



UNIVERSIDADE
E D U A R D O
MONDLANE

Faculdade de Engenharia

Departamento de Engenharia Química

Suzana Guerreiro da Cruz

**Avaliação do suco de folhas frescas de mandioca (*Manihot esculenta*,
Crantz) como suplemento nutricional de ferro**

Maputo, 21 Agosto de 2020



Faculdade de Engenharia
Departamento de Engenharia Química

Avaliação do suco de folhas frescas de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) como suplemento nutricional de ferro



Estudante: Suzana Guerreiro da Cruz

Supervisor: Prof. Doutor Cristiano Macuamule

Maputo, 21 agosto de 2020

Declaração de originalidade

Declaro que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção de qualquer grau ou num outro âmbito e que constitui o resultado do meu trabalho individual. Esta dissertação é apresentada em cumprimento dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre, pela Universidade Eduardo Mondlane.

Suzana Guerreiro da Cruz

Data

Agradecimentos

Ao Instituto de Investigação Agrária de Moçambique pelo apoio que me foi prestado, particularmente a Estação Agrária de Umbeluzi (especialmente ao Dr. Sofrimento), por terem cedido as machambas para a colheita das folhas de mandioca durante pré-ensaio e o desenvolvimento do estudo.

Ao Prof. Doutor Cristiano Macuamule, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo, o apoio prestado no momento que precisei.

A todos os trabalhadores do Biotério e não só, da Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane em especial ao Dr. Alberto Dimande, Ana Paula Jamisse, Sr. Nilton Samuel Matsinhe, Sr. Reginaldo Chandrique e dr. Benedito Flor Gilberto, sem me esquecer da Doutora Gaby Monteiro, pelo apoio, amizade e ensinamentos que partilharam comigo.

A Doutora Eng.^a Irene de Carvalho que contribuiu com o seu conhecimento na minha orientação na fase inicial deste estudo, me incentivou e deu muita força para materialização do trabalho.

Aos meus colegas de turma, pela oportunidade de interacção, amizade, apoio e confiança.

Ao Prof. Doutor José da Cruz, pela motivação em me ver concluir este curso, o meu muito obrigado.

Aos meus filhos Eláine da Cruz Ferreira e Kleiton da Cruz Ferreira pela paciência e compreensão nos momentos de ausência.

A Deus, pois sem ELE nada disto seria possível.

Dedico, a todos que de alguma forma ajudaram e vivenciaram este trabalho.

A minha mãe Josefa Niquice;

Ao meu grande amigo e companheiro Castigo Chemane;

Ao meu esposo Orlando Artur Ferreira (*in memoriam*);

Por todo amor e dedicação direccionados a minha pessoa.

Índice

1. Introdução	10
1.1 Justificativa	15
2. Objectivos do estudo.....	16
2.1 Objectivo geral.....	16
2.2 Objectivos específicos	16
3. Hipóteses.....	17
4. Contribuição.....	18
5. Revisão bibliográfica	19
5.1 Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> -Crantz)	19
5.2 Cultivo e uso da mandioca em Moçambique e no mundo	21
5.3 Principais variedades (cultivares) de mandioca	23
5.3.1 Variedade cultivadas em Moçambique	24
5.4 Processamento e consumo da mandioca	24
5.4.1 Consumo das folhas de mandioca (Matapa)	25
5.5 Aspectos nutricionais e antinutricionais da mandioca	27
6. Materiais e métodos	32
6.1 Colheita do material botânico	32
6.2 Preparação do suco de folhas frescas de mandioca	33
6.3 Animais em experiência.....	34
6.4 Administração do suco de folhas frescas de mandioca.....	35
6.5 Análises bioquímicas e fisiológicas	35
6.6 Equipamento utilizado	35
6.7 Avaliação de toxicidade aguda do suco de folhas frescas de mandioca	36
6.8 Avaliação da toxicidade subaguda do suco de folhas frescas de mandioca	37
6.9 Análises laboratoriais.....	39
6.9.1 Parâmetros hematológicos	39
6.9.2 Monitoria da temperatura.....	39
6.9.3 Consumo de água e alimento nos murganhos	40
6.10 Análises estatísticas	41
7. Resultados e discussão.....	42
7.1 Avaliação da toxicidade aguda (Dose única).....	42
7.2 Avaliação da toxicidade subaguda.....	48

7.2.1 Determinação dos níveis de hemoglobina	48
7.2.2 Determinação dos níveis de enzimas hepáticas	49
7.3. Consumo de água dos murganhos.....	55
7.4. Avaliação comportamental	56
7.5. Avaliação macroscópica de órgãos e tecidos	57
8. Conclusões	60
9. Recomendações.....	61
10. Constrangimentos e considerações finais	62
11. Referências.....	65
Anexo.....	71

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição nutricional do tubérculo e das folhas de mandioca.	27
Tabela 2 - Composição nutricional da dieta padrão (ração A2 tipo <i>pellets</i>) administrada aos murganhos.	31
Tabela 3 - Tratamento de murganhos para ensaios de toxicidade aguda do suco de folhas frescas de mandioca.	33
Tabela 4 - Tratamento de murganhos para ensaios de toxicidade subaguda durante 30 dias	35
Tabela 5 - Valores de hemoglobina em murganhos tratados com dose única de 300 mg/Kg de suco de folhas frescas de mandioca (SFF) e observados durante 14 dias.	40
Tabela 6 - Valores de hemoglobina em murganhos tratados com diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca e observados durante 30 dias.	43
Tabela 7 - Variação dos níveis de ALT, AST, Creatinina e Uréia durante 30 dias de administração de diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca.	48
Tabela 8 : Valores de consumo de água por animais tratados com diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca durante um período de 30 dias.	50

Índice de figuras

- Figura 1** - (A) Pé de mandioca/Mandioqueira (*Manihot esculenta*-Crantz), (B) Detalhe das folhas de mandioca, (C) Detalhe das raízes (Mandioca) 17
- Figura 2** - Produção da mandioca em Moçambique. 19
- Figura 3**- Localização geográfica do distrito de Boane e indicação do local de colheira de amostras de material botânico. 29
- Figura 4** - Gaiola plástica com grade metálica e garrafa-bebedouro plástico graduado. 31
- Figura 5** - (A) – Murganho e agulha de ponta romba usada para administração de tratamentos 32
- Figura 6** - (A) – Punção cauda para colheira de sangue de murganho.(B) – Colheita de sangue de murganho em tubo capilar microhematócrito para análises hematológicas de toxicidade aguda do suco de folhas frescas de mandioca. 34
- Figura 7** - Variação dos níveis de ALT (A), AST (B), Creatinina (C) e Ureia (D) durante 14 dias em animais administrados 300 mg/Kg de extracto de folhas frescas de mandica. 41
- Figura 8** - Variação do peso dos animais tratados com 300 mg/Kg de extracto de folhas frescas de mandioca durante 14 dias de observação. 42
- Figura 9** – Variação do peso dos animais tratados com diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca durante 30 dias. 49
- Figura 10** - Fotograficas de murganhos antes e depois de sacrificados humanamente para exame de lesões tumeficientes após administração de suco de folhas frescas de mandioca. (A) Animal com pêlo eriçado e tumefação na porção ventral do pescoço, (B) Animal com tumefação na parte lateral da cabeça; (C) e (D) Animais com incisão ventral para exame macroscópico de órgãos e tecidos da cavidade abdominal e torácica. 51

Resumo

Mandioca é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família *Euphorbiaceae* cuja altura varia entre 1 e 5 metros. Suas folhas são palmadas, com variações no tamanho, coloração, número e forma dos lóbulos. A parte aérea da mandioca é aproveitável para alimentação, sendo o terço superior mais rico do ponto de vista nutricional. A composição química e nutricional das folhas varia em função da qualidade, variedade e idade da planta, factores climáticos, fertilidade do solo e proporção entre folhas e talos. As folhas de mandioca contêm elevados teores de proteínas, minerais, principalmente ferro, manganês, magnésio, zinco; fibras, polifenóis e inibidores de proteases. Contêm ainda glicosídeos cianogénicos, linamarina e lotaustralina que após hidrólise libertam ácido cianídrico, tóxico aos seres humanos, havendo formas de reduzir significativamente o teor dessas substâncias.

Diversas populações usam o suco de folhas de mandioca para tratamento de anemia. Este trabalho foi desenvolvido com objectivo de avaliar o efeito da ingestão do suco de folhas frescas de mandioca como suplemento nutricional de ferro usando 36 murganhos como animais experimentais. Folhas de mandioca foram trituradas e de seguida preparadas soluções nas concentrações de 0.2, 0.25, 0.3, 0.5 e 1.0 mg/ml. As soluções foram administradas por gavagem a murganhos nas doses de 0.6 a 3.1 mg/Kg durante trinta dias. Os resultados sugerem que o suco de folhas frescas de mandioca induz aumento dose-dependente da libertação de enzimas hepáticas e do nível de hemoglobina. O suco das folhas frescas de mandioca induz também sinais de intoxicação, representados pelo aparecimento de tumefacções na região ventral e lateral do tecido subcutâneo dos animais.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*, folhas frescas de mandioca, suplementação de ferro, actividade nutricional, toxicidade.

Abstract

Cassava is a perennial, shrubby plant, belonging to the *Euphorbiaceae* family whose height varies between 1 and 5 meters. Its leaves are webbed, with variations in the size, color, number and shape of the lobes. The aerial part of the cassava is usable for food, being the upper third richer from a nutritional point of view. The chemical and nutritional composition of the leaves varies depending on the quality, variety and age of the plant, climatic factors, soil fertility and proportion between leaves and stems. Cassava leaves contain high levels of proteins, minerals, mainly iron, manganese, magnesium, zinc; fibers, polyphenols and protease inhibitors. They also contain cyanogenic glycosides, linamarin and lotaustraline which, after hydrolysis, release hydrocyanic acid, which is toxic to humans, and there are ways to reduce the content of these substances significantly.

Several populations use the juice of cassava leaves to treat anemia. This work was developed to evaluate the effect of taking fresh cassava leaves juice as a nutritional iron supplement using 36 mice as experimental animals. Cassava leaves were crushed and then solutions in concentrations of 0.2, 0.25, 0.3, 0.5 and 1.0 mg/ml were prepared. The solutions were administered by gavage to mice at doses of 0.6 to 3.1 mg/kg for thirty days. The results suggest that the juice of fresh cassava leaves induces a dose-dependent increase in the release of liver enzymes and the level of hemoglobin. The juice of fresh cassava leaves also induces signs of intoxication, represented by the appearance of swelling lesions in the ventral and lateral area of the subcutaneous tissue in animals.

Keywords: *Manihot esculenta*, fresh cassava leaves, iron supplementation, nutritional activity, toxicity.

Lista de abreviaturas e siglas

ADA - American Dietetic Association

ALT - Alanina Amino- Transferase

AST - Aspartato Amino-Transferase

DCA- Direcção de Ciências Animais

DL50 - Dose Letal 50%

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

ffm - Folhas frescas de mandioca

FAVET - Faculdade de Veterinária

FAENG - Faculdade de Engenharia

FeSO₄ - sulfato ferroso

g - grama

GHS - Globally Harmonised System

g/L - gramas/litro

hg - hemoglobina

IIAM - Instituto de Investigação Agrária de Moçambique

L x C x A - Largura x Comprimento x Altura

mg - Miligrama(s)

mg/ml - relação massa por volume da solução

ml - Mililitro(s)

ml/100g - relação volume por peso do animal

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development

OMS - Organização Mundial da Saúde

UEM - Universidade Eduardo Mondlane

1. Introdução

O ferro é um elemento classificado como micro nutriente, por ser um mineral necessário em pequenas quantidades diárias (miligramas ou microgramas), para manutenção da normalidade metabólica e funcionamento adequado das células (Silva, 2011). A distribuição desse mineral acontece em duas formas: a forma heme, encontrada em carnes e vísceras sob a forma de hemoglobina e mioglobina, e a forma não-heme, que é encontrada em alimentos de origem vegetal (Daniel & Martins, 2006).

O ferro é vital para a homeostase celular sendo indispensável para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético. É um cofator importante para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio. Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado. Um indivíduo adulto tem no seu organismo de 4 a 5g de ferro, sendo que cerca de 2,5g na forma de Hemoglobina (Grotto, 2008).

Oliveira e Marchini (2008) explicam a importância do ferro e a formação da hemoglobina com a participação deste metal. A maior parte do ferro corpóreo está ligada à hemoglobina no sangue ou à mioglobina nos músculos; outra parte está ligada às enzimas no interior de cada célula do organismo. O ferro tido como ferro não-funcional está armazenado no fígado, no baço, na medula óssea ou na circulação sanguínea. Uma das funções mais conhecidas do ferro decorre de sua presença como elemento estrutural do grupo heme na hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio e do gás carbônico no sangue. Quando o sangue passa pelos capilares pulmonares, o oxigênio presente nos alvéolos se liga à hemoglobina das hemácias, que serão distribuídas na circulação arterial, para oxigenação dos tecidos corpóreos.

De uma dieta habitual de 14 mg de ferro, apenas 1 a 2 mg são absorvidas pelo organismo, ou seja, 5 a 10%. De facto, a deficiência deste mineral é responsável pela doença nutricional mais comum no mundo, a anemia ferropénica ou nutricional, a qual tem por principal causa a ingestão insuficiente, perda excessiva ou absorção inadequada de ferro (Silva, 1994). A anemia nutricional é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um estado em que a concentração de hemoglobina sanguínea é anormalmente baixa em consequência da

carência de um ou mais nutrientes, qualquer que seja a origem desta carência. Dada a frequência com que ocorre por deficiência de ferro (mais de 90% dos casos), a anemia tem sido vista como sinónimo de deficiência de ferro.

A deficiência de ferro acarreta consequências para todo o organismo, sendo a anemia a manifestação mais relevante. Por outro lado, o acúmulo ou excesso de ferro é extremamente nocivo para os tecidos, uma vez que o ferro livre promove a síntese de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas e lesam proteínas, lípidos e DNA. Portanto, é necessário que haja um equilíbrio perfeito no metabolismo do ferro, de modo que não haja falta ou excesso do mesmo. Essa homeostase vai possibilitar a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evitar possíveis danos teciduais (Grotto, 2008).

Por ser uma enfermidade sistémica, os danos ocasionados, bem como seus sintomas, apresentam-se conforme a idade e os órgãos afectados. Nas crianças, há um aumento da mortalidade e susceptibilidade à infecções, além de danos cerebrais e alterações no desenvolvimento físico e cognitivo que levam a uma diminuição da actividade. Quanto aos adultos, suas consequências deletérias levam a uma diminuição na capacidade para o trabalho, trazendo consequências negativas tanto no âmbito individual como populacional (Andrade, 2004). Devido às consequências já bem conhecidos por deficiência de ferro, a OMS categoriza esta condição como um dos dez problemas mais sérios de saúde no mundo actual.

A anemia e a deficiência de ferro afectam mais de 3,5 bilhões de indivíduos no mundo em desenvolvimento. A Organização Pan-Americana de Saúde estima que para cada pessoa com anemia, exista pelo menos, mais uma com deficiência de ferro. Assim, numa população com 50% de crianças com anemia, 100% de facto são deficientes em ferro. Crianças e gestantes representam um grupo com grande vulnerabilidade a esta carência, em virtude do aumento das necessidades de ferro, induzidas pela rápida expansão de glóbulos vermelha e pelo crescimento acentuado dos tecidos (Silva & Camargos, 2006). De acordo com Cambaza (2013), a anemia tem sido uma das causas mais comuns de morte sendo responsável por cerca de 20% da mortalidade materna em países da África Subsariana, incluindo Moçambique,

onde em particular, as mulheres gestantes e crianças recém-nascidas são os grupos mais afectados, 50% em 2002.

