

Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi

Total and free cyanide contents determination during the processing steps for preparing tucupi

RIALA6/1342

Renan Campos CHISTÉ^{1*}, Kelly de Oliveira COHEN²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, São Paulo, Brasil. CEP: 13083-862, tel: 55 19 35212159, fax: 55 19 3521-2153, e-mail: renanchiste@gmail.com

²Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Sede, Parque Estação Biológica (PqEB)

Recebido: 01.06.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

O tucupi, produto amplamente consumido pela população do norte do Brasil, é obtido por meio de fermentação e cocção da manipueira, que é um subproduto da fabricação da farinha de mandioca seca. No processamento são utilizadas as raízes de mandioca que contêm elevado teor de ácido cianídrico (HCN), as quais quando ingeridas causam sério dano à saúde. No presente trabalho foram quantificados os teores de cianeto total e livre durante as etapas de processamento da manipueira desde a obtenção até a produção do tucupi. Além disso, foram determinados pH, acidez total titulável e teor de sólidos solúveis durante todas as etapas de processamento. A manipueira recém-extraída apresentou valores de 227,8 mg HCN/L de cianeto total e 46,6 mg HCN/L de cianeto livre. Após as etapas de fermentação houve decréscimo no teor de HCN, e o produto final (tucupi) apresentou valores de 37,1 mg HCN/L de cianeto total e 8,9 mg HCN/L de cianeto livre. Quanto aos demais parâmetros, os valores encontrados foram: pH (3,6), acidez total titulável (12,3 meq NaOH/100 mL) e sólidos solúveis (8,1 °Brix). No presente estudo, o tucupi não apresentou valores elevados de cianeto total e livre após aplicação do processo de fermentação e cocção da manipueira.

Palavras-chave. *Manihot esculenta*, mandioca, fermentação, manipueira, ácido cianídrico.

ABSTRACT

Tucupi, a product highly consumed by population living in the north of Brazil, is obtained by fermenting and cooking manipueira, which is produced from dry cassava flour. For producing the tucupi, cassava roots with high contents of hydrogen cyanide (HCN) are used, and it is hazardous product when it is consumed. This study analyzed the total and free cyanide contents during the whole processing steps of manipueira until getting the final production of tucupi. In addition, pH, total acidity and soluble solids contents were determined during the all processing steps of tucupi production. The newly extracted manipueira showed 227.8 mg HCN/L of total cyanide and 46.6 mg HCN/L of free cyanide. After being treated by fermentation, manipueira showed a decrease in HCN contents, and the values of 37.1 mg HCN/L of total cyanide and 8.9 mg HCN/L of free cyanide were found in the final product tucupi. The values of pH (3.6), total acidity (12.3 meq NaOH/100mL) and soluble solids (8.1 °Brix) were found. In this study, the tucupi did not show high contents of total and free cyanide by employing fermentation and cooking processes of manipueira.

Keywords. *Manihot esculenta*, cassava, fermentation, manipueira, hydrogen cyanide.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) destaca-se como importante produto da agricultura familiar no norte e nordeste do Brasil, onde números expressivos de indivíduos do meio rural vivem da produção e processamento da farinha e outros produtos, constituindo atividades de baixo investimento e fácil comercialização. De acordo com o IBGE¹, estima-se que a quantidade de mandioca produzida no Brasil em 2009 foi de 24,4 milhões de toneladas, sendo o Pará o principal estado produtor com 4,5 milhões de toneladas, seguido do Paraná (3,6), Bahia (3,4), Rio Grande do Sul (1,3) e Maranhão (1,2).

Pertence ao grupo de plantas cianogênicas por apresentar glicosídeos cianogênicos em sua composição. De acordo com Cagnon et al.², tais glicosídeos, conhecidos como linamarina e lotaustralina (proporção de 93:7 no tubérculo), após ruptura da estrutura celular da raiz, entram em contato com as enzimas presentes (linamarase) degradando estes compostos, liberando ácido cianídrico (HCN), que é o princípio tóxico da mandioca e cuja ingestão, ou mesmo inalação, representa sério perigo à saúde, podendo haver casos extremos de envenenamento.

