0,13 ^c	2,23±0,12 ^b	1,39±0,03 ^c	81,61±0,03 ^a

MC1 (Maniva cozida antes da trituração); MC2 (Maniva cozida após a trituração). Resultados expressos como média ± desvio padrão.. Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey a p >0,05).

Assim como nos demais produtos, os processos de detoxificação da maniva causaram redução significativa dos compostos cianogênicos. O cozimento após a trituração, considerado o procedimento tradicional, apresentou teores de cianeto total abaixo de 10 mg HCN/kg, que é o limite recomendado como seguro, tendo como referência a farinha de mesa, segundo a FAO (JECFA, 1993; CAC, 1996). Contudo, o processo de cozimento antes da trituração demonstrou ser cerca de dez vezes menos eficiente na redução dos teores de cianeto total nas folhas de mandioca, quando comparado ao processo de cozimento após a moagem das folhas. Este fato pode ser devido à inativação prévia de parte da enzima linamarase, durante o cozimento, indicando a necessidade de estudos mais detalhados.

Os resultados apresentados, tanto para farinha, quanto para tucupi e maniva indicaram que o cianeto total, dos produtos derivados de mandioca, são representados majoritariamente por cianetos não glicosídicos, mais especificamente, cianidrina. Sugere-se ainda que, para garantir produtos finais com baixos residuais de cianeto, seria importante análises de controle nas etapas de pós prensagem da massa para farinha, na etapa de decantação da fécula de maniva e após a etapa de moagem da maniva. Valores de cianeto total em torno de 30 mg de HCN/Kg, seriam recomendados como determinantes para iniciar os processos de aquecimento, durante a obtenção de farinha, tucupi e maniva.

5.2 TESTES PARA OBTENÇÃO DE LINAMARASE EM PAPEL DE FILTRO

Os resultados do planejamento experimental completo do tipo 2² estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Rendimento de precipitação de enzima linamarase obtidos a partir de planejamento experimental completo 2².

Concentração Etanol (%)	Proporção Etanol (%)	Volume extrato (mL)	Rendimento (% m/v)
60	30	40	1,53 ± 0,07
95	30	40	2,07 ± 0,20
60	70	40	1,15 ± 0,10
95	70	40	1,26 ± 0,08
80	50	40	1,07 ± 0,16
80	50	40	1,32 ± 0,02
80	50	40	1,38 ± 0,04

*Resultados expressos como média ± desvio padrão

A partir dos resultados obtidos, foram realizados os tratamentos estatísticos para a avaliação dos efeitos principais e de interações (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito estimado, erro puro e grau de significância estatística (p) sobre o rendimento de precipitação de enzima.

	Efeito	Erro Puro	P
Média	1,397143	0,062144	0,001973
Concentração de etanol	0,325000	0,164418	0,186716
Proporção de etanol	-0,595000	0,164418	0,068596
Concentração* proporção	-0,215000	0,164418	0,321100

Observa-se que todos os efeitos principais e de interação não exerceram influência significativa sobre a precipitação da enzima, ao nível de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$).

A concentração de etanol apresentou efeito positivo, ou seja, o aumento desta variável acarreta um aumento não rendimento de precipitação, enquanto que a proporção mostra um efeito negativo, ou seja, quando se diminui a proporção de etanol aumenta-se o rendimento de precipitação da enzima.

Na Tabela 11 estão apresentados os valores de F da análise de variância (ANOVA) para ajuste do modelo linear e a variação explicada pelo modelo (R^2).

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) para o ajuste de um modelo linear de precipitação de enzima.

	SQ	GL	MQ	F.calculado	F.tabelado*	R^2
Regressão	0,505875	2	0,252938	6,41	6,94	0,7624
Resíduo	0,157668	4	0,039417			
Falta de ajuste	0,103601	2	0,051801	1,91	19,00	
Erro puro	0,054067	2	0,027033			
Total	0,663543	6				