O paradigma historicamente mais remoto dos modelos de prevenção e tratamento consistia na utilização de um prego implantado em um limão, consumindo-se o suco da fruta no dia, constituindo uma engenhosa estratégia de uso simultâneo de ferro (a conhecida "ferrugem" que manchava de vermelho escuro o limão) e vitamina C até então desconhecida. Esta prática constituía a mais engenhosa estratégia do uso simultâneo de ferro e vitamina C até então conhecida. É também desta fase a recomendação de se ingerir sangue e vísceras de animais como meio de combater as anemias. Estas experiências, precederam a utilização farmacológica (fundamentada em investigações científicas) do ferro (Filho & Ferreira, 1996).

O tratamento da anemia por deficiência de ferro foi introduzido por Blaud, em 1832, com um composto cujo o principal constituinte era o carbonato férrico. A "pílula de Blaud" permaneceu como pilar do tratamento da deficiência de ferro por mais de cem anos, até o aparecimento de novos compostos com ferro (Cançado *et al.*, 2010).

O tratamento da anemia por deficiência de ferro, consiste da orientação nutricional, administração por via oral ou parenteral de compostos com ferro e, eventualmente transfusão de sangue. Diversas substâncias estão disponíveis para o tratamento e prevenção da deficiência de ferro e da anemia por deficiência de ferro como alternativas ao sulfato ferroso. Esses compostos apresentam como desvantagens, em geral, um custo mais elevado e/ou uma biodisponibilidade menor quando comparado ao sulfato ferroso. O sulfato ferroso é considerado referência, devido a sua elevada biodisponibilidade frente a outros compostos, sendo portanto utilizado em estudos cuja finalidade é avaliar outras substâncias contendo ferro (Cançado *et al.*, 2010).

Apesar da eficácia dos compostos com sal ferroso, estes apresentam elevada frequência de efeitos adversos que podem chegar a 40% ou mais, e tem relação directa com a quantidade de ferro solúvel presente no tracto gastrointestinal superior. Os efeitos adversos mais frequentemente relatados são:

- pirose,
- epigastralgia,
- náusea,
- vômito,
- gosto metálico,
- escurecimento do esmalte dentário,
- dispepsia,
- plenitude ou desconforto abdominal,
- diarreia
- e obstipação.

O maior obstáculo ao sucesso da terapia com sulfato ferroso é a náusea e o desconforto epigástrico, que ocorre 30 a 60 minutos após a ingestão do medicamento. Estes sintomas têm relação directa com a dose administrada e, em alguns casos, podem desaparecer dois dias após o início da terapia sem necessidade de descontinuação da mesma.

Embora o tratamento mais convencional para a anemia por deficiência de ferro seja a administração do micronutriente, na maioria das vezes como sulfato ferroso, ainda prevalecem, em diferentes comunidades no nosso país, práticas diferenciadas de combate a esta deficiência. Uma destas práticas, comum nas províncias do sul de Moçambique (Maputo, Gaza e Inhambane), é o consumo do suco de folhas frescas de mandioca como suplemento nutricional de ferro. Assim, este trabalho foi desenvolvido visando comprovar a utilidade e segurança desta prática.

Esta dissertação inicia com a presente introdução que inclui uma justificativa para a realização do estudo, seguindo-se uma revisão bibliográfica sobre o cultivo e uso tanto do tubérculo como das folhas de mandioca a nível global e nacional, apresentação dos objectivos da pesquisa, enunciação das hipóteses testadas, apresentação dos materiais e métodos, dos resultados e da discussão. Nas últimas três secções a dissertação apresenta as conclusões a que se pôde chegar considerando os factores que influenciaram o estudo, os constrangimentos enfrentados e as soluções adoptadas para resolução dos mesmos mantendo a validade

científica dos resultados e culmina com apresentação de recomendações para estudos futuros e a lista de referências bibliográfica consultadas durante a elaboração do trabalho.

1.1 Justificativa

Embora o ferro seja um dos nutrientes mais estudados e mais abundantes na natureza, a sua deficiência ainda constitui um dos problemas nutricionais com elevada prevalência no mundo. A elevada incidência de anemia em alguns países e as suas consequências irreversíveis determinam a necessidade de estabelecer medidas nutricionais com o objectivo de combater e controlar a deficiência nutricional de ferro. Segundo a American Dietetic Association (ADA), tais medidas incluem: educação nutricional, suplementos nutricionais e fortificação de alimentos (Lønnerdal, 1996). Contudo, a administração do sulfato ferroso via oral aos pacientes, ainda que seja eficiente na correcção dos níveis de hemoglobina, os efeitos colaterais gastrointestinais, tais como náuseas, cólicas abdominais, obstipação e/ou diarreia são observados em 15 a 20% dos indivíduos, o que contribui para a baixa aderência ao tratamento (Pereira *et al.*, 2014; Liabeuf *et al.*, 2014).

A suplementação com ferro é uma das formas de intervenção que possibilita a cooperação directa do indivíduo ou de grupos específicos, sem necessidade de obrigação da ingestão diária da medicação, factor que leva muitas vezes à desistências no tratamento.

Assim, o presente estudo visa responder a seguinte pergunta: Qual é o efeito da ingestão do suco de folhas frescas da mandioca como suplemento nutricional de ferro, particularmente o seu efeito na elevação dos níveis de hemoglobina no organismo?

2. Objectivos do estudo

2.1 Objectivo geral

Avaliar os efeitos da ingestão do suco de folhas frescas de mandioca como suplemento nutricional de ferro.

2.2 Objectivos específicos

- Identificar alterações fisiológicas em murganhos após administração do suco das folhas frescas de mandioca;
- Identificar alterações nos níveis de hemoglobina no sangue de murganhos após administração do suco de folhas frescas de mandioca;
- Identificar alterações enzimáticas (ALT, AST, Creatinina e Ureia) no sangue de murganhos após a administração do suco de folhas frescas de mandioca;
- Determinar a segurança ou a toxicidade da ingestão do suco de folhas frescas de mandioca.

3. Hipóteses

H0: A ingestão do suco de folhas frescas de mandioca não aumenta a concentração de hemoglobina no organismo.

H1: A ingestão do suco de folhas frescas de mandioca aumenta a concentração de hemoglobina no organismo.

4. Contribuição

Este trabalho vem contribuir no conhecimento científico das implicações na saúde pública, do uso de suco de folhas frescas de mandioca como suplemento de ferro uma vez que esta prática é relativamente comum nas comunidades do sul de Moçambique, mesmo não se conhecendo a eficácia desta nem as suas implicações sobre a saúde das mulheres gestantes, principais consumidores, nem dos seus filhos por nascer.

5. Revisão bibliográfica

5.1 Mandioca (*Manihot esculenta*-Crantz)

Mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz), é uma planta tuberosa que pertence à classe das dicotiledôneas, a ordem *Euphorbiales*, família *Euphorbiaceae*, género *Manihot* e a espécie *Manihot esculenta* subsp *esculenta*. O género *Manihot* é composto por cerca de 98 espécies. A única espécie do género cultivada comercialmente, visando à produção de raízes de reserva ricas em amido é a *Manihot esculenta*, Crantz. A polpa que é rica em amido que pode ser branca, creme, amarela ou alaranjada. Esta cultura foi introduzida em África no século XVI pelos navegadores portugueses através da África Sub-Sahariana e actualmente a mandioca encontra-se distribuída por todos continentes (Chimuca, 2013).

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é planta originária da América do Sul, provavelmente da região Nordeste e Central do Brasil, onde já era cultivada pelos índios. Foi descrita pela primeira vez em 1573 por Magalhães Gandavo, sendo disseminada no mundo pela colonização europeia no século XVIII, com mais de 1.200 espécies. As plantas são herbáceas quando novas, lenhosas, arbustivas ou subarbustivas na maturidade. Produz raiz tuberosa de cores: branca, amarela ou rósea. As espécies são divididas em grupos: mandioca brava, usada para indústria, e mandioca mansa (para mesa), utilizada no consumo in natura ou cozida (Filho & Alves, 2004).

As mandiocas classificadas como mansas são aquelas cujo teor de ácido cianídrico por kg de raiz fresca não ultrapassa 50mg. As mandioca bravas, amargas ou venenosas, de uso industrial são aquelas cujo teor de ácido cianídrico por kg de raiz fresca é superior a 100 mg (Pestana & Castro, 2015).

A mandioqueira pode ser dividida em parte aérea (hastes, pecíolos e folhas) e parte subterrânea (raízes tuberosas). A respeito das variações inerentes à variedade utilizada e às influências das condições de solo e ambiente da cultura, de modo geral, observa-se na planta madura aproximadamente 50% de raízes tuberosas, 40% de hastes, pecíolos e 10% de folhas (Pestana & Castro, 2015).

Algumas culturas atingem 1 metro, outras podem atingir até 5 metros de altura. Suas folhas são palmadas podendo variar em tamanho, coloração, número e forma de lóbulos. Geralmente contêm cinco a sete lóbulos mais ou menos estreitos e longos ou estrangulados (Bohnenberg, 2008).

Toda a parte aérea da mandioca pode ser considerada como aproveitável para alimentação, sendo o terço superior, mais rico do ponto de vista nutricional (Bohnenberg, 2008).

O ciclo da cultura da mandioca para indústria é de 16 a 24 meses com produção de 25 a 35 toneladas por hectare em média. A mandioca de mesa tem ciclo entre 7 e 14 meses e a produtividade média fica entre 15 e 20 toneladas (Filho & Alves, 2004).



(A)



(B)



(C)

Figura.1: (A) Pé de mandioca/Mandioqueira (*Manihot esculenta*-Crantz), (B) Detalhe das folhas de mandioca, (C) Raízes tuberosas (Mandioca)

As pesquisas com a mandioca e seus subprodutos têm aumentado nos últimos anos em decorrência da facilidade de cultivo, adaptabilidade a diversos tipos de solo, resistência a

períodos de estiagem com expressiva produção, além da possibilidade de utilização da sua parte aérea como fonte de proteína de baixo custo. Por ser adaptável a diversos tipos de clima e solo, a mandioca é cultivada em várias regiões do mundo. A Nigéria, o Brasil e a Tailândia são os países que dominam a produção mundial. A produção Africana não tem caráter comercial; ao contrário, apresenta-se como de subsistência. No Brasil, segundo maior produtor, coexiste a produção de subsistência e a comercial, ambas destinadas ao mercado interno. Já na Tailândia a produção da mandioca tem caráter comercial e de exportação. A cultura da mandioca tem papel importante na alimentação humana; é fonte geradora de emprego e de renda para agricultores familiares e consumidores de baixo poder aquisitivo, sobretudo nas regiões mais pobres do país (Pestana & Castro, 2015).

5.2 Cultivo e uso da mandioca em Moçambique e no Mundo

Cerca de 80% dos Moçambicanos dependem da agricultura para a sua subsistência, e o sector agrícola continua a ser a chave para o crescimento social e económico. Moçambique foi classificado como o 8º (oitavo) maior produtor de mandioca no mundo e o 5º (quinto) entre Países africanos. Em 2011, a área total cultivada foi estimada em 5.632.781 hectares, aproximadamente 2.425.240 hectares (43%) da área total cultivada foi utilizada para a produção de mandioca (Salvador *et al.*, 2014).

Em 2012 a produção de mandioca tinha atingido cerca de 10.05 milhões de toneladas. O solo e o clima em Moçambique influenciam o cultivo. Nove milhões de toneladas de peso fresco é a produção anual de mandioca, com um consumo de 85 kg/pessoa/ano (Salvador *et al.*, 2014).

Em geral, a mandioca é o alimento básico ao longo do litoral e é principalmente consumida em quatro das dez províncias de Moçambique: Nampula, Zambézia, Cabo Delgado e Inhambane. Das mais de 1.2 milhões de famílias na população rural que afirmam que a mandioca é sua principal cultura alimentar, a maior parte (aproximadamente 43%) vive em Nampula (McSween *et al.*, 2006).

Em termos de produção, a província da Zambézia é a maior produtora seguida de Nampula e Cabo Delgado (Chimuca, 2014).

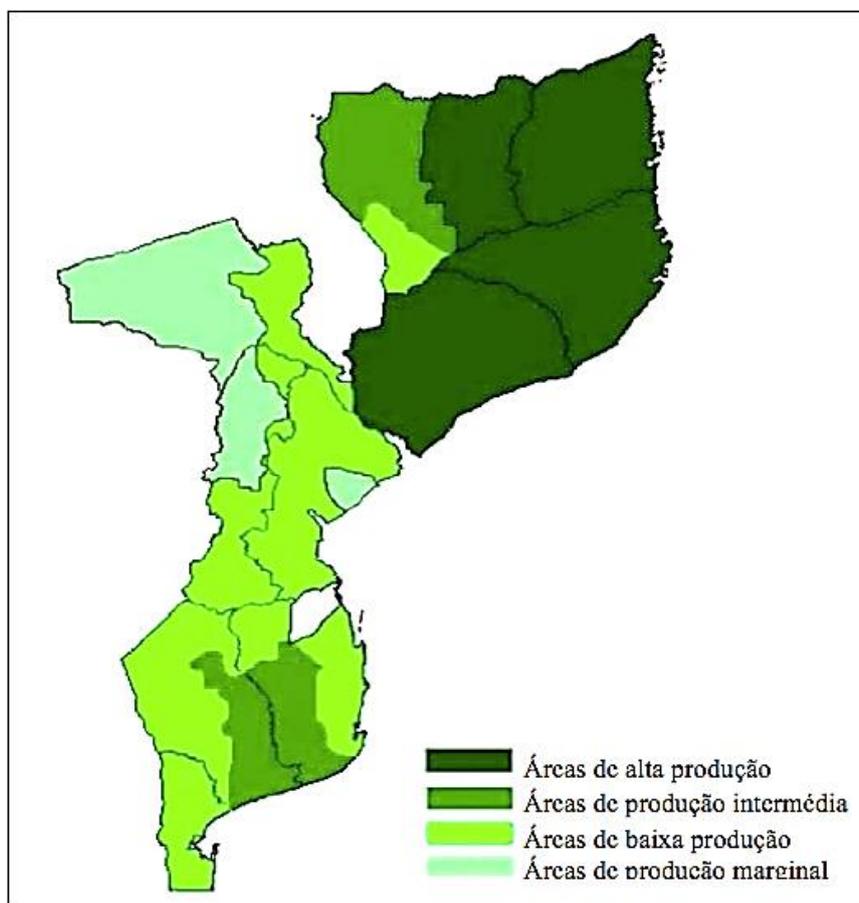


Figura.2 – Produção da mandioca em Moçambique.

Fonte: Adaptado de Salvador *et al.* (2014).

A produção mundial de mandioca em 2002 foi de 184.8 milhões de toneladas cultivadas em 17,3 milhões de hectares. O continente africano deteve 54,5% da produção mundial com a Nigéria, maior produtor mundial, participando com 18,7%. A Ásia foi responsável por 27,2% da quantidade produzida no mundo, sendo a participação da Indonésia e da Tailândia de 9,1% cada uma. A América do Sul produziu 17,2% do total mundial, com a participação do Brasil de 12% (Filho & Alves, 2004).

