HELENA MANZANO

Toxicidade do cianeto em suínos. Avaliação dos efeitos perinatais

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa.Dra. Silvana Lima Górnjak

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1645
FMVZ

Manzano, Helena

Toxicidade do cianeto em suínos. Avaliação dos efeitos perinatais /
Helena Manzano. — São Paulo: H. Manzano, 2006.
194 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak.

1. Intoxicação. 2. Suínos. 3. Toxicocinética. 4. Toxicologia do
desenvolvimento. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

PARECER

Interessado: Helena Manzano

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 40/2002, intitulado: "Toxicidade do cianeto em suínos. Avaliação dos efeitos perinatais", no qual foram utilizados 48 suínos, sob responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, constatou que o mesmo foi realizado empregando protocolo de experimentação compatível com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 16 de janeiro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: Helena Manzano

Título: Toxicidade do cianeto em suínos. Avaliação dos efeitos perinatais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/2006

Banca Examinadora

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho

Primeiramente a Deus e aos animais, sem os quais este não poderia ser realizado;

Às pessoas que me mostraram o caminho da verdade, da lealdade, da compreensão, da amizade e do amor.

Pessoas que me encheram de alegrias nos momentos tristes...

Que me deram serenidade nas horas críticas...

Que me encorajaram nos momentos difíceis...

Que me apontaram os erros...

Que me ensinaram a ir atrás dos sonhos...

E que principalmente mostraram o real significado da palavra AMOR.

**José Carlos Manzano, Arlete Aparecida de Lucca Manzano,
Lúcia Manzano, Paulo Manzano e José Marcos Faganello.**

Agradecimento Especial

À Profa. Dra. Silvana Lima Górnika,
Que me forneceu grande estímulo, confiança e serenidade para a
execução deste trabalho,
Que se fez presente quando necessário,
E mostrou ser muito mais que uma orientadora,

Uma amiga!

Agradecimentos

Ao departamento de patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela oportunidade oferecida;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa;

Ao Paulo César e Leonila Este Reinert Raspantini pelo suporte técnico prestado;

Ao Altamir Benedito de Sousa pelo importante apoio na execução das dosagens de tiocianato;

Aos técnicos da histopatologia do VPT, Cláudio Arroyo, Luciano A. Bugalio, pela confecção das lâminas;

A Prof Maria Lucia Dagli pelo apoio essencial no estudo histopatológico dos órgãos e ao Prof. Paulo César Maiorka e seus alunos, pelo auxílio na análise histopatológica do SNC;

Ao Prof. Dr Jorge Camilo Flório pela atenção prestada à análise estatística;

Aos funcionários da biblioteca, pelo auxílio fornecido;

Aos Funcionários da suinocultura, Sérgio, Dito e Tião, pelo apoio na execução desta pesquisa;

Aos Funcionários do CEPTOX, Adilson, Marquinhos, Estevão e Thiago pelo auxílio na realização deste trabalho;

Aos Funcionários da Segurança do Campus, pelos cafezinhos e rondas noturnas prestadas durante os experimentos;

Às secretárias da pós graduação; Sandra, Claudia e Silvia;

A todos os colegas de pós Ana Cristina Tasaka, Rosane Medeiros, Benito Soto-Blanco, Isis Rueza, Maria Rita P. da Silva, Renato (Bozó), Débora (Magali), Carlos, Adriana, Marcela, Alexandra, Renata, Cris, Simone, Francine....

A todos os estagiários que passaram pelo CEPTOX e amigos: Paula, Milena, Xexa, Nara, Luciana Lippi, André Gotardo, Elaine Lanzoni, Lúcia Manzano, Ester Leonila Reinerte, Breno Schumacher, Marcos Barbosa, Alexandra Nicolau, Ana Letícia Melito, Domênica Palomares, Altamir, Benedito de Sousa, Stella, Andréia e Heige.....

e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, com atenção e carinho durante a realização deste trabalho, o meu mais profundo obrigado.

“ A Alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita.”

Gandhi

“Viva como se fosse morrer nunca;
Aja como se fosse morrer amanhã.”

Lin Yutang

“Se você cometeu algum erro, isso significa tempo de aprender e não de
desistir.”