GL: grau de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática

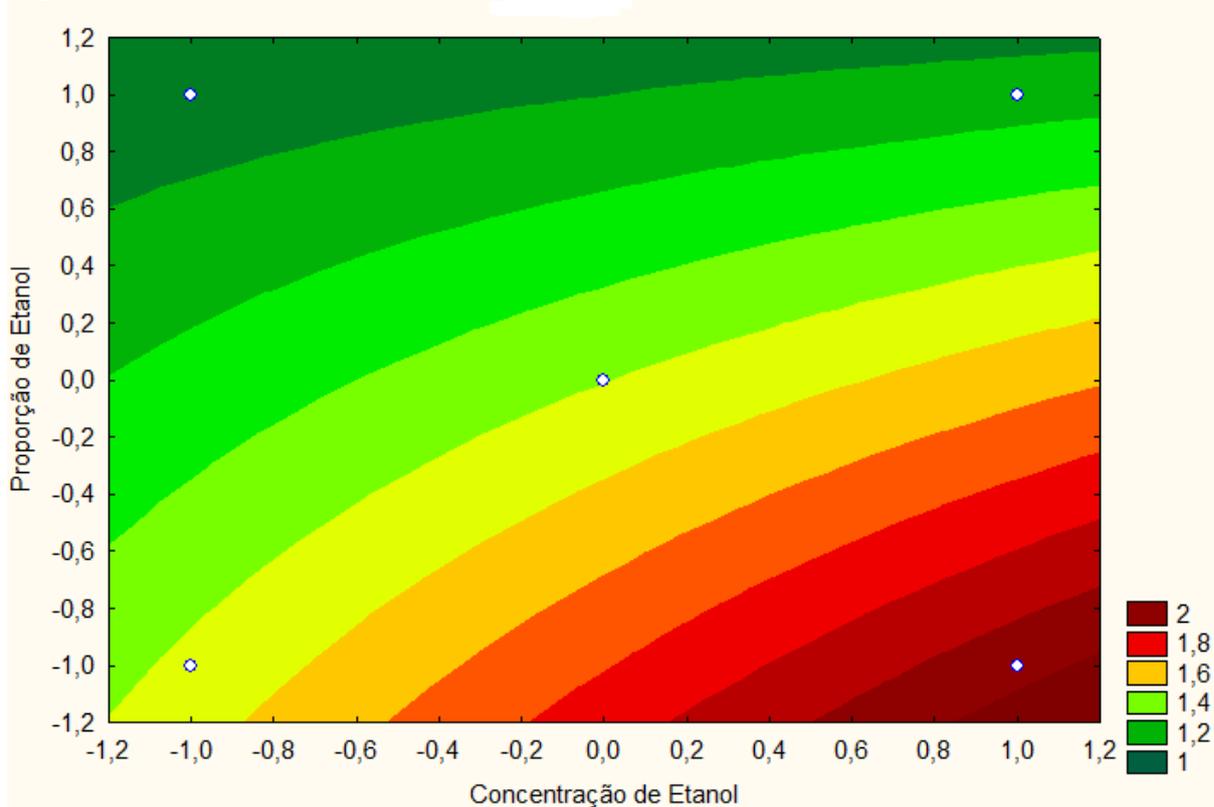
*Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

Verifica-se na Tabela 11 que o modelo explicou 76% da variação, mas não apresentou regressão significativa, confirmada pelo menor valor de $F_{\text{calculado}}$ em relação ao F_{tabelado} . Entretanto, a falta de ajuste não foi significativa, devido ao valor de $F_{\text{calculado}}$ ser 10 vezes menor que F_{tabelado} .

Segundo Box (1978), um modelo é considerado preditivo quando as relações de $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$, da regressão e da falta de ajuste, são maiores que quatro e menores que 0,1, respectivamente. Dessa forma, o modelo gerado pode ser considerado representativo do processo, mas não preditivo.

Na Figura 7, pode se observar graficamente o comportamento do processo de precipitação da enzima linamarase, de acordo com o modelo gerado.

Figura 7. Superfície de contorno para o rendimento de precipitação de enzima.



O comportamento da superfície de contorno, da Figura 7, demonstra que os maiores valores de rendimento de precipitação são obtidos com o aumento das concentrações da solução etanólica, juntamente com a diminuição da proporção de etanol, em relação ao extrato enzimático bruto. Destacando-se que o maior rendimento de precipitação obtido, de cerca de 2%, encontra-se na faixa equivalente a 95% de concentração de etanol e 30% de proporção em relação ao extrato enzimático.

5.3 TESTE DE EFICIÊNCIA DA ENZIMA LINAMARASE EM PAPEL DE FILTRO

Os resultados dos testes de eficiência foram determinados visualmente (Quadro1), a partir da coloração final da solução.

Quadro 1. Resultados dos testes de eficiência da enzima desidratada em suporte de papel.

Teste	Cor aparente
Todas as soluções + Tucupi + Enzima em papel de filtro	Azul
Todas as soluções + Enzima em papel de filtro	Incolor
Todas as soluções + Farinha + Enzima em papel de filtro	Azul
Todas as soluções + Enzima em papel de filtro	Incolor
Todas as soluções + Maniva + Enzima em papel de filtro	Azul - Verde
Todas as soluções + Enzima em papel de filtro	Incolor

A reação com todas as soluções mais a enzima em papel de filtro, apresentou-se incolor, evidenciando a ausência de resíduos de compostos cianogênicos na enzima obtida, que possam desenvolver a coloração azul característica da reação.

5.4 DEFINIÇÕES DOS PESOS DAS AMOSTRAS DOS PRODUTOS DERIVADOS DE MANDIOCA A SEREM ANALISADOS POR MEIO DO KIT

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados dos testes de pesagem de amostras de farinha e maniva, por diferentes voluntários, usando a colher estabelecida para compor o kit.