Uma das principais formas de aproveitamento das raízes de mandioca é na produção de farinha. Durante o processo de fabricação da farinha de mandioca, as raízes trituradas são prensadas para a remoção de seu líquido, e a massa prensada segue para a torração. Este resíduo líquido é denominado de manipueira. Da manipueira produz-se o tucupi, molho parcialmente fermentado e condimentado que é considerado um ingrediente muito apreciado e utilizado na culinária paraense. A composição do tucupi, segundo Chisté et al.³, varia entre 94,64 a 97,46% de umidade, 0,18 a 1,08% de resíduo mineral fixo, 0,33 a 0,66% de proteínas, sendo considerado alimento de pH baixo. A combinação entre esse pH baixo e o alto teor de linamarina pode levar à fixação do cianeto².

Segundo Cereda⁴, a manipueira representa potencial poluente devido à grande quantidade de material de origem orgânica esgotado, além da presença dos glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto. Sendo assim, uma das formas de se evitar a poluição do meio ambiente é utilizar a manipueira na produção do tucupi.

Existem dados disponíveis sobre o teor de cianeto total e livre em 10 amostras de tucupi comercializadas na cidade de Belém, PA, Brasil³. No entanto, não foram reportados na literatura dados sobre os teores de cianeto ao longo do processo de produção do tucupi. Sabendo que o tucupi é preparado a partir da mandioca brava (teor de HCN superior a 100 mg HCN/kg de raiz sem casca), utilizada na fabricação da farinha seca, o objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade do processamento na produção do tucupi através da quantificação dos teores de cianeto total e livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Para a produção do tucupi em laboratório foram utilizados 5 kg de raízes de mandioca da cultivar Boi Branco 54, com 16 meses, escolhidas de acordo com a disponibilidade das raízes e colhidas no mês de novembro de 2005. As raízes foram doadas pelo Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brasil.

Processamento da mandioca para obtenção do tucupi

A produção do tucupi foi realizada em escala laboratorial, de maneira semelhante à utilizada nas casas de farinha do interior do Pará (Figura 1). A raiz de mandioca foi lavada em água corrente, descascada manualmente com auxílio de facas de aço inoxidável, triturada em processador de alimentos e prensada para remoção da manipueira. Em seguida, a manipueira

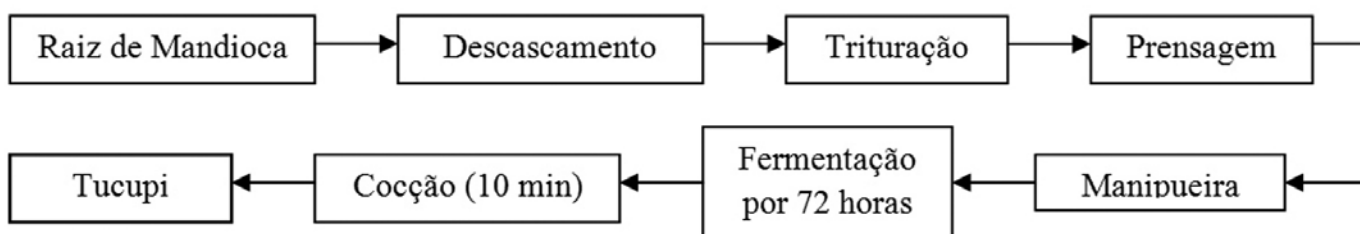


Figura 1. Fluxograma simplificado de processamento da manipueira para obtenção do tucupi

recolhida em recipientes de vidro permaneceu em repouso por 3 dias em temperatura ambiente (28 °C). Durante o repouso, houve decantação do amido, que foi posteriormente removido, ocorrendo naturalmente a sua fermentação. Após a etapa de fermentação da manípueira, foi realizada cocção por 10 minutos para obtenção do tucupi. O tucupi foi armazenado em geladeira (5 °C) até o momento de realização das análises.

Análises físico-químicas realizadas

As análises foram realizadas em cinco pontos do processamento após a obtenção da manípueira: manípueira recém-extraída (MRE); manípueira após 24 horas (M24); 48 horas (M48); 72 horas (M72) de fermentação; e no produto final após 10 minutos de cocção (T). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do pH

Determinado através de leitura direta em potenciômetro devidamente calibrado com as soluções tampões pH 7,0 e 4,0 a 20 °C, segundo método nº 981.12 da AOAC⁵.