Em 1980, a produção mundial foi de 122,1 milhões de toneladas, e o Brasil, o maior produtor, participou com 24,6 milhões de toneladas (20,1% de participação). Em 22 anos

(1980-2002), a produção no mundo aumentou em 51,0% e o Brasil passou a ser o segundo maior produtor, com 22,99 milhões de toneladas (Filho & Alves, 2004).

Uso da mandioca é frequente, independentemente do contexto sócio-económico e cultural. São várias as razões que explicam este fenómeno. Em primeiro lugar, a ralagem, fermentação e/ou secagem das raízes frescas é necessária para reduzir os elevados níveis de toxicidade das variedades amargas. Em segundo lugar, tais práticas prolongam o período de conservação da mandioca, expandindo assim as opções de consumo e comercialização. Em terceiro lugar, através do processamento acrescenta-se valor ao produto e reduz-se o seu peso e volume, tornando mais fácil e barato o transporte das zonas de produção até aos centros de consumo. Por último, a transformação da mandioca em diversos produtos possibilita uma diversificação da dieta alimentar, de acordo com os hábitos e preferências da população (Wandschneider & Barca, 2003).

5.3 Principais variedades (cultivares) de mandioca

A qualidade culinária de raízes frescas é um parâmetro importante na seleção de variedades de mandioca de mesa também conhecida como mandioca mansa ou doce. A identificação dessa qualidade envolve factores variados e complexos, por constituir-se de um conjunto de características físicas, químicas e sensoriais, algumas das quais são determinadas objetivamente, como teores de cianeto, amido e fibra, tempo de cocção e, outras, subjetivamente, como sabor, consistência e textura da polpa cozida. A expansão do mercado de mandioca de mesa, no entanto, depende de variedades que apresentem boas qualidades culinárias, baixa toxicidade cianogénica e resistência à deterioração pós-colheita (Vidigal Filho *et al.*, 2000). São exemplo, algumas destas as variedades:

- Amansa burro, Canário, Caiabana, Três meses, Arizoninha branca, Aipim abacate, Caravela, Cachoeiro, Franco Rabelo, Matrincha, Saracura, Maragogipe, Manso, Taquari Cabocla, Arrebenta burro, Sabará, Manteiga, Cenoura rosada.

5.3.1 Variedade cultivadas em Moçambique

As principais variedades de mandioca em Moçambique incluem:

- Nikwala, Calamidade, M`pacua, Massuruma, Nivalapua, Namacarolina, Buana, Nacuali , N`lapa, Tomo, Carita, Taliana, Guerra, Namuiche, Mphovatacua e muitas outras.

5.4 Processamento e consumo da mandioca

A forma como a mandioca é consumida varia de país para país e em diferente regiões geográficas. Em Moçambique, no norte do país a mandioca é consumida principalmente na forma de farinha cozida na preparação de uma papa (caracata – em Nampula). Nesta região, o consumo da mandioca na forma seca representa cerca de 21% do total, sendo que 8% da mandioca é consumida na forma fresca (Salvador *et al.*, 2014 citando Donovan *et al.*, 2011 e Hagglades *et al.*, 2012). A mandioca é ainda usada na indústria de produção de bebidas (Wandschneider & Barca, 2003), particularmente cerveja, sendo que em 2018, cerca de 6.000 produtores estavam envolvidos na produção de mandioca para esta finalidade.

Na região centro do país a mandioca é consumida essencialmente na forma fresca ou cozida em diversos pratos tradicionais representando cerca de 30%, enquanto o consumo de mandioca seca está na ordem de 9% (Tivana *et al.*, 2009).

No sul de Moçambique, particularmente na província de Inhambane, são vários os usos dados à mandioca. A mandioca é consumida fresca, cozida ou assada, particularmente as variedades doces, uma vez que apresentam um baixo nível de toxicidade. A mandioca doce é também consumida na forma de chiguinha, sendo que nestes casos as raízes são cortadas em pedaços pequenos e cozidas juntamente com cacana ou feijão nhemba.

Outra forma de consumo da mandioca no sul de Moçambique é na forma de rale. Neste caso as variedades amargas são sujeitas a formas mais elaboradas de processamento a fim de reduzir os elevados níveis de cianeto e as raízes amargas são também conhecido como tapioca. O processamento de rale a partir das variedades doces é menos frequente. Rale não é

mais do que mandioca ralada, fermentada, prensada e torrada. Serve normalmente como acompanhamento para a matapa – folhas de mandioca cozidas ou outro caril, sendo também consumido com chá. Por vezes adiciona-se água quente e açúcar e algumas famílias juntam um pouco de rale com arroz. A preparação de rale a partir das variedades doces é pouco frequente.

Embora a cultura de mandioca esteja muito disseminada nesta região, a preparação e consumo de pratos de mandioca seca não faz parte da dieta tradicional. Contudo, há relatos do uso da mandioca na produção de chips de mandioca que podem ser adicionados ao milho e mapira durante a pilagem ou moagem destes cereais.

5.4.1 Consumo das folhas de mandioca (matapa)

As folhas da mandioca são usadas para preparação de um prato bastante apreciado no sul de Moçambique, particularmente na província de Inhambane. Depois de piladas e cozidas com diversos ingredientes, as folhas são consumidas, normalmente acompanhando arroz, farinha de milho cozida ou rale.

As folhas verdes de mandioca têm mostrado características favoráveis como fonte de proteínas na dieta humana, podendo ser utilizada para combater a desnutrição e para os animais, na produção de rações mais nutritivas.

Alguns estudos tem estado a investigar a possibilidade de utilização folhas de mandioca como uma alternativa aos alimentos convencionais, uma vez que seu teor em proteínas, vitaminas e minerais é relativamente alto, quando comparado com outros vegetais incluindo hortaliças folhosas e grãos de cereais (Modesti *et al.*, 2007).

Sabe-se no entanto que apesar do elevado teor de proteínas nas folhas de mandioca, a sua digestibilidade é baixa, o que pode ser atribuído aos altos níveis de fibras e de polifenóis. Uma das soluções que tem sido investigadas é a possibilidade de produção dum concentrado protéico de folhas de mandioca, permitindo a sua utilização como alimento, uma vez que o

processo reduz o teor de fibras e melhora a qualidade nutritiva. Diversos são os estudos para desenvolver um processamento ideal para extração de proteínas das folhas de mandioca, com consequente obtenção de um concentrado protéico, praticamente sem fibras (Tangka, 2003; Fasuyi, 2005).

Para além da alimentação humana na forma fresca, as partes aéreas da mandioca despertam interesse ainda pelo facto de apresentam boas características de fermentação, sendo utilizadas na forma seca (mufusa), particularmente no interior da província de Inhambane, bem como como na forma de silagem para alimentação animal (Faustino *et al.*, 2003; Pinho *et al.*, 2004; Falkenberg *et al.*, 2005) e possuem ainda elevado teor protéico, comparável ao da alfafa e maior teor de carboidratos não-fibrosos em relação à gramíneas (Carvalho & Kato, 1987; Faustino *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2006).

5.5 Aspectos nutricionais e antinutricionais da mandioca

A composição nutricional das folhas de mandioca varia muito em função da sua qualidade e quantidade e pode ser decorrente de variedade, além de outros factores como clima, fertilidade do solo, idade da planta e relação proporcional entre folhas e talos (Bohnenber, 2008).

Tabela.1: Composição nutricional do tubérculo e das folhas de mandioca

Componente (Composição aproximada em 100g)	Unidade	Tubérculo	Folhas
Energia	kJ	526 - 611	209 - 251
Energia	g	45.9 - 85.3	64.8 - 88.6
Humidade	g	29.8 - 39.3	19 - 28.3
Proteína	g	0.3 - 3.5	1.0 - 10.0
Lípidos	g	0.03 - 0.5	0.2 - 2.9
Carboidratos totais	g	24.3 - 35.7	7 - 18.3
Fibre	g	0.1 3.7	0.5 - 10.0
Cinza	g	0.4 1.7	0.7 - 4.5
Vitaminas			
Tiamina	mg	0.03 - 0.28	0.06 - 0.31
Riboflavina	mg	0.03 - 0.06	0.021 - 0.74
Niacina	mg	0.6 - 1.09	1.3 - 2.8
Ácido ascórbico	mg	14.9 - 50	60 - 370
Vitamina A	µg	5.0 - 35.0	8300 - 11800
Minerais			
Cálcio	mg	19 - 176	34 - 708
Fósforo total	mg	6 - 152	27 - 211
Ca/P		1.6 - 5.48	2.5
Ferro	mg	0.3 - 14.0	0.4 - 8.3
Potássio	%	0.25 - 0.72	0.35 - 1.23
Magnésio	%	0.03 - 0.08	0.12 - 0.42
Cobre	ppm	2.00 - 6.00	3.00 - 12.0
Zinco	ppm	14.00 - 41.00	71.00 - 249.00
Sódio	ppm	76.00 - 213.00	51.0 - 177.00
Manganês	ppm	3.00 - 10.00	72.0 - 252.0

Salvador *et al.*, 2014.

É possível classificar as variedades de mandioca quanto a sua toxicidade. As variedades são classificadas em bravas e mansas. Todavia esta classificação somente é válida para a polpa das raízes porque é a parte comestível mais importante e, dessa forma, sua utilização tem o objetivo de oferecer apenas uma indicação sobre possibilidades de intoxicação.

A cultura da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) destaca-se pelo seu valor nutricional, rusticidade, alta produtividade e grande difusão no país. Tradicionalmente cultivada em países de clima tropical, a mandioca tem suas raízes empregadas na alimentação humana e animal (Pestana & Castro, 2015).

Todavia, as folhas de mandioca apresentam algumas substâncias consideradas antinutritivas, como cianeto, taninos, nitrato, ácido oxálico, saponinas, hemaglutinina e inibidores de tripsina (Correa *et al.*, 2004; Wobeto, 2003).

No reino vegetal, mais de 2.000 espécies têm a capacidade de produzir glicosídeos cianogênicos que ao sofrerem hidrólise liberam HCN, um composto nocivo à saúde animal. Os glicosídeos cianogênicos têm sido constatados em plantas de muitas famílias, entre elas: - as *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Gramíneae*, *Araceae*, *Passifloraceae* e *Euforbiceae* (Amorin *et al.*, 2006).

As folhas de mandioca frescas contêm glicosídeos cianogênicos, linamarina e lotaustralina que, ao sofrerem hidrólise, libertam ácido cianídrico, tóxico aos seres humanos. Essa libertação é causada pela acção da enzima linamarase em plantas cujos tecidos foram danificados mecanicamente ou quando a integridade fisiológica é perdida, como no caso de murchecer das folhas, ou pela acção da beta glicosidase no trato digestivo de animais (Agostini, 2006).

Há uma variação muito grande nas concentrações, sendo que o potencial cianogênico da maioria das variedades de mandioca varia de 15 a 400 mg de HCN/kg de polpa crua, no entanto é perfeitamente possível encontrar variedade com teor tão baixo quanto 10 mg de HCN/kg ou variedades que apresentem valores próximos a 2.000 mg de HCN/kg (Otsubo *et al.*, 2002).

Entre outras funções, os compostos cianogênicos produzidos pela mandioca podem ser considerados como parte dos mecanismos de defesa desenvolvidos pela espécie, ao longo de sua evolução, contra pragas e moléstias. Assim, enzima e substrato devem estar separados de alguma forma, possivelmente pela membrana celular, e só entram em contato, libertando

HCN, através da ruptura da mesma, como ocorre com uma picada de inseto ou outra causa qualquer.

Uma característica química muito importante dos glicosídeos é a facilidade com que se hidrolisam. Através desse tipo de reacção liberta-se o açúcar e a cianidrina. Essa por sua vez, degrada-se originando o ácido cianídrico que é o responsável pela toxicidade do composto.

1ª fase

Linamarina		acetona
Ou	 linamarase	glicose cianidrica
Lotautralina		

2ª fase

Acetona	 hidroxinitriloliase	HCN Acetona
cianídrica		

A concentração de ácido cianídrico é mais elevada nas folhas do que na raiz da mandioca, havendo formas de reduzir de maneira significativa o teor dessas substâncias, envolvendo algumas técnicas. A desidratação, o cozimento e a trituração das folhas constituem algumas das técnicas que podem ser usadas para reduzir o teor de cianeto, tornando as folhas de mandioca em produto de baixa toxicidade (Agostini, 2006).

Processos de desintoxicação mais usuais para utilização mais segura como alimento, são obtidos através da simples fragmentação e secagem do material, volatilizando o HCN. A desintoxicação da planta também pode ser feita através de outros processos, como fermentação (promove o contato enzima-substrato), prensagem e lavagem (glicosídeos cianogénicos são solúveis em água) e pelo calor. Nesse último caso, o composto cianídrico é degradado e libera o radical cianeto a temperaturas acima de 180°C. Na fabricação de farinha ou outros derivados, pela acção desses factores (enzima, prensagem, lavagem e calor), o produto final é quase isento de HCN, apresentando riscos de intoxicação reduzido.

O cozimento não é um bom processo de desintoxicação, porque a temperatura de cocção é suficiente para inativar a enzima, mas é insuficiente para degradar o substrato. Assim, parte

dos glicosídeos cianogénicos ficam na mandioca cozida e parte na água de cocção, devido a sua solubilidade. Por essa razão, a água de cocção da mandioca deve ser sempre eliminada na preparação dos alimentos.

O glicosídeo cianogénico sozinho parece que não tem efeito tóxico sobre os animais. Todavia, sua ingestão poderá libertar HCN no organismo através de outras vias, como a ácida (ácido clorídrico do aparelho digestivo) ou enzima exógena (outras plantas ingeridas cruas). Nesse caso, é praticamente impossível determinar a quantidade de HCN que pode ser liberada.

A questão da intoxicação fica mais complexa porque não depende somente da quantidade de HCN efetivamente absorvida pelo organismo. Depende também de seu peso vivo e da sua capacidade de desintoxicação. O HCN actua principalmente no sistema respiratório, e como o peso vivo correlaciona-se com o volume de sangue conclui-se que animais menores são mais vulneráveis a uma mesma dose de HCN. Por outro lado, o cianeto absorvido pode ser eliminado pelo organismo. A via metabólica mais importante é a da enzima rodanase que catalisa a reação do cianeto com um aminoácido sulfurado, produzindo tiocianato que é eliminado pela urina naturalmente. Organismos bem nutridos são menos sujeitos à intoxicação pela maior disponibilidade de aminoácidos sulfurados (Otsubo et al., 2002).

A utilização direta da parte aérea fresca constitui a maneira mais simples e econômica de se fornecer aos animais, pois o processo se limita a fragmentação e a secagem da mesma. recomendam que o fornecimento da folhagem fresca somente possa ser feito de 12 a 24 horas depois da colheita, para reduzir o princípio tóxico a níveis seguros, no caso de espécies com níveis um pouco mais altos de ácido cianídrico (Pestana & Castro, 2015).

Do consumo de alimentos de origem vegetais, como as folhas, o ácido fítico do ponto de vista antinutricional, deve-se principalmente a sua capacidade de formar complexos com cálcio, ferro, zinco, cobre e magnésio no alimento “in natura” e no trato gastrintestinal, diminuindo assim a sua biodisponibilidade (Agostini, 2006).

As propriedades antinutricionais dos taninos são numerosas; os taninos ingeridos podem afectar a composição da microflora bacteriana inibindo a produção de enzimas digestivas da

mesma; os produtos metabólicos podem ser absorvidos provocando toxicidade nos tecidos; e impedindo desta forma a sua ação sobre os substratos alimentícios(Agostini, 2006).