Tabela 12. Médias, desvios padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) das pesagens de amostras de farinha e maniva.

Voluntário/ Amostra	Peso (g)*	DPR (%)
V1 – Farinha	0,11 ± 0,02	18,18
V2 – Farinha	0,11 ± 0,02	18,18
V3 – Farinha	0,11 ± 0,01	9,09
V4 – Farinha	0,11 ± 0,01	9,09
V5 – Maniva	0,13 ± 0,04	30,76
V6 – Maniva	0,12 ± 0,03	25,00
V7 – Maniva	0,13 ± 0,02	36,36
V8 – Maniva	0,13 ± 0,03	23,07

* Resultados expressos como peso da amostra ± desvio padrão.

Segundo Gomes (1985) o desvio padrão relativo (DPR) permite comparações entre variáveis de naturezas distintas e quanto menor o DPR, mais homogêneos são os dados.

As amostras de farinha obtiveram valores de DPR médios enquanto as amostras de maniva apresentaram DPR muito altos de acordo com a classificação de Gomes (1985). Entretanto, todos os pesos das amostras apresentaram valores aproximados de 0,1 g.

5.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO RÁPIDO DE ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DE CIANETO TOTAL EM DERIVADOS DE MANDIOCA

Após os testes de adequação realizados, o primeiro protótipo do kit de análise foi estabelecido com os itens descritos a seguir:

- Enzima linamarase em papel de filtro, acondicionada em embalagem laminada multicamada PET/PEBD transparente, de 15 mL;
- Frasco conta gotas contendo 20 mL de solução de hidróxido de sódio 0,2 M;
- Frasco conta gotas contendo 10 mL de solução de cloramina T;
- Frasco conta gotas contendo 20 mL de reagente de cor isonicotinato/1,3-dimetilbarbitúrico;
- Frasco conta gotas contendo 20 mL de tampão fosfato 1 M e pH 6,0.

Na Tabela 13 estão descritas as quantidades sugeridas para adição de cada um dos reagentes usados na análise.

Tabela 13. Quantidades de soluções necessárias na reação, medidas em gotas.

Solução	Concentração/pH	Número de gotas
Tampão fosfato	1 M / 6,0	1
Hidróxido de Sódio	0,2 M	12
Tampão fosfato	1 M / 6,0	6
Cloramina T	1%	2
Reagente de cor isonicotinato/1,3-dimetilbarbitúrico	-	12

A utilização de uma concentração baixa de solução tampão fosfato pH (6,0), acarretava uma quantidade maior de gotas para a sua eficiência. Então, para tornar o kit mais prático, se fez necessário um ajuste de concentração para que houvesse a necessidade de um menor número de gotas durante a análise.

Desta forma, o kit desenvolvido tem capacidade para realização de 30 análises.

5.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS E DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS DE COR UTILIZANDO O KIT

Na Tabela 14 estão apresentados os valores dos parâmetros de cromaticidade (L^* , a^* e b^*), em relação aos valores equivalentes de cianeto total nas diferentes quantidades de amostras de farinha, tucupi e maniva.

Tabela 14. Valores dos parâmetros de cromaticidade L^* , a^* e b^* em relação ao teor de cianeto total (CT) de amostras de tucupi, farinha e maniva em diferentes quantidades.

Amostra/Quantidade	(L^*)	a^*	b^*	CT (ppm)
Farinha/ ½ colher	95,12 ± 0,53	-10,21 ± 0,41	0,23 ± 0,42	5
Farinha/ 1 colher	75,10 ± 0,20	-40,54 ± 0,22	0,43 ± 0,34	10
Farinha/ 2 colheres	55,20 ± 0,23	-30,34 ± 0,31	0,89 ± 0,10	20
Tucupi/ 0	25,12 ± 0,12	-25,21 ± 0,19	-35,66 ± 0,31	100
Tucupi/ 1:1	45,12 ± 1,01	-5,21 ± 0,80	-35,78 ± 0,66	50
Tucupi /1:3	65,25 ± 0,98	-20,32 ± 0,23	-20,21 ± 0,45	25
Tucupi /1:9	75,21 ± 0,34	-20,35 ± 0,21	-20,67 ± 0,14	10
Tucupi /1:19	75,22 ± 0,83	8,52 ± 0,21	-0,30 ± 0,32	5
Maniva / 1 colher	75,27 ± 1,03	-20,58 ± 1,30	20,59 ± 1,06	10
Maniva/ 2 colheres	76,37 ± 1,23	-30,51 ± 1,30	10,28 ± 1,06	20

A partir dos resultados de parâmetros de cromaticidade, estabeleceu-se um gabarito de cores de acordo com as concentrações de cianeto total equivalentes, em ppm, por tipo de derivado de mandioca, conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15. Gabarito de cores equivalentes ao teor de cianeto total (ppm) em farinha, tucupi e maniva

Amostra	Cianeto total				
Tucupi	5 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm

Farinha	5 ppm	10 ppm	20 ppm
Maniva	10 ppm	20 ppm	

Observou-se que a diferenciação entre as cores é visualmente significativa, nas diferentes faixas de concentração de cianeto total, podendo estender-se além do limite de 10 ppm, primeiramente estabelecido. Contudo, testes de desempenho dentro das unidades de processamento ainda são necessários para ratificar o gabarito, bem como o desenvolvimento de um layout mais didático. Com a escala de cores estabelecida, o monitoramento dos pontos que precedem as etapas de aquecimento, de ambos os derivados de mandioca será possível.