Determinação de sólidos solúveis (°Brix)

Determinado pelo método refratométrico pela leitura direta dos graus Brix da amostra a 20 °C em refratômetro digital de bancada, de acordo com o método nº 932.12 da AOAC⁵.

Determinação da acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada através de titulação da amostra com NaOH 0,1 N, sendo o pH da solução monitorado por potenciômetro, segundo método nº 942.15B da AOAC⁵. O resultado foi expresso em miliequivalentes (meq) de NaOH/100 mL.

Determinação de cianeto total e livre

As amostras retiradas nas etapas de produção do tucupi foram analisadas em quadruplicata para quantificação do cianeto total e livre por espectrofotometria, utilizando a metodologia descrita por Cooke⁶ e, posteriormente adaptada por Essers et al.⁷, com algumas modificações. Nesta metodologia, baseada na reação de *König*, o cianeto (CN⁻) é oxidado a haleto de cianogênio cloroamina T ou N-clorosuccinimida. Este composto reage com ácido isonicotínico para produzir um dialdeído, que acopla com aminas ou compostos com o grupamento metileno ativo, como ácido dimetilbarbitúrico, para

formar um complexo colorido, e posterior leitura em espectrofotômetro a 605 nm.

Para extração dos compostos cianogênicos, foram pipetados 10 mL de amostra, adicionados 60 mL de solução alcoólica de ácido fosfórico 0,1 M (solução extratora) e centrifugados a 3000 rpm/10 min. Após centrifugação, o extrato sobrenadante, contendo os glicosídeos cianogênicos, foi transferido para balão volumétrico de 100 mL.

Para determinação de cianeto total, 0,1 mL do extrato ácido obtido foi adicionado em tubo de ensaio contendo 0,4 mL de tampão pH 7,0, sendo adicionada, então, a enzima linamarase e o tubo submetido a banho-maria por 15 min a 30 °C, promovendo a lise dos glicosídeos cianogênicos. Após esta etapa, foi adicionado 0,6 mL de solução NaOH 0,2 M e deixado por 5 minutos em repouso à temperatura ambiente (25±1 °C), decompondo a cianoidrina rapidamente para cianeto em solução alcalina. Em seguida, foram adicionados 2,8 mL de tampão pH 6,0 e 0,1 mL de cloroamina T, agitando-se o tubo para homogeneizar o conteúdo e sendo, depois, submetido a banho de gelo por 5 minutos. Finalmente, foi adicionado 0,6 mL do reagente de cor no tubo de ensaio, sendo agitado posteriormente e deixado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de passado o tempo da reação, o complexo colorido contido no tubo de ensaio, de cor azul, foi lido em espectrofotômetro a 605 nm.

Para determinação de cianeto livre, 0,6 mL do extrato ácido obtido foi adicionado em tubo de ensaio contendo 3,4 mL de tampão pH 6,0. Foi adicionado 0,1 mL de cloroamina T, e os tubos foram agitados para homogeneizar o conteúdo e, em seguida, foram submetidos a banho de gelo por 5 minutos. Após transcorrido o tempo, 0,6 mL de reagente de cor foi adicionado ao tubo de ensaio, agitado e deixado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente para posterior leitura a 605 nm.

A curva de calibração foi construída em espectrofotômetro UV-visível Shimadzu (Tóquio, Japão) a partir de 11 pontos, com concentração variando de 0,013 a 2,708 µg HCN.0,1 mL⁻¹.

Análise estatística

Os resultados médios obtidos durante o estudo (média e desvio-padrão) foram analisados com o auxílio do programa Statistica[®] versão 6⁸ empregando as análises de variância (ANOVA) e Teste de Tukey (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades do tucupi dependem diretamente do processo de fabricação realizado, assim como da variedade da mandioca utilizada no processo de extração da manipueira, apresentando, dessa forma, pH baixo (3,6), elevada acidez total (12,3 meq NaOH/100 mL) e sólidos solúveis em média de 8,1 °Brix (Tabela 1).