As Saponinas como substância antinutricional, tem a ação sobre membranas celulares que pode alterar a permeabilidade ou até mesmo levar à destruição. Relacionadas com essa ação sobre membranas, estão as actividades hemolíticas(Catejon, 2011).

As lectinas também recebem o nome de hemaglutininas, principalmente por ocasionar aglutinação dos eritrócitos. Agem ligando-se as membranas das células e alterando sua função biológica. São proteínas que possuem em suas moléculas um centro activo específico à combinação com carboidratos, prejudicando o processo de absorção de nutrientes, causando ruptura de membranas e degradação de microvilos, com conseqüente lesão epitelial(Júnior *et al.*, 2010).

Os inibidores de proteases são constituídos pelo inibidor de tripsina e pelo inibidor de tripsina e quimotripsina. Estes anti-nutrientes apresentam especificidade de inibir as enzimas proteolíticas e, conseqüentemente, reduzem a digestão protéica de alimentos proporcionando diminuição no ganho de peso e crescimento dos animais((Júnior *et al.*, 2010).

6. Materiais e métodos

6.1 Colheita do material botânico

As folhas frescas de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) variedade munhaça, uma variedade de mandioca mansa, foram colhidas no mês de outubro de 2017 numa área de cultivo aleatoriamente seleccionada da Estação Agrária de Umbeluzi no Distrito de Boane, província de Maputo. Esta estação pertence ao Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), instituição subordinada ao Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural. O distrito de Boane, faz fronteira com o distrito de Moamba a norte, a oeste e sudoeste com o distrito de Namaacha, a sul e sudoeste com o distrito de Matutuine e a leste com o município da Matola.

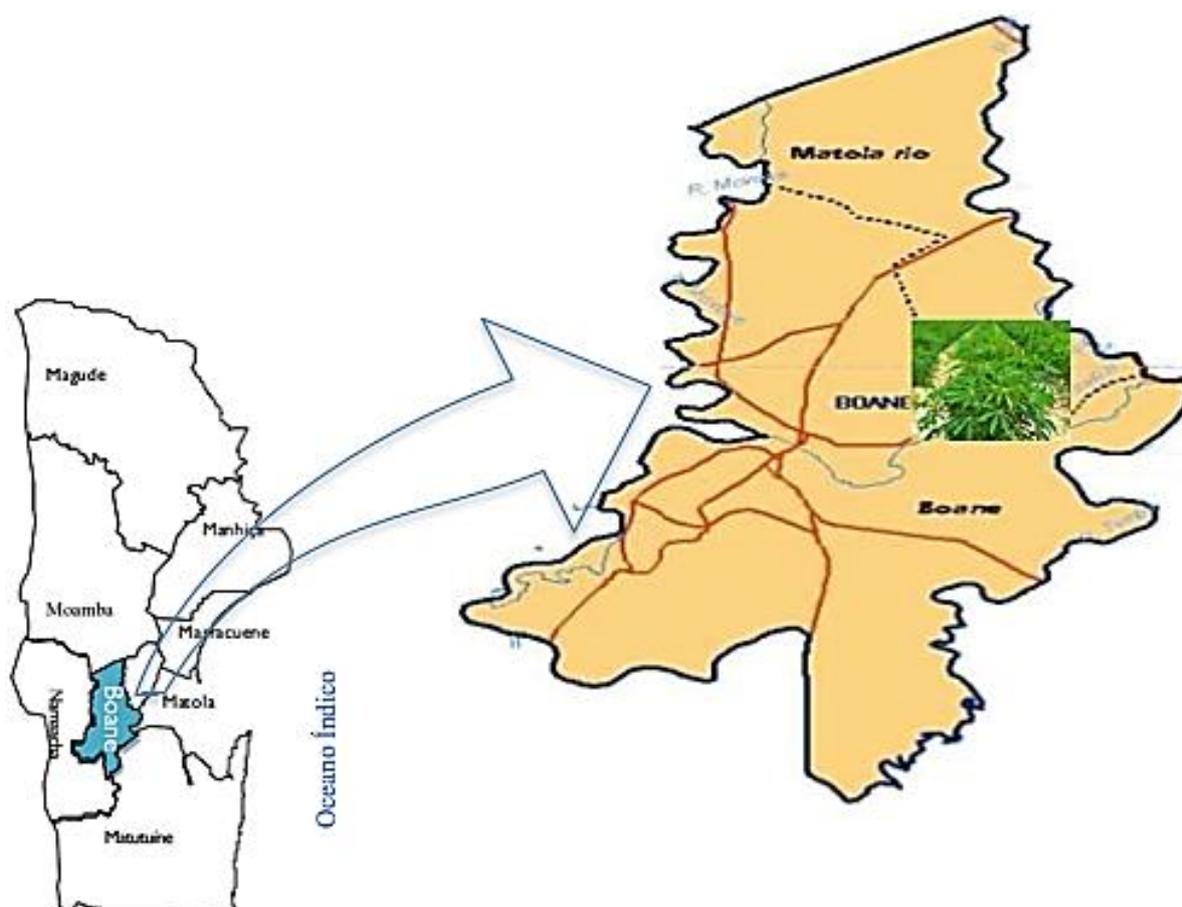


Figura.3 – Localização geográfica do distrito de Boane e indicação do local de colheita de amostras de material botânico

O clima da região é sub-húmido e com deficiência de chuva na estação fria, caracterizado por alternância entre as condições secas. A temperatura média anual é de 23,7°C verificando-se que os meses mais frios são os de junho e julho e os mais quentes janeiro e fevereiro.

As folhas foram colhidas de mandiocueiras que tinham aproximadamente 14 meses, entre as 7:00 e 8:00 horas da manhã e eram transportadas em sacos plásticos para a Faculdade de Engenharia (FAENG) da Universidade Eduardo Mondlane (UEM) para o devido processamento imediato.

6.2 Preparação do suco de folhas frescas de mandioca

O suco das folhas frescas de mandioca foi preparado no Laboratório de Alimentos da FAENG, UEM. Após lavagem em água corrente e depois de escorrer completamente a água corrente, as folhas foram trituradas num liquidificador (Philips Walita Viva Problend RI2134). De seguida foram adicionados diferentes volumes de água destilada para preparação de diferentes sucos conforme descrito abaixo.

Suco 1: 100 mg de folhas frescas de mandioca trituradas em 100 ml de água.

Suco 2: 100 mg de folhas frescas de mandioca trituradas em 200 ml de água.

Suco 3: 100 mg de folhas frescas de mandioca trituradas em 300 ml de água.

Suco 4: 100 mg de folhas frescas de mandioca trituradas em 400 ml de água.

Suco 5: 100 mg de folhas frescas de mandioca trituradas em 500 ml de água.

De seguida as preparações foram filtradas em papel de filtro Whatman GR 40 125mm e mantidas numa geleira a uma temperatura média de 4,5 °C durante o uso ou por um máximo de cinco dias antes do uso.

Para avaliação da toxicidade aguda do suco de folhas frescas de mandioca, foi preparado um suco concentrado, pesando 300 mg de folhas frescas de mandioca previamente lavadas em água corrente, depois de escorridas, trituradas e comprimidas para obtenção do suco. O suco preparado foi mantido numa geleira a uma temperatura média de 4,5 °C e usado no mesmo dia ou, no máximo, no dia seguinte.

6.3 Animais em experiência

Foram utilizados murganhos BALB/c, machos, adultos, adquiridos no Biotério da Direcção de Ciências Animais (DCA) do IIAM. Os animais tinham massa corporal entre 22,7 e 41,1g de peso vivo.

Para realização dos ensaios, os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 6 animais cada, mantidos em gaiolas plásticas com dimensões de 21 x 38 x 15 cm ou gaiolas metálicas de 11 x 30 x 13 cm (Largura x Comprimento x Altura), forradas com cerradura de madeira (cama) no fundo.

Os animais foram mantidos sob ciclos de 12 horas de luz e escuridão, tendo livre acesso a ad libitum (pellets de ração A2 da Higest) e água em garrafas-bebedouros plásticos graduados colocados na parte superior das grades metálicas das gaiolas (Figura 4).



Figura.4: Gaiola plástica com grade metálica e garrafa-bebedouro plástico graduado.

Tabela.2: Composição nutricional da dieta padrão (ração A2 tipo *pellets*) administrada aos murganhos

Nutriente	Conteúdo (%)
Proteína	18,0
Gordura bruta	4,5
Fibra bruta	5,0
Cinzas	5,0

6.4 Administração do suco de folhas frescas de mandioca

Todos os animais foram pesados individualmente antes da realização de qualquer tratamento. Por forma a replicar a via de administração utilizada no ser humano, o suco fresco das folhas frescas de mandioca bem como os fármacos de controlo foram administrados nos murganhos por via oral, por meio de gavagem usando seringas plásticas de 1 ml e uma agulha de ponta romba.

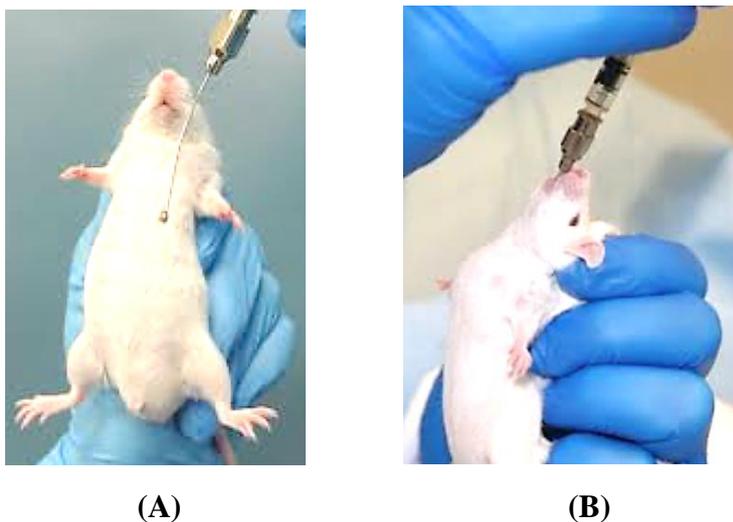


Figura.5: (A) – Murgancho e agulha de ponta romba usada para administração de tratamentos por via oral. (B) – Administração do suco de folhas de mandioca por gavagem em murgancho.

Devido ao tamanho pequeno dos animais, implicando uma capacidade reduzida do estômago dos animais, o volume total de suco administrado a cada animal variou entre 0,1 e 0,2 ml tendo sido em função da dose a administrar e do peso corporal do animal.

6.5 Análises bioquímicas e fisiológicas

As análises bioquímicas e fisiológicas foram realizadas na Secção de Farmacologia e Toxicologia da FAVET, UEM, no Laboratório de Bioquímica do Hospital Escolar Veterinário (HEV) e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Mavalane.

6.6 Equipamento utilizado

Foi utilizado diverso equipamento de ponta para análises de diferentes parâmetros bioquímicos e fisiológicos dos animais incluindo:

- Uma balança analítica Sartorius Me
- Um termómetro digital WT-1
- Uma Centrífuga Hettich EBA 3S
- Um analisador automático para Bioquímica(ABX- Pentra 400 HORIBA Medical)
- Um analisador automático de hematologia Mindray BC-3000 Plus.

6.7 Avaliação de toxicidade aguda do suco de folhas frescas de mandioca

Para realização de ensaios de toxicidade aguda do suco das folhas frescas de mandioca, três murganhos com massa variando de 22.7 a 41.1g foram aleatoriamente seleccionados e mantidos em gaiolas de ensaio para aclimatização durante 5 dias antes da administração de qualquer substância. De seguida procedeu-se ao ensaio de toxicidade aguda de acordo com o guião 423 da OECD, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, Guideline 423 (OECD, 2001).

Os três animais seleccionados foram tratados conforme ilustrado na tabela abaixo.

Tabela.3: Tratamento de murganhos para ensaios de toxicidade aguda do suco de folhas frescas de mandioca

Grupo de tratamento	Número de animais	Dose diária (mg/Kg)	Via de administração
Suco de ffm	3	300	Oral
Controlo	3	H ₂ O	Oral

Todos os animais foram administrados suco concentrado de folhas frescas de mandioca conforme apresentado na tabela acima, numa única dose e de seguida observados para verificação de eventuais sinais de intoxicação.

A observação para detecção de sinais de intoxicação foi feita regularmente em intervalos de tempo pré-definidos sendo imediatamente após a administração do suco, bem como aos 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h após a administração e de seguida, diariamente, durante 14 dias. Na observação eram verificados sinais que incluíam a presença ou não de alterações

respiratórias, digestivas e neurológicas incluindo: actividade geral, irritabilidade, resposta ao toque ligeiro, resposta ao aperto da cauda, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus do corpo, ataxia, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, cianose, hiperemia ou morte.

Após o 14º dia, os animais foram sujeitos a uma colheita de sangue através duma punção na cauda, sendo colhido sangue em tubos capilares para análises laboratoriais hematológicas e bioquímicas.

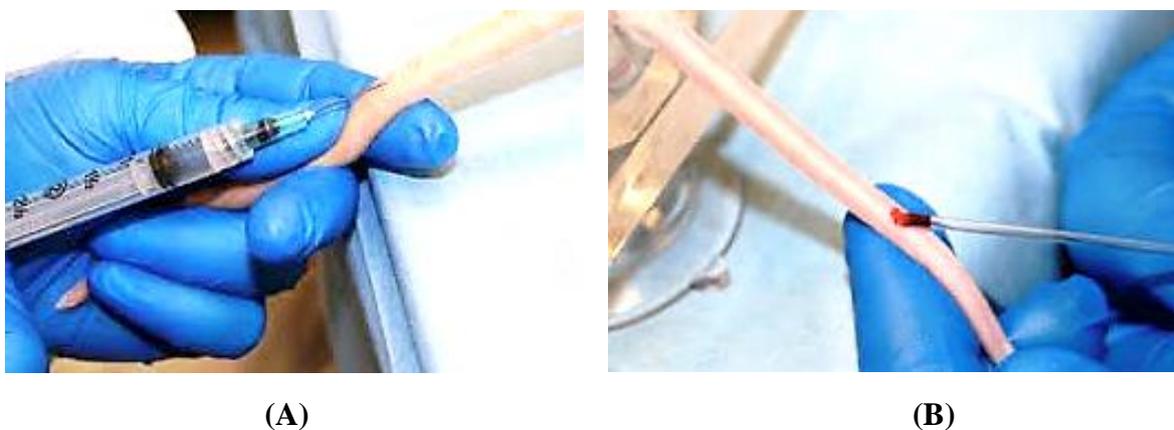


Figura.6: (A) – Punção cauda para colheita de sangue de murganho. (B) – Colheita de sangue em tubo capilar microhematócrito para análises hematológicas de toxicidade aguda do suco de folhas frescas de mandioca.

6.8 Avaliação da toxicidade subaguda do suco de folhas frescas de mandioca

Um total de 36 animais foram distribuídos em seis (6) grupos de seis (6) animais cada, devidamente identificados e administrados sucos de folhas frescas de mandioca ou sulfato ferroso como controlo, conforme ilustrado na tabela 4. Os animais foram mantidos em gaiolas que permitiam monitorar parâmetros alimentares como o consumo de água e de ração.

Cinco (5) grupos foram tratados com suco das folhas frescas de mandioca, diariamente, por via oral, nas manhãs, durante um período de trinta (30) dias, nas doses de 0.6, 0.8, 0.9, 1.6 e

3.1mg/Kg de peso vivo. O grupo de controlo, grupo VI foi tratado com sulfato ferroso em igual período que os restantes grupos, na dose de 0,5mg/kg.