5.7 VALIDAÇÃO E FIGURAS DE MÉRITO

Os resultados para as figuras de mérito, tais como linearidade, precisão (repetibilidade), faixa de trabalho e limite de detecção, obtidas neste estudo estão apresentado abaixo.

A linearidade do kit para o cianeto variou entre 1,03 e 3,97 μg de HCN por embalagem de reação, apresentando coeficiente de correlação 0,9898.

Na Tabela 16 estão apresentados os resultados de repetibilidade e os respectivos desvios padrão relativos (DPR) do kit, quando utilizado em análise de amostras de farinha, maniva e tucupi.

Tabela 16. Repetibilidade do kit utilizando amostras de tucupi, farinha e maniva.

Amostra	CT (ppm) *	DPR (%)
Tucupi	100,16 \pm 1,02	1,02
Farinha	5,16 \pm 0,08	1,55
Maniva	10,07 \pm 0,25	2,48

* Resultados expressos como média de CT \pm desvio padrão.

O coeficiente de variação (DPR) de 5,3 % foi utilizado como um critério para avaliar a repetibilidade do método. Pode-se observar na Tabela 19 (onde foram apresentados os valores de DPR) que foram obtidas excelentes repetibilidades dos resultados (INMETRO, 2016).

A faixa de trabalho foi estabelecida segundo a linearidade, precisão e valor limite de HCN total estabelecido em norma, que segundo a OMS e a FAO é de 10mg de HCN/kg de farinha de mesa, em base seca (JECFA et al., 1993). Desta forma, selecionou-se a faixa entre 5 e 100 ppm.

Segundo a ANVISA (2017), o limite de detecção pode ser determinado pela menor concentração para a qual é possível constatar o efeito visual esperado. Como o kit é um método visual, a menor concentração para a qual é possível constatar o efeito visual esperado foi de 5 ppm.

5.8 MÉTODO ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados dos testes de adição e recuperação para a o kit.

Tabela 17. Resultado dos testes de adição e recuperação de HCN do kit de análise.

Amostra	Teor adicionado (µg/mL)	Recuperação (%)
Tucupi	0,50	93,76
	1,00	94,89
	1,50	93,96
Farinha	0,50	92,89
	1,00	93,19
	1,50	94,25
Maniva	0,50	88,89
	1,00	89,78
	1,50	88,68

Resultados expressos como média das recuperações com diferentes concentrações de HCN ± desvio padrão.

Os resultados encontrados do estudo de adição e recuperação para a metodologia do kit, no presente trabalho, estão de acordo com a orientação sobre validação de métodos analíticos do Inmetro (2016), a qual a faixa do valor de recuperação média para um analito de 1ppm e de 80-110%.

A amostra de maniva, quando utilizado o kit para a determinação de cianeto total, apresentou um valor inferior ao das outras amostras. A coloração intensa das

amostras de maniva pode ser responsável pelas variações e interferências nas leituras, tanto de absorvância quanto de cor. A introdução de um dispositivo capaz de suprimir a coloração da amostra de maniva, antes da reação de cor, pode ser necessária, a fim de melhorar o desempenho do método para este tipo de produto.

5.8 TESTE DE ESTABILIDADE

Na Tabela 18 estão apresentados os valores de cianeto total (CT) obtidos a partir da metodologia Essers et al. (1993) em amostras comerciais de produtos derivadas de mandioca, para cada mês de estudo.

Tabela 18. Valores de cianeto total das amostras de tucupi, farinha e maniva, utilizadas nos testes de estabilidade.

Amostra	1º mês	2º mês	3º mês
	CT (ppm)*	CT (ppm)*	CT (ppm)*
Tucupi	97,42 ± 0,92	95,98 ± 1,05	100,01 ± 1,08
Maniva	1,19 ± 0,19	1,53 ± 0,02	1,20 ± 0,09
Farinha	9,73 ± 1,12	9,19 ± 0,98	9,22 ± 1,01

* Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Nas Tabelas 19 e 20 estão apresentados os valores de CT da amostra de tucupi utilizando cada um dos reagentes do kit armazenados a 10°C e 30°C e os respectivos percentuais de variação (VV) em relação aos resultados obtidos pelo método de referência de Essers et al. (1993).