De acordo com os valores de pH obtidos, durante o processo de fabricação do tucupi, não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a manipueira recém-extraída e após 24 horas de fermentação. Após 24 de fermentação até 72 horas de fermentação, o valor do pH diminuiu para 3,6 e no tucupi tal valor se manteve. Valores semelhantes de pH foram encontrados por Chisté et al.³ ao analisarem 10 amostras de tucupi comercializadas nas principais feiras e supermercados da cidade de Belém, PA. O pH é um fator importante que influencia na atividade de enzimas. De acordo com Cereda⁹, quando ocorre dilacerção dos tecidos vegetais das raízes de mandioca, em decorrência do seu processamento, o glicosídeo cianogênico linamarina presente é clivado em glicose e acetonacianoidrina, devido à ação catalisadora da enzima β -glicosidase (linamarase). Numa segunda e última etapa da cianogênese (processo de geração de HCN), a acetonacianoidrina é convertida em HCN e acetona, e esta etapa pode ser mediada pela enzima hidroxinitriloliase numa faixa de pH de 3,5-6,0, ou ocorrer espontaneamente quando os valores de pH são maiores que 4,0. Dessa forma, a amostra de tucupi analisada no presente estudo apresentou valor dentro dessa faixa ácida, podendo contribuir para a cianogênese da linamarina.

Tabela 1. Sólidos solúveis, pH e acidez da manipueira até obtenção do tucupi

Etapas do processamento	pH	Acidez total titulável (meq NaOH/100 mL)	Sólidos Solúveis (° Brix)
MRE	6,3 ± 0,10 ^a	1,9 ± 0,01 ^a	7,2 ± 0,06 ^a
M24	6,2 ± 0,06 ^a	2,2 ± 0,06 ^a	6,5 ± 0,10 ^b
M48	4,0 ± 0,01 ^b	6,5 ± 0,10 ^b	6,3 ± 0,06 ^c
M72	3,6 ± 0,06 ^c	10,7 ± 0,20 ^c	6,3 ± 0,06 ^c
T	3,6 ± 0,10 ^c	12,3 ^a ± 0,01 ^d	8,1 ± 0,06 ^d

MRE = manipueira recém-extraída; M24 = manipueira após 24 horas de fermentação; M48 = manipueira após 48 horas de fermentação; M72 = manipueira após 72 horas de fermentação; T = tucupi. Média com letras iguais em uma mesma coluna não se diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Com relação ao teor de acidez total titulável, os valores apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) até a obtenção do tucupi, provavelmente devido à fermentação ocorrida pela presença do amido decantado na manipueira. Valores inferiores ao encontrado no presente estudo foram reportados por Chisté et al.³ para amostras de tucupi comercializadas na cidade de Belém, PA, (3,9 a 10,6 meq NaOH/100 mL). O aumento no teor de acidez total está relacionado com a diminuição nos valores de pH durante o processamento do tucupi devido à liberação de ácidos provenientes da fermentação. Da mesma forma, no processamento da farinha d'água, a fermentação do amido presente demonstra ser o responsável pelo aumento da acidez¹⁰. Vilpoux¹¹ relata que a acidez da farinha permite obter informações sobre o processo de fermentação pelo qual passou o produto, ou seja, quanto maior a acidez, maior a intensidade da fermentação ou tempo do processo de pubagem (molho ou maceração).

Quanto ao teor de sólidos solúveis, houve diminuição desde a MRE até 72 horas de fermentação. O teor de sólidos solúveis indica, dentre outros constituintes, os açúcares dissolvidos no meio, que também estão disponíveis para processos fermentativos, sendo esta a possível causa para a diminuição no teor durante o processo de fermentação da manipueira. No tucupi, o valor aumentou para 8,1 °Brix em função da concentração do meio, devido à evaporação de líquido durante o processo de cocção do molho fermentado.