Para escolha das doses de folhas frescas de mandioca foi levada em consideração uma estimativa da quantidade diária utilizada empiricamente pela população, em função da quantidade recomendada para consumo das mulheres grávidas. O mesmo princípio foi considerado para os animais do grupo de controlo visto que para o sulfato ferroso a toma recomendada para uma mulher adulta (aproximadamente 60Kg) é de 2 x 10 ml/dia de solução de FeSO₄, o equivalente a 100 mg de ferro elementar.

Tabela.4: Tratamento de murganhos para ensaios de toxicidade subaguda durante 30 dias

Grupo de tratamento	Nº Animais	Dose diária (mg/Kg)	Via de administração
Suco 1	6	3,1	Oral
Suco 2	6	1,6	Oral
Suco 3	6	0,9	Oral
Suco 4	6	0,8	Oral
Suco 5	6	0,6	Oral
FeSO₄	6	0,5	Oral

Semanalmente os murganhos eram pesados individualmente e em função da alteração do peso do animal, fazia-se o ajuste do volume do suco ou sulfato ferroso a administrar de modo a assegurar administração duma dose constante ao longo do tempo.

Os efeitos da administração prolongada do suco fresco das folhas de mandioca foram avaliados e monitorados através de parâmetros hematológicos e bioquímicos bem como o consumo de água dos animais, peso e actividade motora.

Após o período de observação, os animais foram submetidos a uma eutanásia com clorofórmio e foram realizados exames macroscópicos dos órgãos, comparados os resultados

dos diferentes grupos tratados com suco de folhas frescas de mandioca com os dados obtidos do grupo controle.

6.9 Análises laboratoriais

Para análises hematológicas, a colheita das amostras de sangue foi feita em tubos Vacutainer® com anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetracético (EDTA). Para determinação dos parâmetros enzimáticas foram usados tubos com gel separador microtainer Becton Dickson para a obtenção do soro.

6.9.1 Parâmetros hematológicos

As análises hematológicas foram realizadas num analisador celular automático (Mindray BC-5390, Auto Hematology Analyser) e consistiram de estudo de eritrócitos (eritrograma), leucócitos (leucograma) e contagem de plaquetas. No eritrograma foi realizada a contagem de hemácias ou eritrócitos, determinação do hematócrito (Hct), da Hemoglobina (Hb), do Volume Corpuscular Médio (VCM), e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). No leucograma realizou-se a contagem de leucócitos e diferenciação celular.

Para os exames bioquímicos foram utilizados o soro do sangue dos animais num analisador ABX Pentra-400. O exame bioquímico de sangue consistiu em análises de Ureia, Creatinina e Transaminases: Aspartato Amino-Transferase (AST) e Alanina Amino- Transferase (ALT).

6.9.2 Monitoria da temperatura

A temperatura do biotério foi medida usando um termómetro digital modelo WT-1. Este parâmetro era medido uma vez ao dia, nas manhãs no período em que decorria a medição de todos parâmetros e a colheita de amostras nos animais.

6.9.3 Consumo de água e alimento nos murganhos

A água potável (corrente) encontrava-se em garrafas plásticas graduadas colocadas na parte superior das grades metálicas das gaiolas, sendo trocada diariamente e registado o consumo diário pelos animais.

O consumo de ração (pellets A2 da Higest) foi igualmente monitorado diariamente através duma estimativa por observação da quantidade restante da gaiola em relação à quantidade administrada no dia anterior.

6.10 Análises estatísticas

Para análise estatística foram usadas como variáveis, os resultados dos níveis de hemoglobina e os testes bioquímicos ALT, AST, Ureia e Creatinina.

Assim, com vista à comparação da média de Hemoglobina e dos resultados bioquímicos obtidos dos 6 tratamentos foi usado um modelo de regressão linear misto para cada variável resposta, onde os tratamentos e o tempo (em dias) foram incluídos como efeitos fixos e cada animal como efeito aleatório.

Uma estrutura de regressão foi aplicada para a matriz de covariâncias das variáveis resposta, dada a correlação dos valores em cada unidade experimental (animais) ao longo do tempo, e assumindo também que observações próximas obtidas no tempo são mais correlacionadas que aquelas obtidas em tempos distantes (Littell *et al.*, 1998).

Toda inferência estatística foi realizada com um nível de significância de 5%, e comparado com valores de p dos testes estatísticos.

7. Resultados e discussão

7.1 Avaliação da toxicidade aguda (dose única)

Os testes de toxicidade aguda fornecem dados sobre o início, a natureza e a intoxicação associada à morte proveniente de uma exposição a uma substância estudada num período de tempo de vinte e quatro horas (Goloni *et al.*, 2006).

A avaliação de toxicidade aguda é uma metodologia amplamente empregue para verificar e classificar substâncias quanto à capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos, em altas doses, especialmente lesões anatomo-patológicas e letalidade, e podem oferecer contribuição para estabelecer parâmetros de segurança juntamente com outros dados de toxicidade para a saúde humana. Quanto aos vegetais este método é útil para identificar a toxicidade que o vegetal a ser investigado possa apresentar e com isso minimizar a possibilidade de desconhecimento na população em acreditar que produtos naturais são desprovidos de efeitos tóxicos ou adversos (Cunha *et al.*, 2013).

Na avaliação da toxicidade aguda, segundo o guia de orientação 423 da OECD, devem ser usados três animais aos quais passo a passo devem ser administrados doses iniciais de substância em investigação nos níveis de 5, 50, 300 mg/Kg, podendo-se ir até 2000 mg/kg de peso vivo.

Quando não existe qualquer informação sobre a substância a ser testada, por razões de protecção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300mg/Kg (Santos, 2015). Entretanto o uso da sequência das quatro doses acima indicadas só é obedecida caso se observar morte de mais de 1 animal com a dose escolhida. Dependendo da mortalidade ou do estado moribundo dos animais, outras doses intermediárias podem ser necessárias para que se impute um critério da toxicidade aguda da sustância teste (OECD, 2001).

Neste estudo, o suco das folhas frescas de mandioca administrado a murganhos numa dose de 300 mg/Kg não causou a morte de nenhum animal transcorridos 14 dias após a administração, tendo por isso não sido extendido o periodo de obervação conforme indicado

no guia de orientação 423 da OECD (OECD, 2001). Adicionalmente, nenhum sinal de toxicidade foi verificado nos animais durante o tempo de observação.

Vale notar no entanto que durante os primeiros 15 minutos de observação verificou-se leve sonolência dos animais, tendo posteriormente normalizado. Provavelmente esta sonolência deve-se a concentração de substâncias antinutritivas encontrados nos diferentes sucos em particular os cianetos que tem ações em outros locais particularmente no sistema nervoso central. Tal como foi reportado por (Deus, 2011) uma das descrições do envenenamento humano provocado por composto cianogénico foram confusão mental, paralisia muscular.

É necessário reforçar que a realização de exames hematológicos e bioquímicos é de suma importância para pesquisadores que realizam ensaios para comprovação de toxicidade de plantas. Os resultados podem revelar se a toxicidade pode ser aguda, subaguda ou crônica pela análise da gravidade das lesões dos tecidos (aumento exacerbado nos níveis das enzimas) e pelo tempo decorrido da experiência, mesmo sem haver o aparecimento de sinais (Costa, 2011).

Na avaliação do parâmetro hematológico quando os animais são tratados com uma dose única (300mg/Kg) os níveis médios de hemoglobina aumentaram ao longo do tempo nos dois grupos de tratamentos embora esse aumento mostra que não houve diferença significativa entre os níveis médios de hemoglobina dos grupos tratados com ffm e o grupo controle entre o dia zero(0) e 14 dias do tratamento (veja anexo, tabela.1).

Segundo Azeredo (2008), o fígado é um órgão muito susceptível a agressões químicas que podem resultar em processos inflamatórios ou necrosante. Algumas enzimas que podem ser utilizadas como indicadores de injúria hepática são a alanina-aminotransferase (ALT) também denominada transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), aspartato-aminotransferase (AST) também denominada transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO), gama-glutamiltransferase (GGT) também denominada gama-glutamilpeptidase (GGP) e fosfatase alcalina (ALP).

Na avaliação macroscópica dos animais sacrificados e sujeitos a necrópsica, não foram observadas quaisquer alterações nos órgãos e tecidos internos dos animais.

Nas análises hematológicas dos animais foi observado que os níveis médios de hemoglobina aumentaram transcorridos os 14 dias, conforme ilustrado na tabela 5.

Tabela 5 – Valores de hemoglobina em murganhos tratados com dose única de 300 mg/Kg de suco de folhas frescas de mandioca e observados durante 14 dias

Tratamento	Níveis de hemoglobina (g/L)			
	Dia 0		Dia 14 ^o	
	Média	σ	Média	σ
300 mg/Kg ffm	131,00	30,61	138,67	13,61
Controlo	109,00	86,97	151,00	18,08

Comparando os resultados dos diversos parâmetros hematológicos ALT, AST, Creatinina e Uréia deste grupo de avaliação de toxicidade aguda com o grupo de controlo verifica-se que os animais administrados o suco apresentaram valores de hemoglobina mais díspares no dia zero (0) do que no 14^o dia pós-tratamento. Entretanto, para ambos os grupos, os níveis médios para ALT, AST, Creatinina e Ureia diminuíram ao longo do tempo (Figura 7, gráficos A-D).

A conformidade entre os resultados do grupo tratado com suco de folhas frescas de mandioca com os resultados do grupo de controlo sugere a ausência de toxicidade aguda do suco de folhas frescas de mandioca quando administrado na dose de 300 mg/Kg numa dose única.

Entretanto, a diminuição dos níveis de ALT no grupo tratado com suco de folhas de mandioca foi menos acentuada do que no grupo de controlo. A menor variação dos níveis desta enzima nos animais tratados comparativamente ao grupo de controlo pode dever-se ao stress de extensão dos músculos dos animais a que foram sujeitos durante a manipulação para administração do suco de folhas frescas de mandioca, tal como foi reportado em seres

humanos por Narjes e Nehmiz (2000) que observaram que indivíduos saudáveis expostos a exercícios de extensão muscular tendiam a manter níveis elevados de ALT em relação a indivíduos sem exercícios.

Em contraste, os níveis de creatinina dos animais tratados com suco de folhas frescas de mandioca numa dose única de 300 mg/Kg diminuíram de forma mais acentuada em relação ao grupo de controlo durante os 14 dias de observação, facto que pode igualmente dever-se ao nível de exercício a que os animais tratados estiveram expostos uma vez que sabe-se que a diminuição dos níveis de creatinina estão geralmente relacionados com distrofia muscular, deficiente funcionamento do fígado e perda excessiva de água (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000; Zhang *et al.*, 2015; Thongprayoon *et al.*, 2016.).

No caso em apreciação descarta-se a possibilidade de disfunção hepática uma vez que nenhum sinal que geralmente acompanha a disfunção hepática foi observado nos animais tratados. O metabolismo possui mecanismos de defesa, um desses mecanismos é a presença da enzima rodanase na maioria dos tecidos animais. A enzima converte a maior parte de cianeto em tiocianato que é excretado na urina. Esta conversão é um sistema de detoxificação que ocorre no metabolismo animal (Lopes, 2001).

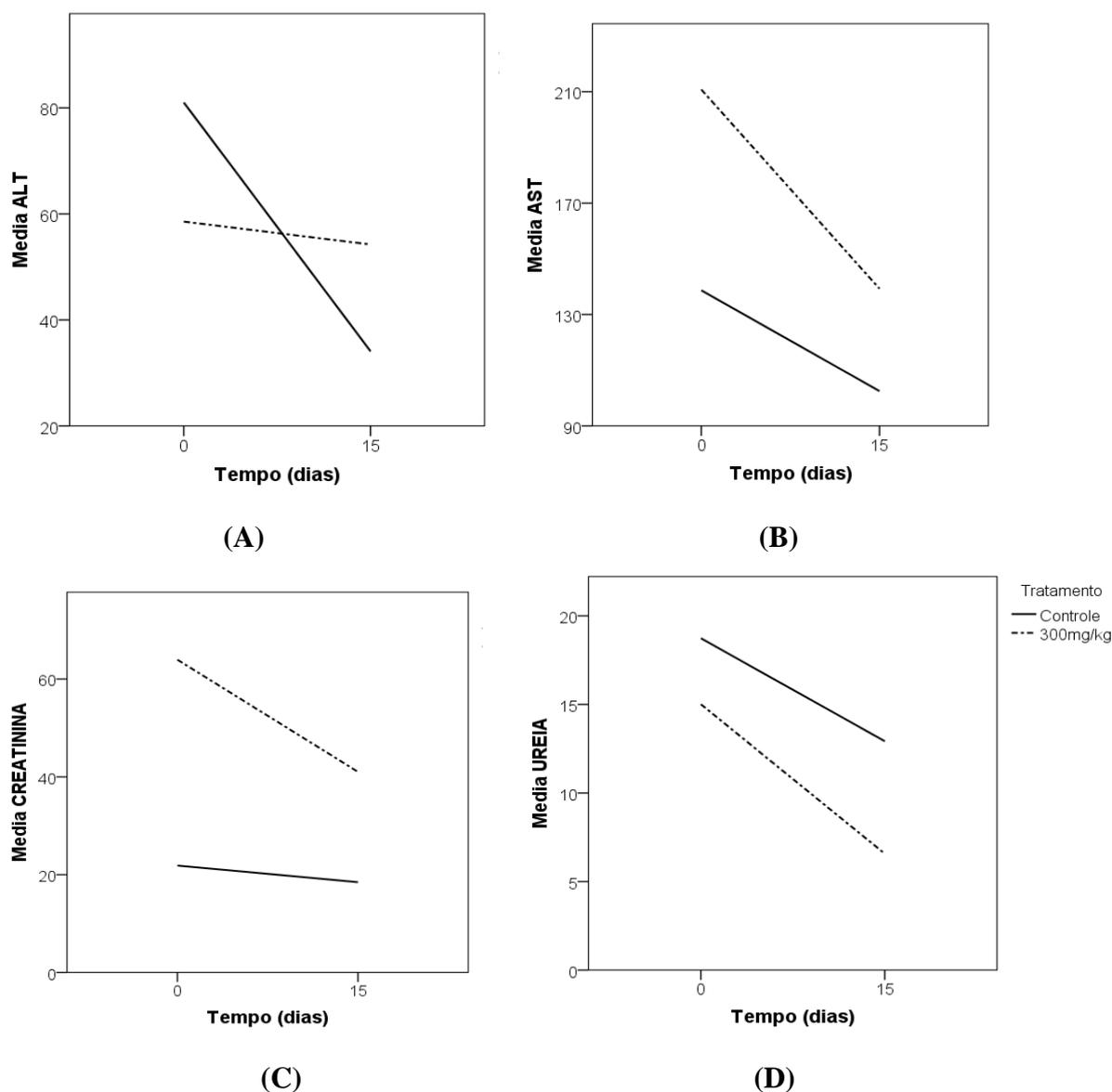


Figura 7: Variação dos níveis de ALT (A), AST (B), Creatinina (C) e Ureia (D) durante 14 dias em animais administrados 300 mg/Kg de extracto de folhas frescas de mandioca.

Em relação à variação do peso dos animais ao longo do período de observação, observou-se um ganho médio de peso dos animais tratados com 300 mg/Kg do suco de folhas frescas de mandioca comparado com os animais do grupo de controlo (Figura 8). A alteração do peso corporal é um parâmetro utilizado como indicador de efeitos adversos de drogas e substâncias químicas. Assim sendo, nenhum sinal de toxicidade foi notório que sugere o contrário.