Tabela 19. Variação dos valores (VV) de cianeto total (CT) obtidas para as amostras de tucupi analisadas com reagentes do kit, quando armazenados à 10°C, em relação ao método de referência.

Tempo	1º mês		2º mês		3º mês	
	CT (ppm)	VV (%)	CT (ppm)	VV (%)	CT (ppm)	VV (%)
NaOH	95,23 ± 1,32	2,25	90,01 ± 0,99	6,22	70,02 ± 1,43	29,99

Tampão	95,45 ± 1,11	2,02	89,02 ± 1,21	7,25	75,89 ± 1,23	24,12
Cloramina T	92,56 ± 0,91	4,99	80,31 ± 1,23	16,33	50,32 ± 0,99	49,69
Reag. Cor	92,99 ± 0,99	4,55	81,17 ± 1,81	15,43	45,75 ± 1,35	54,25
Enzima	94,56 ± 1,01	2,94	80,67 ± 1,00	15,95	14,56 ± 1,32	85,44

Na Tabela 19 pode-se observar que no primeiro mês todos os componentes apresentaram variação menor que 5 %, valor considerado por Brasil (2011) como sendo o valor máximo de degradação para ser considerado estável o componente.

Tabela 20. Variação dos valores (VV) de cianeto total (CT), obtidas para as amostras de tucupi analisadas com reagentes do kit quando armazenados à 30°C em relação ao método de referência.

Tempo Componente	1° mês		2° mês		3° mês	
	CT (ppm)	VV (%)	CT (ppm)	VV (%)	CT (ppm)	VV (%)
NaOH	40,32 ± 1,21	58,61	20,34 ± 0,14	78,81	n.d.	n.d.
Tampão	42,54 ± 1,10	56,33	20,56 ± 0,21	78,58	n.d.	n.d.
Cloramina T	60,21 ± 1,11	38,20	15,89 ± 0,58	83,44	n.d.	n.d.
Reag. Cor	75,32 ± 1,23	22,69	13,28 ± 0,66	86,16	n.d.	n.d.
Enzima	70,32 ± 0,99	27,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: não detectado

Os resultados após o primeiro mês de armazenamento, a 30° C (temperatura ambiente) em análise de amostra de tucupi mostraram que todos os componentes obtiveram uma variação maior que 40 %. Entretanto, no segundo mês quando a enzima linamarase armazenada foi utilizada, não se observou valor detectável de cianeto total.

Maherawati et al. (1995), ao estudarem atividade e a estabilidade da linamarase das folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e sua capacidade de hidrolizar linamarina, observaram que a atividade da linamarase foi bastante estável em temperaturas de 30 a 50° C. Porém, a estabilidade da enzima depende também do período no qual a enzima é submetida a uma determinada temperatura e a fonte de onde foi extraída.

Nas Tabelas 21 e 22 estão apresentados os valores de CT da amostra de maniva utilizando cada um dos reagentes do kit armazenados a 10°C e 30°C e os

Cloramina T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Reag. Cor	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Enzima	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: não detectado

Na Tabela 22 observa-se que o CT da amostra de maniva não apresentou valores significativos, quando usados os componentes armazenados a uma temperatura de 30° C, uma vez que as amostras apresentaram valores abaixo do limite de detecção do kit.

Nas Tabelas 23 e 24 estão apresentados os valores de CT da amostra de farinha, utilizando cada um dos reagentes do kit armazenados a 10°C e 30°C, e os respectivos percentuais de variação (VV), em relação aos resultados obtidos pelo método de referência de Essers et al. (1993).

Tabela 23. Variação dos valores (VV) de cianeto total (CT), obtidas para as amostras de farinha analisadas com reagentes do kit, quando armazenados à 10°C, em relação ao método de referência.

Tempo	1° mês		2° mês		3° mês	
	CT (ppm)	VV (%)	CT (ppm)	VV (%)	CT (ppm)	VV (%)
NaOH	9,02 ± 1,42	7,30	4,75 ± 1,94	48,31	3,77 ± 0,98	59,11
Tampão	8,99 ± 2,02	7,61	5,08 ± 1,27	44,72	3,67 ± 1,05	60,20
Cloramina T	8,53 ± 0,99	12,33	4,21 ± 1,00	54,19	1,98 ± 1,03	78,52
Reag. Cor	7,99 ± 1,56	17,88	3,99 ± 2,33	56,58	2,98 ± 1,04	67,88
Enzima	9,06 ± 1,39	6,89	5,67 ± 1,01	38,30	2,57 ± 0,99	72,13

Observando-se a Tabela 23, verifica-se que os resultados após o primeiro mês de armazenamento a 10° C, em uma amostra de farinha de mandioca, mostram que todos os componentes obtiveram uma variação maior que 5 %, ou seja, o método após um mês sob refrigeração teria uma confiabilidade de 90 %, aproximadamente.