A Figura 2 mostra o resultado das concentrações de cianeto total e livre durante as etapas de processamento do tucupi. A variação dos teores de cianeto está relacionada

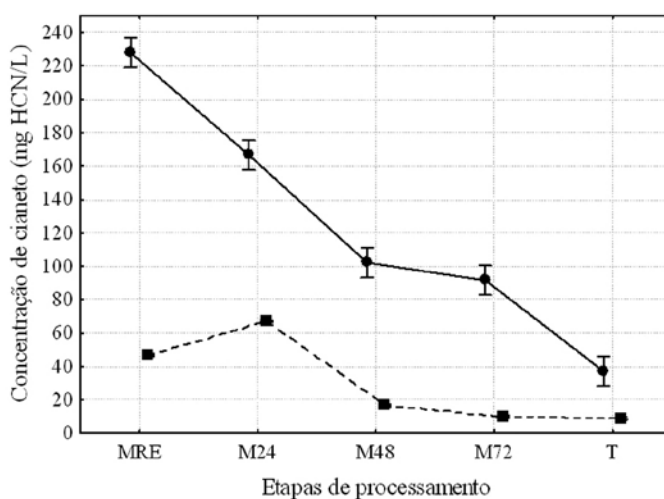


Figura 2. Teores de cianeto total (●) e cianeto livre (■) nas etapas de processamento da manipueira para obtenção do tucupi

com a matéria-prima e/ou com o processo de obtenção do tucupi, tendo em vista que mandiocas com alto teor de ácido cianídrico na raiz poderão apresentar valor elevado na elaboração do tucupi, caso a destoxificação não seja eficaz durante as etapas de processamento.

O teor de cianeto total, conforme esperado, apresentou comportamento decrescente em seus teores em função do processo natural de hidrólise realizado pela enzima linamarase em contato com o substrato linamarina, diminuindo, assim, a concentração de cianeto total (ligado ou potencial). Na MRE o teor de cianeto total foi de $227,8 \pm 10,9$ mg HCN/L, diminuindo para $166,6 \pm 9,3$ mg HCN/L na M24, $102,1 \pm 1,9$ mg HCN/L na M48, $91,6 \pm 5,2$ mg HCN/L na M72 e $37,1 \pm 1,7$ mg HCN/L no tucupi (T). Apenas no período de 48 e 72 horas de fermentação, os teores de cianeto total não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

A concentração inicial do cianeto livre (forma diretamente tóxica ao ser humano) foi de $46,6 \pm 0,9$ mg HCN/L na MRE, e após 24 horas de fermentação esse valor subiu para $67,1 \pm 0,7$ mg HCN/L. Esse aumento pode ser explicado devido à hidrólise do cianeto total para a forma livre do cianeto, evidenciado pela diminuição nos valores de cianeto total. É possível afirmar que durante as primeiras 24 horas de fermentação da manipueira, o teor de cianeto livre aumentou até que fosse liberado o máximo dessa forma de cianeto. Nas etapas seguintes foram observadas reduções nos teores de cianeto livre em decorrência do processo fermentativo. Após 48 horas de fermentação (M48) o teor de cianeto livre na manipueira diminuiu para $16,5 \pm 0,4$ mg HCN/L, passando por $9,9 \pm 0,1$ mg HCN/L em 72 horas de fermentação (M72). Ao término da fermentação da manipueira, com a realização da cocção por 10 minutos para o preparo do tucupi, houve continuidade na redução do teor de cianeto livre apresentando valor de $8,9 \pm 0,1$ mg HCN/L, devido à volatilização causada pela exposição às elevadas temperaturas.

O processo fermentativo anterior ao processo de cocção (fervura) permite a ação mais prolongada da linamarase, enzima que hidrolisa a linamarina (responsável pela liberação de HCN), que é aos poucos inibida, pela acidificação e queda do pH em decorrência da fermentação. Durante a cocção ocorre desativação imediata da linamarase¹². Segundo Hosel e Barz¹³, cerca de 70% da linamarina presente na raiz da mandioca são removidos por hidrólise enzimática durante o processamento. Em complementação, quase todo o

cianeto que é gerado é removido por volatilização ou solubilização¹⁴.

Segundo Cereda⁹, casos significativos de envenenamento por cianeto são restritos às regiões onde a dieta alimentar é composta quase exclusivamente de mandioca e, além disso, estão ligados à desnutrição. Os casos comprovados de intoxicação são pouco frequentes. Em geral, caracterizam crianças com casos graves de desnutrição.