O grau da lesão hepática provocada por injúria química ou biológica pode variar, podendo levar a alterações leves das enzimas sem desenvolvimento de sintomas clínicos, até casos mais graves de insuficiência hepática aguda ou crônica. De acordo com (Jesus *et al.*, 2014) medicamentos e toxinas podem ser convertidos em formas inativas através de reações que ocorrem no fígado ou até mesmo ativados ou convertidos a produtos tóxicos pela transformação hepática. Através dessa transformação, as drogas se tornam mais solúveis podendo ser excretadas pelos rins ou bilis.

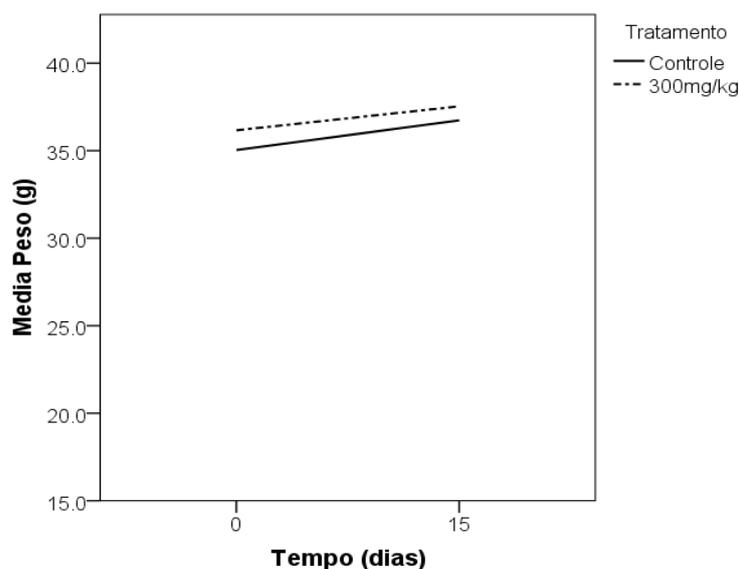


Figura 8: – Variação do peso dos animais tratados com 300 mg/Kg de suco de folhas frescas de mandioca durante 14 dias de observação.

7.2 Avaliação da toxicidade subaguda

7.2.1 Determinação dos níveis de hemoglobina

Os ensaios de toxicidade subaguda referem-se aos efeitos nocivos cumulativos decorrentes de uma exposição repetida, de preferência por via oral, num período limitado de tempo (Goloni *et al.*, 2006).

Neste estudo, em relação ao parâmetro hemoglobina, observou-se que os níveis médios aumentaram ao longo do tempo nos grupos que receberam o tratamento com suco 3, suco 5 e sulfato ferroso, tendo-se observado uma redução nos grupos tratados com os sucos 1, 2 e 4. Esta redução dos níveis de hemoglobina nos sucos deve-se a facto de substâncias antinutritivas encontradas nas folhas frescas de mandioca como:

- Hemaglutininas, ligam-se a certos carboidratos. Devido a esta propriedade podem ligar-se a certos componentes das membranas dos eritrócitos provocando hemaglutinação.
- As saponinas, podem desorganizarem as membranas dos eritrócitos, o que pode levar a hemólise das mesmas e conseqüente redução dos níveis de hemoglobina.
- Os taninos e os fitatos, possuem efeito inibitório do ferro não-heme. Razão contrária nos animais tratados com o suco(5) com menor quantidade destas substâncias antinutricionais (devido a maior adição de água neste suco), registaram aumento contínuo dos níveis de hemoglobina desde o início até ao fim do estudo.

Tabela.6: Valores de hemoglobina em murganhos tratados com diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca e observados durante 30 dias.

Tratamento	Níveis de hemoglobina (g/L)					
	Dia 0		Dia 15 ^o		Dia 30 ^o	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ
Suco 1	140,33	15,27	122,83	23,77	135,80	16,75
Suco 2	149,50	10,13	142,33	14,01	136,17	5,56
Suco 3	138,50	18,71	136,67	6,98	143,60	29,84
Suco 4	140,67	11,69	133,33	11,79	139,80	15,11
Suco 5	144,107	26,19	146,17	6,97	152,00	21,06
(FeSO ₄)	119,67	14,22	140,50	11,38	140,33	9,29

Na avaliação do parâmetro hematológico quando os animais são submetidos a ensaios toxicológicos subagudo por via oral, foi detectado aumento nos níveis médios de hemoglobina nos grupos que receberam tratamento com os sucos 3, 5 e com sulfato ferroso durante o período de estudo (Tabela 6). Apesar desses aumentos de valores médios nos tratamentos acima descritos, as diferenças não se mostram significativas nos vários tratamentos assim como ao longo do tempo (veja anexo, tabela 2)

Níveis mais altos de hemoglobina foram observados no grupo do tratamento 5 em comparação a todos os grupos que foram administrados suco de folhas frescas de mandioca. Em relação a este grupo, os dados evidenciaram um aumento de aproximadamente 14 unidades comparado ao grupo controle (veja anexo, tabela.3).

Tanto o grupo administrado sulfato ferroso como o grupo tratado com o suco 5 registraram aumento de hemoglobina desde o início até o fim da experiência.

7.2.2 Determinação dos níveis de enzimas hepáticas

Quanto às enzimas hepáticas, no estudo de toxicidade subaguda mostrou-se que os parâmetros enzimáticos nos animais em estudo apresentaram alterações evidenciadas pelo aumento das enzimas ALT nos grupos que receberam tratamento com os sucos 1 e 2, diminuição para os grupos de tratamento com os sucos 3, 4, 5 e o grupo sulfato ferroso.

O parâmetro ALT é considerado um indicador altamente sensível de dano hepatocelular e, dentro de certos limites, pode fornecer uma taxa quantitativa do grau de danificação sofrido pelo fígado (Melo *et al.*, 2005).

Dessa forma, o aumento apenas na actividade das enzimas para os grupos acima descrito deve-se provavelmente a uma lesão dos hepatócitos destes animais. Pode ser que os taninos tenham contribuído para maior actividade da enzima ALT, facto confirmado por (Melo *et al.*, 2008) ao obter aumento da actividade enzimática de ALT significativo para o grupo que recebeu dose 1,5g de taninos por kg/peso corporal. Os autores concluíram que saponinas tem

um impacto directo sobre as funções do fígado. Possivelmente a exposição prolongada de cianetos também contribui para o mesmo efeito hepatotóxico.

Segundo Pinto (2013) a actividade elevada de ALT ocorre em doenças hepatobiliares. No dano hepatocelular leve há também aumento dessas enzimas o que sugere que a administração do suco das ffm por ser de menor diluição nos primeiros dois grupos levou a um incremento da actividade enzimática tecidual associado ao aumento da síntese da enzima no tecido de origem enquanto para os restantes grupos foi reduzindo pelo factor inverso. Esse incremento pode ser provavelmente pelo facto de nesses grupos, elementos antinutricionais estarem num nível de concentração também maior, o que pode desencadear maior probabilidade de lesões ou danos das células hepáticas no fígado.

Os valores médios para a actividade das enzimas AST evidenciaram uma redução apenas para os animais do grupo que recebeu o tratamento com o suco 5 e do grupo tratado com sulfato ferroso. Portanto, tal dado pode sugerir que tanto ao tratado com sulfato ferroso assim como aos animais tratados com o suco ffm do grupo 5 não induziram alteração nas concentrações plasmáticas destas enzimas enquanto os do grupo 1, 2, 3 e 4 evidenciaram um aumento da actividade enzimática.

De acordo com Benevides *et al.* (2011), outros métodos utilizados no processamento de alimentos também podem reduzir as concentrações dos factores antinutricionais tais como:

- adição de água ao alimento;
- maceração na presença de sulfitos;
- trituração;
- tratamento enzimático;
- alta pressão hidrostática, dentre outros.

A água, além de lixiviar substâncias, pode também facilitar a acção de outras substâncias na redução de factores antinutricionais. Naves *et al.* citado por (Benevides *et al.*, 2011), diz que a enzima responsável pela degradação do substrato glicosídeo cianogénico é hidrolítica e, desta forma, necessita da presença da água para actuar.

A enzima AST é encontrada em maior quantidade nas mitocôndrias, cerca de 80% e não é libertada tão rapidamente como a ALT que é uma enzima puramente citosólica (Melo *et al.*, 2005).

A AST está também presente num grande número de tecidos, no miocárdio, músculo esquelético, rim e cérebro mas de uma forma geral em virtude da sua ampla distribuição não tem sido rotineiramente utilizada como parâmetro laboratorial em ratos. Seus valores normais não diferem significativamente com a idade ou sexo dos animais mas seus níveis elevam-se na ocorrência de oclusão arterial aguda proporcionalmente ao grau de isquemia. Em caso de dano muscular severo, a persistência de altos níveis de AST indica dano tecidual irreversível. Em congestão hepática por problemas cardíacos, seus níveis apresentam-se elevados devido ao fígado congestionado (Alves, 2007).

Alves (2007) indica que em fase inicial, a lesão hepática pode ser detectada a partir do aumento dos níveis de enzimas hepáticas no sangue. Esse aumento pode ser devido a necrose celular ou pelo aumento de permeabilidade da membrana celular.

Em relação ao grupo tratado com o sulfato ferroso, os resultados da AST assim como o da ALT, mostraram uma redução ao longo do tempo. Resultado similar foi observado para o grupo que recebeu o tratamento suco 5 de folhas frescas de mandioca. Nos grupos do tratamento 1 e 2 com suco de ffm, os resultados evidenciaram um aumento da ALT e AST respectivamente.

Ainda em relação às enzimas, para os grupos 3 e 4, os resultados da ALT mostraram ser inversamente proporcionais aos da AST. A presença de elevados níveis de enzimas AST no plasma pode provavelmente ser indicativo de lesão hepática grave. Quanto maior for o nível de AST/ALT, maior é a gravidade da lesão (Lora, 2007). Com o elevado consumo e o período prolongado da ingestão de cianetos contidos nas folhas frescas de mandioca, pode ser que o suco tenha provocado alterações das enzimas AST numa resposta inflamatória tóxica.

Os resultados da creatinina do dia zero (0) até ao fim da experiência (trinta dias depois) mostraram uma redução em todos os grupos de tratamento com excepção do grupo 5 que mostrou uma discrepância comparados aos restantes.

Os resultados de uréia mostraram uma redução em todos os tratamentos ao longo do período da experiência. A ureia do organismo é proveniente da ingestão alimentar, na sua maioria sendo formada no fígado e excretada pelo rim. Os factores que provavelmente podem ser considerados como responsáveis por estes resultados em murganhos são:

- Baixa absorção do intestino ou por incapacidade do fígado de metabolizar a proteína, como na insuficiência hepática;
- Desnutrição.

Alterações dos níveis de creatinina podem ser indicativo de disfunção renal. A diminuição da filtração glomerular de forma geral, leva ao aumento das concentrações plasmáticas de creatinina e uréia. Em ratos, níveis plasmáticos alterados para uréia não são bons indicadores de lesão renal mas alterações na creatinina podem ser um indicador confiável para avaliar a presença da lesão, pois seu nível sérico não é influenciado pela dieta, idade ou sexo (Alves, 2007).

O nível de uréia serve para o estabelecimento de diagnóstico na distinção entre várias causas da insuficiência renal, não é tão específica como a creatinina (principal indicador da função renal). Observa-se elevação dos níveis de creatinina no sangue apenas quando há lesão aos néfrons funcionais (Teixeira *et.al.*, 2009).

Segundo Costa (2011), grande parte dos danos causados por intoxicações acometem o fígado, coração e rins. Assim, o aumento dos níveis das enzimas, encontradas no interior das células destes tecidos, mostrará a existência de lesão e o tecido acometido.

Os parâmetros ALT, AST, creatinina e uréia observaram uma redução ao longo do tempo (Tabela 7) quando diferentes doses do suco de folhas de mandioca foram administrados, durante um período relativamente longo (30 dias),

Os resultados do parâmetro AST mostraram, em média, um aumento ao longo do tempo, excepto nos casos em que os animais receberam o tratamento controlo com sulfato ferroso e ainda o tratamento com o suco 5, onde os valores reduziram de 280,96 para 149,3 e de 208,8 para 196,1 g/L respectivamente (Tabela 7)

Tabela.7: Variação dos níveis de ALT, AST, Creatinina e Uréia durante 30 dias de administração de diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca

Parâmetro	Tratamento	Dia 0		Dia 15°		Dia 30°	
		Média	σ	Média	σ	Média	σ
ALT (U/L)	Suco 1	39,20	11,82	60,72	18,82	55,19	8,68
	Suco 2	32,35	7,73	26,61	7,25	37,96	19,40
	Suco 3	40,93	7,28	32,50	6,21	34,48	20,90
	Suco 4	65,22	17,32	39,92	7,79	59,50	11,12
	Suco 5	82,51	34,12	47,08	17,36	35,62	26,08
	FeSO ₄	53,86	22,54	38,24	14,10	45,29	7,33
AST (U/L)	Suco 1	123,90	21,52	263,78	52,10	393,72	307,20
	Suco 2	90,65	22,45	108,26	21,32	176,48	139,35
	Suco 3	112,46	23,09	94,55	21,99	230,01	31,56
	Suco 4	212,55	48,53	175,40	38,80	239,08	34,21
	Suco 5	208,78	144,27	129,49	45,35	196,08	131,05
	FeSO ₄	280,96	184,67	183,35	46,55	149,30	80,90
Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)	Suco 1	79,23	9,48	15,83	2,99	4,14	2,57
	Suco 2	78,63	18,66	17,82	5,20	8,55	9,07
	Suco 3	77,95	4,39	11,37	7,29	6,33	9,12
	Suco 4	84,05	34,07	17,22	5,27	9,36	5,00
	Suco 5	35,15	10,46	19,12	2,70	224,15	7,98
	FeSO ₄	79,70	29,11	11,38	5,97	11,32	9,80
Ureia (mmol/L)	Suco 1	18,10	3,78	12,15	1,64	11,97	1,35
	Suco 2	21,91	12,11	14,39	2,82	11,75	5,64
	Suco 3	16,80	3,28	12,96	2,99	9,92	6,53
	Suco 4	17,22	4,74	12,78	1,21	15,02	2,46
	Suco 5	13,72	2,63	14,02	4,04	12,69	4,12
	FeSO ₄	16,48	3,82	14,82	2,32	12,59	5,98

Em relação ao peso dos animais tratados com diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca, como observado no gráfico acima (Figura 9), verificou-se um aumento do peso médio em cada grupo até ao 13^o dia, seguindo-se uma notória diminuição até o 22^o dia, tendo novamente voltado a aumentar para os animais que receberam tratamento com o suco 5. Estes grupos (tratamento com sulfato ferroso e com o suco de folhas frescas de mandioca na dose 0,6 mg/Kg, tratamento 5) mostraram um aumento contínuo do peso dos animais até ao último dia da experiência sugerindo a ocorrência dum efeito similar entre a administração de sulfato ferroso e suco de folhas frescas de mandioca na dose de 0,9 mg/Kg correspondente ao tratamento 3.