Entretanto, a variação da amostra de farinha apresentou um valor maior que a amostra de tucupi (Tabela 23). Isto pode ser explicado por algumas farinhas serem ricas em cianeto não glicosídico e livre (ABREU et al., 2016). Além disso, a estabilidade sofre influência de todos os demais componentes Kit, incluindo a característica da amostra a ser analisada (ORIQUI, 2012).

Tabela 24. Variação dos valores (VV) de cianeto total (CT), obtidas para as amostras de farinha analisadas com reagentes do kit, quando armazenados à 30°C, em relação ao método de referência.

Componente	1° mês		2° mês		3° mês	
	CT (ppm)	VV (%)	CT (ppm)	VV (%)	CT (ppm)	VV (%)
Armazenado						
NaOH	1,01 ± 0,03	89,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tampão	2,45 ± 0,03	74,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cloramina T	1,02 ± 0,38	89,52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Reag. Cor	1,05 ± 0,06	89,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Enzima	1,98 ± 0,01	79,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: não detectado

Os resultados após o primeiro mês de armazenamento a 30° C (temperatura ambiente) em uma amostra de farinha mostram que todos os componentes tiveram uma variação maior que 5 %. Entretanto, a partir do segundo mês, não foi possível a detecção de CT pelas metodologias utilizadas (Tabela 24).

De uma maneira geral, observou-se que dentre os componentes do kit de análise, os que merecem especial atenção são as soluções de cloramina T e o reagente de cor, já que apresentaram os maiores valores de variação dos resultados em relação à metodologia de referência.

Durante a avaliação dos componentes, o kit apresentou um melhor desempenho nas amostras de tucupi, com valores menores que 5% de variação. Este fato pode ser devido às baixas concentrações de cianeto total das amostras testadas de farinha e maniva, que foram em torno de 1 a 9 ppm de HCN. Novos testes de avaliação, com amostras retiradas durante as etapas de obtenção destes derivados, são necessários.

Estes resultados indicam que o kit foi eficiente para a análise de amostras com altas concentrações dos compostos cianogênicos em sua fase inicial, na forma de linamarina e cianidrina, o que é importante para o controle durante o processamento.

5.8.1 Atividade enzimática da linamarase em papel de filtro utilizada nos testes de estabilidade

Na Tabela 25 estão apresentados os resultados de atividade enzimática da linamarase armazenada em duas diferentes temperaturas (10 e 30° C), por 2 meses.

Tabela 25. Atividade enzimática da linamarase em papel de filtro, durante o armazenamento a 10 e 30°C, por dois meses.

Tempo (mês)	Temperatura (°C)	Atividade enzimática (U/cm ²)
0	10	47
1	10	20
0	30	47
1	30	2

Na temperatura a 10° C, houve uma perda menor de atividade da enzima (27U/cm²), enquanto na temperatura de 30° C houve uma perda de 45 U/cm², após o primeiro mês de armazenamento.

Na metodologia de referência de Essers et al. (1993) é recomendado que a atividade da enzima linamarase seja ajustada para valores próximos de 5 U/mL e que durante o armazenamento, não atinjam valores menores do que 3U/mL. Isto explica a leitura de amostras de tucupi com a enzima armazenada por um mês sob refrigeração apresentar resultados com pequena variação (2,94 %) em relação ao método de referência, bem como ainda possibilitar leitura após dois meses de armazenamento, embora com variação acima de 10 %.

A termoestabilidade de uma enzima não é afetada apenas pela temperatura na qual a mesma é submetida. Ela pode ser afetada por fatores como a pureza da enzima e do substrato, pelo método utilizado na medição da taxa de reação catalisada e pelo tempo de incubação (SIZER, 2006).

Com a estabilidade mantida sob refrigeração, a atual versão do kit de análises é bastante útil para avaliação de processos, com a possibilidade de ser produzido para atender a viagens de campo com períodos menores que 30 dias, sem a necessidade de envio de amostras ao laboratório.

Alguns ajustes são necessários para o aumento deste tempo de armazenamento, como uso de conservadores ou imobilização da enzima em outro tipo de suporte.

6. CONCLUSÃO

Os produtos de mandioca apresentam comportamento diferenciado quanto ao residual de compostos cianogênicos, onde a farinha e a maniva possuem baixos residuais e o tucupi tem concentrações maiores, representado principalmente pela cianidrina.

O kit rápido é composto por soluções tampão e alcalina, reagente de cor e enzima em papel de filtro, armazenada em embalagem laminada multicamada, que

também configura como o recipiente de reação. O formato proposto para o kit foi capaz de apresentar respostas visualmente diferenciadas de cor, para as faixas de concentração de cianeto total presentes em amostras de tucupi, farinha e maniva.

O estudo de estabilidade indicou que o kit deve ser armazenado sob refrigeração e utilizado no período máximo de 30 dias, para análise de tucupi, porém com necessidade de ajustes para a análise de farinha e maniva.