Após estudos da determinação do potencial de intoxicação em ratos, de linamarina extraída de mandioca, feita por Cereda e Lopes¹⁵, os autores chegaram à conclusão de que a DL_{50} (dose letal para 50% de ocorrência) oral de linamarina extraída foi $324,86 \pm 1,5$ mg/kg/peso, correspondendo a $35,35$ mg de HCN/kg peso. A DL_{50} aceita pela OMS é de 10 mg/kg de peso, menor que a estabelecida até agora. A única forma tóxica é a de cianeto livre (CN⁻), ou de seu ácido (HCN)⁹. No presente estudo o teor de cianeto livre encontrado no tucupi foi de $8,9$ mg HCN/L, portanto, com base nesses dados, um indivíduo adulto de 70 kg deveria ingerir na alimentação aproximadamente 78 litros de tucupi para que a DL_{50} seja alcançada, considerando o limite aceito atualmente pela OMS. Abaixo da dose letal existe um mecanismo de destoxificação, na qual o cianeto é transformado em tiocianato, em presença de enzima rodanase, e cisteína, um aminoácido doador de equivalentes redutores, na forma de hidrogênio presente no grupamento lateral tiólico¹⁶. O tiocianato formado não é mais tóxico e é eliminado pela urina^{2,9}.

CONCLUSÃO

O tucupi, obtido pela fermentação e cozimento da manipueira de forma padronizada, pode ser caracterizado como um alimento de baixo pH, elevada acidez e seguro para o consumo humano, em função de o referido processamento reduzir os teores de cianeto originais da manipueira a níveis atóxicos ao homem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro e à Embrapa Amazônia Oriental pela doação da matéria-prima e pela realização das análises no Laboratório de Agroindústria.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Municipal. Brasil; 2009; 36:1-90.
2. Cagnon JR, Cereda MP, Pantarotto S. Glicosídeos cianogênicos da cassava: biossíntese, distribuição, destoxificação e métodos de dosagem. *In: Cereda MP, coordenador. Tuberosas amiláceas latino-americanas*. São Paulo: Fundação Cargill; 2002. p.83-99.
3. Chisté RC, Cohen KO, Oliveira SS. Estudo das propriedades físico-químicas do tucupi. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(3):787-92.
4. Cereda MP. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. *In: Cereda MP, coordenador. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. São Paulo: Fundação Cargill; 2002. p.13-37.
5. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: edited Ig W. Horwitz 16th ed. Washington (DC): 1997; 2, p. 850.
6. Cooke RD. An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J Sci Food Agric*. 1978; 29:345-52.
7. Essers AJA, Bosveld M, Van der Grift RM, Voragen AGJ. Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *J Sci Food Agric*. 1993; 63:287-96.
8. STATSOFT. Statistica (data analysis software system), version 6; 2001.
9. Cereda MP. Processamento da mandioca como mecanismo de detoxificação. *In: Cereda MP, coordenador. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill; 2002.p.47-80.
10. Chisté RC, Cohen KO, Mathias EA, Ramoa Junior AGA. Estudo das propriedades físico-químicas e microbiológicas no processamento da farinha de mandioca do grupo d'água. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(2):265-9.
11. Vilpoux OF. Produção de farinha d'água no Estado do Maranhão. *In: Cereda MP, Vilpoux OF. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill; 2003.p.621-42.
12. Cereda MP, Vilpoux O. Produtos regionais a base de mandioca ou derivados. *In: Cereda MP, coordenador. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill; 2003.p.693-711.
13. Hosel W, Barz W. β -glucosidases from *Cicer arietum* L. *Eur J Biochem*. 1975; 57(2):607-16.
14. Ikediobi C, Onyia G, Eluwah C. A rapid inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava products. *Agric Biol Chem*. 1980; 44(12):2803-9.
15. Cereda MP, Lopes AM. Determinação do potencial de intoxicação em ratos, de linamarina extraída de mandioca. V Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos; novembro de 2003; Campinas, São Paulo.
16. Chalker JM, Bernardes GJL, Lin YA, Davis BG. Chemical modification of proteins at cysteine: oppportunities in chemistry and biology. *Chem Asian J*. 2009; 4:630-40.