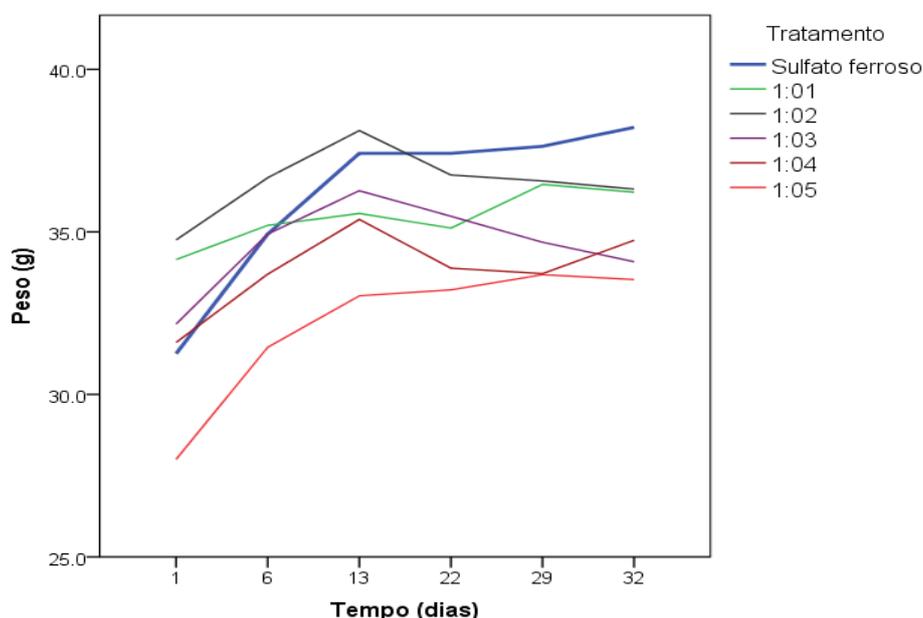


Figura 9 – Variação do peso dos animais tratados com diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca durante 30 dias.

7.3. Consumo de água dos murganhos

O consumo médio de água foi bastante variável em todos grupos ao longo dos 30 dias de observação tendo o grupo administrado o suco 4 apresentado maior consumo de água. Os resultados obtidos sobre o consumo de água não demonstram qualquer tendência clara e por conseguinte não permitem fazerr qualquer avaliação sobre o efeito da ingestão do suco de

folhas frescas de mandioca sobre este parâmetro particular, não demonstrando igualmente qualquer relação com sinais de toxicidade da planta nos animais.

Tabela 8: Valores de consumo de água por animais tratados com diferentes doses de suco de folhas frescas de mandioca durante um período de 30 dias.

Tratamento	Consumo de água (ml)	
	Média	σ
Suco 1	35,78	11,78
Suco 2	39,84	11,81
Suco 3	31,16	9,10
Suco 4	45,63	12,62
Suco 5	23,59	5,27
FeSO ₄	34,47	8,91

7.4. Avaliação comportamental

Após a administração do suco das ffm em diferentes tratamentos foi evidente uma agitação dos animais, possivelmente resultante da manipulação uma vez que esse comportamento foi igualmente observado nos animais administrados sulfato ferroso, tendo normalizado passados cerca de 15 minutos.

7.5. Avaliação macroscópica de órgãos e tecidos

Todos os animais administrados suco de folhas frescas de mandioca para ensaio de toxicidade aguda na dose de 300 mg/Kg e intoxicação subaguda nas doses de 0.6, 0.8, 0.9, 1.6 e 3.1 mg/Kg, bem como os animais do grupo de controlo, administrados sulfato ferroso na dose de 0.5 mg/Kg foram submetidos à uma necropsia após colheita de sangue, com vista a detectar lesões macroscópicas em diversos órgãos, particularmente fígado, rins, pulmões, baço e coração. Das observações realizadas após o término do período de observação dos animais não foi detectada qualquer alteração macroscópica nos órgãos e tecidos em todos os animais submetidos necropsiados.

No entanto, ao longo da experiência foi notório o aparecimento de tumefações edematosa na região ventral do pescoço e na zona lateral da cabeça em dois murganhos tratados com o suco de folhas frescas de mandioca na dose de 3.1 mg/Kg de peso vivo. Na necrópsia dos dois animais sacrificados devido ao facto de apresentarem as lesões descritas, foi notório também o aparecimento de zonas de grande congestão dos vasos sanguíneos.

De acordo com Santos et al.(2008) em geral, edemas pode ocorrer por alterações de permeabilidade vascular, falha circulatória (aumento da pressão hidrostática) e hipoproteinemia por insuficiência renal, parasitoses ou má-nutrição. Recomenda-se que os clínicos levem em consideração essas possibilidades, ao realizar diagnóstico diferencial de insuficiência hepática.

Os principais sinais clínicos causados pela insuficiência hepática são icterícia, edema, hemorragias, fotossensibilização e encefalopatia hepática. O edema em animais ocorre principalmente nas partes de declive (regiões ventrais) do tecido subcutâneo, mas também em cavidades orgânicas, no mesentério e parede de algumas vísceras.

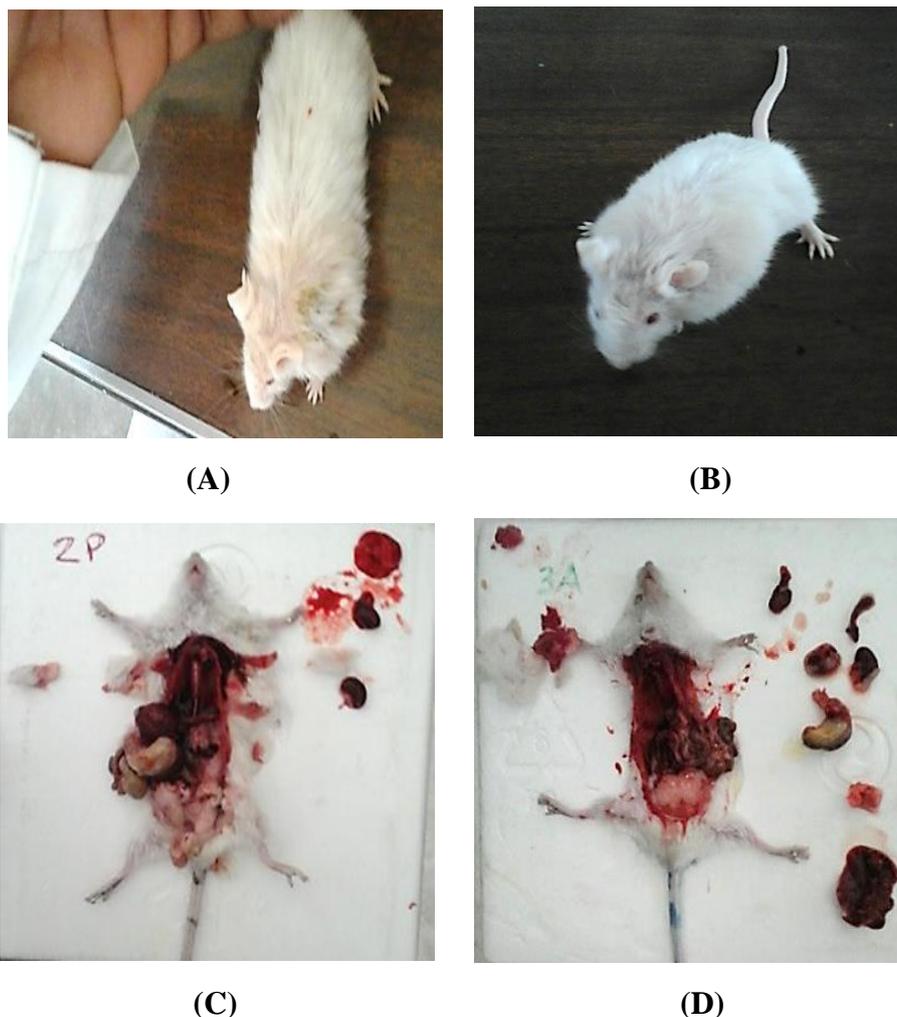


Figura 10: Fotografias de murganhos antes e depois de sacrificados humanamente para exame de lesões tumefacientes após administração de suco de folhas frescas de mandioca. (A) Animal com pêlo eriçado e tumefação na porção ventral do pescoço, (B) Animal com tumefação na parte lateral da cabeça; (C) e (D) Animais com incisão ventral longitudinal para exame macroscópico de órgãos e tecidos da cavidade abdominal e torácica.

A estimativa da segurança dos medicamentos e de produtos vegetais administrados por via oral é realizada em animais de experimentação, visando simular situação de uso/exposição humana. Uma boa correlação tem sido relatada entre roedores (ratos ou murganhos) e o ser humano, quanto ao uso nos animais experimentais, de doses elevadas ou limites e de doses próximas às de uso humano sendo, portanto, úteis na investigação dos efeitos agudos tóxicos (Cunha *et al*, 2013).

A finalidade deste estudo foi obter informações a respeito da toxicidade do suco de folhas frescas de mandioca quando administrado repetidamente ao indivíduo para efeito farmacológico.

A duração de exposição (30 dias) foi definida em função do que se pretende em termos de uso clínico das folhas de mandioca como suplemento nutricional de ferro. O estudo foi desenvolvido em conformidade com as diretrizes para estudos de Toxicidade Oral de Doses Repetidas de substâncias químicas (Azeredo, 2008), tendo possibilitado chegar a conclusões importantes.

8. Conclusões

O suco de folhas frescas de mandioca (*Manihot esculenta* Cruntz) promoveu alterações do perfil da actividade enzimática indicativas de uma possível acção sobre diversos órgãos, particularmente fígado e rins em murganhos administrados diferentes concentrações do suco ao longo de um período de 30 dias.

O aparecimento de alterações bioquímicas e lesões do tipo tumefações edematosas nos animais tratados por via oral demonstra que o suco de folhas frescas de mandioca é absorvido por esta via e interage com diversos órgãos.

O suco de folhas frescas de mandioca pode ser considerado que é particularmente tóxico quando administrado de forma repetida por via oral em murganhos, e quanto maior for a dose/quantidade, maior é a toxicidade.

A administração do suco em dose única não foram observados sinais de intoxicação nem morte de nenhum animal transcorridos 14 dias do estudo.

A ausência de alterações morfológicas nas células sanguíneas e na contagem das mesmas (resultas não exibidos), demonstra que o suco de folhas frescas de mandioca não causa quaisquer efeitos tóxicos na medula óssea e a homeostase do sistema circulatório.

Uma vez que não se observa uma variação significativa no consumo de ração, água, ganho de peso corporal dos animais tratados, conclui-se que o suco de folhas frescas de mandioca não causa qualquer efeito adverso sobre o parâmetro crescimento dos animais.

9. Recomendações

Recomenda-se que preparados de folhas frescas de mandioca sejam melhor estudados.

- Estudos toxicológicos pré-clínicos:

- Toxicidade crónica,
- Genotoxicidade, porque o suco de folhas frescas de mandioca é frequentemente consumido por mulheres gestantes como suplemento nutricional de ferro.

Dados os resultados obtidos neste estudo, levando o princípio da precaução, o consumo do suco de folhas frescas de mandioca não deve ser encorajado até que novos estudos de segurança sejam conduzidos e garantam seu uso adequado.

10. Constrangimentos e considerações finais

A avaliação do suco de folhas frescas de mandioca como suplemento nutricional de ferro por via da investigação da sua toxicidade aguda e subaguda e a influência que exerce no organismo sobre os níveis de ferro, medido através da concentração da hemoglobina é de suma importância para a saúde pública, uma vez que a planta é comumente utilizada pelas comunidades para o tratamento da anemia, sendo consumida na forma de suco das folhas trituradas e espremidas ou por via de mastigação directa das folhas.

O ensaio de toxicidade aguda numa dose única não revelou a presença de quaisquer sinais adversos do consumo do suco de folhas frescas de mandioca. No entanto, o teste de intoxicação subaguda, no qual o consumo do suco de folhas frescas de mandioca é realizado ao longo dum período de tempo relativamente longo demonstrou que a planta tem potencial para provocar intoxicação mesmo quando consumida em doses muito baixas, por via oral, o que demonstra a possibilidade de intoxicação por essa via comumente utilizada por seres humanos, particularmente mulheres grávidas.

Apesar de não terem sido observadas alterações macroscópicas hepáticas, renais, pulmonares ou do tracto gastrointestinal, a hiperémia e hemorragia verificadas, bem como as tumefacções observados ante-morte, determinaram um quadro de lesões agudas e subagudas de órgãos internos vitais. O aumento dos níveis de enzimas como ALT e AST ao longo do tempo de administração do suco de folhas frescas de mandioca confirma esta situação.

Para melhor entendimento do quadro de lesões que podem potencialmente resultar do consumo do suco de folhas frescas de mandioca, particularmente a nível do fígado, recomenda-se que preparados de folhas frescas de mandioca sejam melhor estudados, por exemplo avaliando os níveis de bilirrubina sérica (intoxicação por plantas hepatotóxicas), a determinação de metemoglobina sérica (intoxicação por plantas ricas em nitratos-nitritos) e de cálcio sérico (intoxicação por plantas ricas em oxalatos).

Deve-se ter em conta que, tal como apontam os resultados do ensaio de toxicidade subaguda, doses elevadas ou até mesmo baixas usadas diariamente pela população podem levar a intoxicação subcrónica, devido ao consumo constante por um tempo mais prolongado, podendo resultar em lesões graves que podem causar insuficiência hepática, renal, entre outras.

Uma das formas de determinação de dose segura para uso em humanos é baseada na determinação da dose do composto em avaliação, que não possui quaisquer efeitos tóxicos observáveis na espécie animal mais sensível testada em estudos toxicológicos pré-clínicos com duração de quatro semanas. Nesses ensaios usa-se No Observable Adverse Effect Level (NOAEL) ou seja o nível ou concentração na qual nenhum efeito adverso é observado na espécie mais sensível, conforme estabelecido por Reigner & Blesch (2002). A dose segura para seres humanos poderão ser estimada usando a fórmula $1/10 \times \text{NOAEL} \times 70 \text{ kg} \times 1/10$.

Os resultados alcançados neste estudo contribuem para informar e influenciar um uso seguro das folhas frescas de mandioca, quiçá outras partes da planta, uma vez que foi possível demonstrar que o suco de folhas frescas de mandioca provoca hepatotoxicidade e nefrotoxicidade discretas, por via oral.

Contudo, os efeitos do uso das folhas de mandioca como suplemento nutricional de ferro ou como fitoterápico na forma de outras preparações precisa ainda de ser estudados. É imperioso realizar estudos toxicológicos pré-clínicos incluindo estudos de toxicidade crónica e de genotoxicidade, esta última particularmente porque o suco de folhas frescas de mandioca é frequentemente consumido por mulheres gestantes como suplemento nutricional de ferro.

Em termos de constrangimentos enfrentados durante a realização das diversas fases do estudo, destaca-se:

- Dificuldade de aquisição de materiais para a pesquisa no mercado local tal como tubos Vacutainer® com EDTA, tubos capilares para microhematocrito sem heparina, cuvetes descartáveis, recorrendo ao meio exterior para adquir-los.

- Insuficiência de reagentes para análises hematológicas, tendo limitado o número de testes realizados apenas ao estritamente requerido para validade científica do trabalho;
- Limitado número de gaiolas, implicando a necessidade de realização do estudo num período de tempo mais longo para completar os diversos ensaios.