As figuras de mérito de linearidade, faixa de trabalho, precisão (repetibilidade) e limite de detecção, e o teste de adição e recuperação do kit estão de acordo com as recomendações sobre validação de métodos analíticos.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. F.; CARVALHO, A. V.; THOMÁZ, K. T. C.; THOMÁZ, B. C.; CARDOSO, T. N. Residual de compostos cianogênicos em farinhas de mandioca comercializadas no Estado do Pará. In: **Anais** do XX ENAAL e o VI Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. Belém – Pará/BR. 2017.

ADEPARÁ - Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará. Instrução Normativa n.º 001/2008, de 24 de junho de 2008. Norma de identidade, qualidade, acondicionamento e rotulagem do tucupi. **Diário Oficial do Estado do Pará**, v. 116, n. 31.198, p. 7, 26 jun. 2008. Executivo 3. Disponível em:

<<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/6633377/pg-7-executivo-3-diario-oficial-do-estado-do-para-doepa-de-26-06-2008>>. Acesso em: 27 junho. 2016.

ADEPARÁ - Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará. Instrução Normativa n.º 001/2016, de 06 de maio de 2016. Dispõe sobre o regulamento técnico de produção da maniva cozida. **Diário Oficial do Estado do Pará**, v. 126, n. 33.123, p. 19, 09 mai. 2016. Executivo 3. Disponível em: <<http://www.ioepa.com.br/pages/2016/2016.05.09.DOE.pdf>>. Acesso em: 20 janeiro. 2017.

ALBUQUERQUE, J. A. A.; SEDIYAMA, T.; SILVA, A.A.; ALVES, J. M. A.; FINOTO, E. L.; NETO, F. A.; SILVA, G. R. Desenvolvimento da cultura de mandioca sob interferência de plantas daninhas. **Revista da sociedade Brasileira da ciência das plantas daninhas**, v. 30, n.1, p. 1806-9681, 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166**, Brasília, 25 de julho de 2017.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**.17^{ed}. Washington, 2002.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**.15^{ed}. Arlington, 1990.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters. An introduction designs, data analysis and model building**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1978, 672 p.

BRASIL. **Manual de garantia da qualidade analítica – Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2011, p. 227.

CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. **Culture of starchy tubers in Latin America**. Volume 2: Culture of starchy tubers in Latin-America, Fundação Cargill, São Paulo, SP, Brasil. 537 pp, 2002.

CAMARÃO, A. P.; BATISTA, H. A. M.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; CARDOSO, E.M.R. **Utilização da mandioca na alimentação de ruminantes na Amazônia**. Belém: EMBRAPA-CPATU-PA, 1993.

CAMPOS, A. P. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. de A. Efeito da fermentação e cocção nas características físico-químicas e teor de cianeto durante o processamento de tucupi. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 23 p. (Embrapa Amazônia Oriental. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 107)..

CARVALHO J. O. M. **Subprodutos da mandioca - Composição dos resíduos sólidos**. EMBRAPA-RO, 2005.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Farinhas e derivados. In: **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. Série: culturas de tuberosas amiláceas latino americanas. Campinas: Fundação Cargil, v. 3, p. 576 -620, 2003.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; MATHIAS, E. A.; RAMOS JÚNIOR, A. G. A. Estudo das propriedades físico-químicas e microbiológicas no processamento da farinha de mandioca do grupo d'água. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Campinas, v. 40, n. 4, p. 265-269, 2007.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, K. Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo – SP, 70(1), p. 41-46, 2011.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; MATHIAS, E. A.; OLIVEIRA, K. Quantificação de cianeto total nas etapas de processamento das farinhas de mandioca dos grupos seca e d'água. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo – SP, 40(1), p.221-226, 2010.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. **Determinação de cianeto durante as etapas de processamento da farinha de mandioca do grupo seca**. III Seminário de Iniciação Científica da UFRA e IX da Embrapa Amazônia Oriental, 2005.

COHEN, K. de O.; OLIVEIRA, S. S.; CHISTÉ, R. C. **Quantificação de teores de compostos cianogênicos totais em produtos elaborados com raízes de mandioca**. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2007, 23 p(Embrapa Amazônia Oriental. Documento,290).

COOKE, R. D. An Enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, n. 29, p. 345 – 352, 1978.

ESPM/SEBRAE. (Estudos de Mercado/Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). **Estudo de mercado sobre a mandioca: farinha e fécula**, 2008. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/>>. Acesso em: 19 novembro. 2016.

ESSERS. A. J. A.; BOSWELD. M. VAN DER GRIFT R. M.; VORAGEN. A. G. J. Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, n. 63, p 287-296, 1993.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Cultivos**, 2012. Disponível em: <<http://faostat2.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/S>>. Acesso em: 13 novembro 2016.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Cultivos**, 2016. Disponível em: <<http://faostat5.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/S>>. Acesso em: 25 maio 2017.

GOMES, P. **Curso de Estatística Experimental**. Piracicaba: ESALQ/USP, Nobel, 1985. 466p.

HERSKOVIIS, T. T.; JAILLET, H.; GADEGBKU, B. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. II. Denaturation by ureas. **Journal Biological Chemistry**, v. 245, n. 10, p. 2588-2598, 1970.

INMETRO-Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Coordenação Geral de Acreditação. DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: 20p, 2016.

JECFA Cyanogenic glycosides. In: Toxicological evaluation of certain food additives and naturally occurring toxicants. Geneva, World Health Organization, 39th Meeting of the Joint **FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO Food Additives Series 30)**, 1993. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je18.htm>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2016.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHOJ. L. S.; NUNE, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira Farmacologia**, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

MAHERAWATI; UTAMI, T; PRANOTO, Y; CAHYANTO, M. N. Activity and Stability of Linamarase from Cassava (*Manihot Esculenta Crantz*) Leaves and its Ability to Hydrolyze Linamarin. **Journal of Experimental Botany**, v 5, n. 7, p. 82-87, 1995.

MARIÑO-BOHÓRQUEZ, M. A. Avaliação do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases produzidas por *trichoderma harzianum* p49p11. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. São Paulo-SP, 2014.

MERCK MILLIPORE. Produtos de determinação de cianeto, 2014. Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Cyanide-Cell-Test,MDA_CHEM-14561>. **Acesso em 11 de jan.2016.**

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. 1 Ed, Varela, São Paulo, 295 p, 2000.

MODESTO JUNIOR, M. S; ALVES, R. N. B; ABREU, L. F (no prelo). **Rentabilidade do beneficiamento de folha de mandioca e de maniçoba para maniçoba**. Brasília: Embrapa Amazônia Oriental.

MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M. **Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados**. Manual Técnico. 3ª Ed. ITAL, Campinas, 92p, 2004.

NHASSICO, D.; MUQUINGUE, H.; CLIFF, J.; CUMBANA, A.; BRADBURY, J. H. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.2043-2049, 2008.

OLIVEIRA. L. A. **Manual de laboratório: Análises físico-químicas de frutas e mandioca**. Embrapa Mandioca e fruticultura, 2010, p. 175-218.

ORIQUI, L. R. Guia de estabilidade para a indústria química: definição de prazo de validade e proposição de prazo de reteste. **(Tese de Doutorado)**. Programa de pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas / SP. 2012.

PEDUZZI, P. Pará poderia liderar produção de álcool e mandioca. **Diário do Para**. 2016. Disponível em: <<http://etanolbrasil.blogspot.com/2016para-poderia-liderar>> Acesso em: 26 maio 2017.

ROBERT, P., LAVENANT, L., RENARD, D. Infrared Two - dimensional correlation and principal component analyses applied to β - lactoglobulin aggregation in water - ethanol solution. **Journal Applied Spectroscopy**, v. 56 (9), p. 1180 - 1185, 2002.

SACOLA BRASILEIRA. **Maniva**, 2014. Disponível em: <<http://asacolabrasileira.com.br/2014/03/06/maniva/#.WGZhK31WrlU>>. Acesso em 30 de dezembro.2016.

SASHI, P., YASIN, U. M., BHUYAN, A. K. Unfolding action of alcohols on a highly negatively charged state of cytochrome c. Biochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 51, p. 3273-3283, 2012.

SILVA, F. L.; SILVA, J. R.; SILVA, L. R. P **Efeito do desmatamento e do programa de transferência de renda “Bolsa Família” na produção da mandioca (Manihot Esculenta Crantz) no estado do Pará**. Observatorio de la Economía Latinoamericana, Número 197, 2014. Disponível em: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br/14/produzao-mandioca.html> Acesso em: 10 de junho de 2016.

SEAB- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, Mandioca - Análise da Conjuntura Agropecuária, Paraná: 23, 2016.

SIZER, I. W. Effects of Temperature on Enzyme Kinetics. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, John Wiley & Sons, Inc.: 35-62, 2006.

SOUZA, C. M.; BRAGANÇA, M. G. L. **Processamento artesanal da fabricação da farinha de mandioca**. Belo Horizonte, MG: EMATER, 2000.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Ed. **Helianthus**, Rio de Janeiro. p. 215-221. 2000.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C268 Cardoso, Trícia Noronha.
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MÉTODO RÁPIDO DE ANÁLISE
SEMIQUANTITATIVA DE CIANETO TOTAL EM DERIVADOS DE MANDIOCA / Trícia Noronha
Cardoso. — 2019.
64 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Ana Vania Carvalho
Coorientação: Prof^ª. Dra. Laura Figueiredo Abreu
Dissertação (Mestrado) - 1, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém,
2019.

1. Mandioca. I. Título.

CDD 664