11. Referências

1. Agostini; R., Produção e utilização de farinha de mandioca comum enriquecida com adição das próprias folhas desidratadas para consumo alimentar, Goiânia, 2006.
2. Aletor, V. A., & Adeogun, O. A. Nutrient and antinutrient of some tropical leafy vegetables. Oxford, 1995.
3. Andrade, K. C. A fortificação de alimentos com ferro no controle da anemia ferropriva. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, ano II, n.3, 2004.
4. Alves; Nilda Maria, Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart), Brasília, 2007.
5. Amorim, S.L.; Medeiros, R. M. T.; Correa, F. R. ; Intoxicação de plantas cianogênicas no Brasil. Ciência animal, 16 (1): 17-26, 2006.
6. Azeredo, Flaubert Santana, Avaliação da toxicidade pré-clínica do latex e do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* pax, Goiânia, 2008.
7. Azevedo, E. B.; Nörnberg, J. L.; Kessler, J. D.; Brüning, G.; Bitencourt, D. D.; Falkenberg, J. R.; Chielle, Z. G. Silagens da parte aérea de diferentes cultivares de mandioca. Ciência Rural , v. 36, n. 6, 2006.
8. Benevides, Clícia Maria de Jesus; Souza, Mariana Vasconcelos; Souza, Raquel Dias Barros; Lopes, Mariângela Vieira Factores antinutricionais em alimentos: revisão. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, 18(2): 67-79, 2011.
9. Bohnenberg, L. Concentrado proteico de folha de mandioca como complemento alimentar para tilapias do Nilo, 2008.
10. Câmara, F. S., & Madruga, M. S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin and aflotoxin contents of a Brazilian multimistura preparation. Revista de Nutrição, 33-36, 2001.
11. Cambaza, E. M. The double burden of malnutrition since the beginning of the millennium in adults from Maputo City. PhD. Tesis, University of Western Australia, 2013.
12. Cançado, R. S. & Chiatton, C.S. Iron deficiency anaemia in the adult-causes, diagnosis and treatment. Rev.Bras.Hematol.Hemoter. 2010; 32(3):240-246.
13. Carvalho, V.D.; Kato, M.S.A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. Informe Agropecuário, v.13, n.145, p. 23-28, 1987.

14. Castejon, F.V. Taninos e Saponinas, Goiânia, 2011.
15. Chimuca, Jacob Fortuna José Avaliação de pragas e doenças na adaptabilidade e estabilidade de genótipos de mandioca no sul e centro do país, 2014.
16. Correa, A., Santos, S., Abreu, S., Jokl, L., & Santos, C. Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. Campinas, 2004.
17. Correa, A., Santos, C., Natividade, M., Abreu, C., Xisto, A., & Carvalho, V. Farinha de folhas de mandioca– efeito da secagem das folhas sobre a atividade da linamarase. Ciênc. Agrotec. , 368-374, 2002.
18. Costa, Thays Nascimento. Alterações hematológicas e bioquímicas séricas nas intoxicações de animais por plantas. Goiânia, 2011.
19. Cunha, Luis Carlos da; Melo, Dorca Fernandes dos Anjos; Pereira, Marcelo Elias; Melo, Davi de Souza; Parente, Leila Leal; Silva, Marina Alves Coelho; Conceicao, Edmilsom Cardoso da; Gonzaga, Lidiane Quirinoda Silva Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl(Tiliaceae) em camundongos e ratos, 2013.
20. Daniel, J., & Martins, A. Comparação dos teores de vitamina c e ferro de vegetais crus submetidos a diferentes métodos de cocção, 2006.
21. Deus, Gilciléia Inácio de; Efeitos da temperatura de secagem nos teores de compostos cianogênicos totais e fibra alimentarda casca de maracujá, Goiânia, 2011.
22. Donovan, C.; Haggblade, S.; Saigua, A. V.; Cuambe, C. ; Mudema, J.; Tomo, A. Cassava commercialization in Mozambique. MSU International development working. 2011
23. Falkenberg, J.R. Características fermentativas e bromatológicas de silagens da parte aérea de diferentes cultivares de mandioca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA , 42., Goiânia, 2005.
24. Fasuyi, O. A. Nutritional evaluation of cassava: (*Manihot esculenta* Crantz) leaf protein concentrates (CLPC) as alternative protein sources in rat assay Paskitan Journal of Nutrition, Faisalabad, v. 4, p. 50-56, 2005.
25. Faustino, J.O.; Santos, T.G.; Modesto, E.C. Efeito da silagem do terço superior da rama de mandioca triturada ou inteira e dos tempos de armazenamento. Acta Scientiarum, v. 25, n.2, p. 403-410, 2003.

26. Filho, M. B.; Ferreira, L. O. C. Prevenção e tratamento da anemia nutricional ferropriva: novos estoques e perspectivas. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro 12(3):411-415, jun-set., 1996.
27. Filho, Waldemar Pires de Camargo; Alves, Humberto Sebastião Produção e mercado de mandioca: análise de preços ao produto, SP, V.34, n.9, 2004.
28. Goloni, R.; Da Cunha, L. C.; Bozinis, M. C. V.; Garrote, C. F.; Tresvenzol, L.; De Paula., J. R.; Bara, M T.; Alves, N.; Vieira, M S.; Pucci, L. L.; Azeredo, F. S.. Estudo da toxicidade subaguda do *aspidosperma subincanum* Martius In: Congresso de pesquisa, ensino e extensão da UFG - conpeex, 3., 2006, Goiânia.
29. Grotto, H. Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. Campinas-SP.-Brasil, 2008.
30. Hagglades, S.: Cumbana, C.: Donovan, C. ; Droppimunn, K. ; Jirstrom, M. Cassava commercialization in southeasem Africa. *JADEE*. 2012.
31. Jesus, Gisleide Cardoso De; Sousa, Helio Henrique Barros Arruda De; Barcelos, Rejane Da Silva Sena. Principiais patologias e biomarcadores das alterações hepáticas.Goiânia, v. 41, n.3, p.525-537, 2014.
32. Júnior, D. M. De Lima; Monteiro, P. B. S.; Rangel, A. H. N.; Maciel, M. V.; Oliveira, S. E. O.; Freire, D. A. Factores anti-nutricionais para ruminantes. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, n.4, p.132-143, 2010.
33. Liabeuf, S., Gras, V., Moragny, J., Laroche, M.L., Andrejak, M.; French National Network of Pharmacovigilance Centers. Ulceration of the oral mucosa following direct contact with ferrous sulfate in elderly patients: a case report and a review of the French National Pharmacovigilance, 2014.
34. Littell, R. C.; Herry, P. R.; Ammerman, C.B.; Statistical Analysis of Repeated Measures Data using SAS procedures; *Journal of Animal Science* 76(4): 1216-31. 1998.
35. Lönnerdal, B., Zavaleta, N., Kusunoki, L., Lanata, C. F., Peerson, J.M. & Brown, K.H. Effect of postpartum maternal infection on proteins and trace elements in colostrum and early milk. *Acta Paediatr.* 85(5):537-42, 1996.
36. Lopes, A. M., Avaliação da dose letal oral (DL50) e efeitos metabólicos da linamarina extraída de mandioca, em ratos. Botucatu, SP, 2001.

37. Lora, J.; Avaliação da toxicidade hidroalcolico de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), Criciúma-SC, 2007.
38. Madruga, S., & Camara, F. S. The chemical composition of multimistura as a food supplement. Oxford, 2000.
39. Matos, Ana Laura de Siusa Avaliação de efeito toxicológico e comportamental de *Panax ginseng* A Meyer em ratos, Natal-RN, 2013.
40. McSween, S.; Walker, T.; Salegua, V.; Pitoro, R. Impacto económico de variedade à doença da podridão radical sobre a segurança alimentar no litoral de Moçambique, 2006.
41. Melo, D.; Farinha de folhas de mandioca:efeitos sobre a peroxidação e o perfil lipídico plasmático e hepáticos de ratos, 2005.
42. Melo, D. S. ; Corrêa, D.; Marcos, A.; Sousa, F. C.; Raimundo,V.; Abreu, C.M.; Santos, C.D.; Efeitos de farinha de folhas de mandioca sobre a actividade das enzimas AST, ALT, FA e lipídeos hepáticos de ratos wistar, Campinas, Brasil, 2008
43. Modesti, C. Obtenção e caracterização do concentrado protéico de folhas de mandioca submetido a diferentes tratamentos, 2006.
44. Modesti, C. F.; Corrêa, A. D.; Oliveira, E. D.; Abreu, C. P. M.; Santos, C. D.Caracterização de concentrado proteico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 3, p. 464-469, 2007.
45. Narjes H, Nehmiz G. Effect of hospitalisation on liver enzymes in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;56 (4):329-33.
46. OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method. [Acessado em 10 Julho 2015] em <http://www.oecd.org/publications>. Paris: Head of Publications Service.
47. Oliveira, J. D. De; Marchini, J. S. *Ciências Nutricionais: Aprendendo a Aprender*. 2 ed. São Paulo: SARVIER, 2008.
48. Otsubo, A. A.; Mercante, F. M. ; Martins, C.S. Aspectos do cultivo de mandioca em Mato Grosso, 2002.
49. Padjama, G. Evaluation of tecniques to reduce assayable tannins and cyanide in cassava leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 712-716, 1989.

50. Pereira, D. I., Couto, Irving S. S., Lomer, M. C. & Powell. J. J. A rapid, simple questionnaire to assess gastrointestinal symptoms after oral ferrous sulphate supplementation. 2014.
51. Pestana, Talita Carvalho; Castro, Gustavo Henrique Frias Potencial da rama de mandioca para uso na alimentação de ruminantes. PubVet Maringá, v.9, n.10, 457-466, Out., 2015.
52. Pinho, E.Z. et al. Fermentation and nutritive value of silage and hay made from the aerial part of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Scientia Agricola*, v.61, n.4, p.364-370, 2004.
53. Pinto, Juliana Tensol; Actividade farmacológica do extrato hidroalcolico dos frutos de *Hovenia dulcis* Thunberg E da dihidromiricetina na hipercolesterolemia induzida em ratos, Ouro-Preto/Minas Gerais-Brasil, 2013.
54. Ravindran, V. Cassava leaves as animal feed: potential and limitations. *Journal of the science of the food and agriculture*, 141-150, 1993.
55. Reed, J., McCowell, R., Van Soest, P., & Horvath, P. Condensed tannis: a factor limiting the use of cassava forage. *Journal of the science and food and agriculture*, 1982.
56. Reigner, B.G. & Blesch, K.S. Estimating the starting dose for entry into humans: principles and practice. *European Journal of Clinical Pharmacology*. n. 57, p. 835-845, 2002.
57. Salvador, E. M., Steenkamp, v., McCrindle, C. M. E. Production, conservation and nutritional value of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) in Mozambique: An overview. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*. 6(3), 29-38. 2014.
58. Santos, Jephesson Alex Floriano Dos Avaliação de estudos pré-clínicos de análogos sistólicos do Fenetil Ester do ácido caféico com potencial anti-tomural, João Pessoa-PB, 2015.
59. Santos, Julio Cesar A.; Riet-Correa, Franklin; Simões, Sara V.D. e Barros; Cláudio S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil, *Pesq. Vet. Bras.* 28(1): 1-14, janeiro 2008.

60. Silva, R. D. Determinação do teor de ferro de beterrabas adubadas com dois tratamentos diferenciados, pós-graduação, Universidade Tecnológica Federal de Parana, 2011.
61. Silva, P. Farmacologia. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 1994. 1450p.
62. Silva, A. P., & Camargos, C. N. Fortificação de alimentos: instrumento eficaz no combate a anemia ferropénica *Comun ciênc saúde*, 53-61, 2006.
63. Tangka, J. K. Analysis of the thermal energy requirements for the extraction of leaf protein concentrate from some green plants. *Biosystems Engineering*, San Diego, v. 86, n. 4, p. 473-479, 2003.
64. Teixeira, Lilian Tatiana de Araújo; Júnior, Silveira Lenilton da Silva; Queiroz, Fernando Marlisson de; Oliveira, Claudia Nunes de; Schwarz, Aline. Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais da *Hypericum perforatum* e da *Piper methysticum* em ratos, Natal, RN, Brasil, 2009.
65. Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Kashani K. Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in critically ill patients. *J Thorac Dis* (2016) 8:E305–11.10.21037/jtd. 2016.
66. Tiago; Amadeu da Barca; Processamento e comercialização da mandioca e batata doce no norte de inhambane: oportunidades de intervenção. Moçambique, 2003.
67. Tivana, L. D., Da Cruz, F. J., Bergenstahl, B., Dejmek, P. Cyanogenic potential of roasted cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots rale from Inhambane Province. *Czech. J. Food Sci.* 27:S378, 2009.
68. Vidigal Filho, P. S. et.al. Avaliação de cultivares de mandioca na região noroeste do Paraná. *Bragantina*, Campinas, V.59, n.1, p. 69-75, 2000.
69. Wanderschneider, T.; Barca, A. O processamento e comercialização da mandioca e batata doce no norte de Inhambane: oportunidade de intervenção. 2003
70. Wobeto, C. Nutrientes e antinutrientes da farinha de folhas de mandioca em três idades da planta, 2003.
71. Wyss, M., Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* (2000)80:1107–213.
72. Zhang H, Zhu Y, Sun Y, Liang Y, Li Y, Zhang Y, et al. Serum creatinine level: a muscular dystrophy. *Dis Markers*, 2015

Anexo

Tabela 1: Teste F e *p-value* para os efeitos fixos do modelo linear misto, e diferença de médias (erro padrão) entre *baseline* ou dia 0 e dia 14 depois em cada tratamento e respectivos *p-values*.

	Num	Den		
Efeito	DF	DF	F value	Pr > F
Dose	1	4	0.03	0.8818
Tempo	1	4	1.08	0.3575
Dose*Tempo	1	4	0.52	0.5124

- Da Tabela acima, pode-se concluir que não existem diferenças significativas entre os níveis médios de hemoglobina dos tratamentos aplicados e nem entre os níveis médios no *baseline* e 14 dias depois.

Tabela 2: Diferença de médias (erro padrão) entre *baseline* ou dia 0 e dias 15 e 30 em cada tratamento e respectivos *p-values*

Hemoglobina		
Diferença	Estimativa (e.p.)	<i>p-value</i>
0 – dias 15:30 em FeSO ₄	20.750 (8.11)	0.0132
0 – dias 15:30 em 1:01	-10.81 (8.25)	0.1950
0 – dias 15:30 em 1:02	-10.25 (8.11)	0.2116
0 – dias 15:30 em 1:03	1.591 (8.25)	0.8477
0 – dias 15:30 em 1:04	-4.09 (8.25)	0.6214
0 – dias 15:30 em 1:05	4.917 (8.11)	0.5469

- Verificou-se apenas um aumento significativo do nível médio de hemoglobina (aproximadamente 21 unidades) dos animais que receberam Sulfato de Ferro, em relação ao nível no *baseline*.

Tabela 3: Diferença de médias (erro padrão) entre tratamento com Sulfato de Ferro (FeSO_4) e os outros tratamentos e respectivos *p-values*.

Diferença	Hemoglobina	
	Estimativa (e.p.)	<i>p-value</i>
1:01 – FeSO_4	-0.375 (5.30)	0.9440
1:02 – FeSO_4	9.167 (5.21)	0.0887
1:03 – FeSO_4	6.061 (5.30)	0.2620
1:04 – FeSO_4	4.437 (5.30)	0.4092
1:05 – FeSO_4	13.944 (5.21)	0.0119

- Para hemoglobina, podemos observar que o nível médio de hemoglobina aumentou significativamente aproximadamente 14 unidades nos animais recebendo a dose 1:05 quando comparado com animais que receberam Sulfato de Ferro ($p\text{-value}=0.012$).