Chico Xavier

RESUMO

Manzano, H. **Toxicidade do cianeto em suínos: Avaliação dos efeitos perinatais.** [Toxicity of cyanide in swine: Evaluation of perinatal effects] 2006.222.f Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O cianeto e os compostos cianogênicos são ubíquos na natureza e amplamente estudados pela toxicologia. A exposição prolongada a este íon tem sido associada à produção do bócio, de diversos distúrbios neurológicos, bem como alterações em outros órgãos, tanto em seres humanos como em diferentes espécies animais. Embora existam na literatura muitos trabalhos relativos à exposição prolongada ao cianeto, em diferentes espécies animais, muito pouco é encontrado em relação aos possíveis efeitos tóxicos durante o período perinatal; assim, o objetivo do presente estudo foi o de determinar os efeitos da exposição ao cianeto de potássio (KCN) em suínos, durante a gestação. Inicialmente, realizou-se estudo toxicocinético, em suínos fêmeas, em diferentes fases, utilizando-se o tiocianato como biomarcador. Vinte e dois suínos, foram divididos em quatro grupos (6; com 60 dias da idade; 5, com 95 dias da idade; 5, com 80 dias da gestação e 6, com 21 dias de lactação), e receberam por via oral, a dose única de 3,0 mg /kg de peso vivo de cianeto de potássio (KCN). As concentrações do tiocianato no sangue foram medidas dentro de 24h. O tempo máximo (Tmax) e constante de eliminação (Kel) foram mais elevados em porcas lactantes (15 h e 0,045, respectivamente); por outro lado, as maiores concentração do tiocianato (Cmax) bem como área sob a curva (ASC) foram observados nas fêmeas grávidas (161,8; 158.834,34). A meia vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$), o volume da distribuição (Vd) foram mais elevados nas fêmeas como 95 dias de idades, e o clearance (Cl), o mais baixo (41,57 ;1,23 e 0,017, respectivamente). Na segunda etapa, foram utilizados 24 fêmeas, gestantes, divididas em quatro grupos iguais: 1 controle e 3 experimentais. Os animais dos grupos experimentais foram tratados com 1,0, 2,0 e 3,0 mg/KCN/Kg, duas vezes ao dia, adicionados a ração comercial, a partir da 3ª semana de prenhez. O grupo controle recebeu somente ração comercial. Estas fêmeas foram pesadas e foram retiradas amostras de sangue para avaliação bioquímica (dosagens de ALT, AST, GGT, uréia, creatinina, T3, T4 e tiocianato) durante todo o período gestacional; além disto, acompanhou-se o desenvolvimento fetal por meio de ultra-sonografia aos 21, 35, 45, 55 e 65, quando foram mensurados os seguintes parâmetros: comprimento crânio-caudal, diâmetro torácico, diâmetro abdominal e diâmetro biparietal. No 110º DG, uma fêmea prenhe de cada grupo foi abatido, para coleta de fragmentos representativos de tireóide, coração, pulmão, fígado, rim, baço, pâncreas e cérebro para a avaliação histopatológica, bem como coletou-se o líquido amniótico para dosagem de tiocianato. As mães que prosseguiram com a gestação tiveram seus partos assistidos com subsequente retirada do colostro, para dosagem de tiocianato. Os filhotes desta mães foram acompanhados até o abate (120 dias de vida), quando também foram coletadas amostras dos diferentes tecidos para a avaliação histopatológica. A análise das mensurações fetais, não revelou alterações significantes, já a análise bioquímica, em relação às mães experimentais, verificou-se que os níveis de tiocianato estiveram aumentados, significativamente no soro, colostro e líquido amniótico, no entanto, poucas foram as alterações nas enzimas e outras substâncias. O estudo histológico revelou acidofilia citoplasmática, degeneração e vacuolização, de células de purkinje, neuroniofagia em cortex cerebral, aumento dos folículos tireoideanos, bem como espessamento e vacuolização do epitélio folicular e do colóide, degeneração hepática e renal, espessamento dos septos alveolares, no pulmão, e desarranjo do parênquima pancreático com desorganização dos acinos e diminuição dos grânulos de zimogênio. Em relação às proles verificou-se queda, no peso e ganho de peso daqueles filhotes provenientes de mães tratadas com 2,0 e 6,0 mg/kg de KCN. Embora a análise bioquímica não tenha mostrado alterações consistentes nos animais provenientes daquelas mães tratadas com o KCN durante a gestação, o estudo histopatológico revelou, nestes filhotes, lesões ao nível de tireóide e tecido pulmonar, semelhantes às aquelas encontradas em suas mães. Concluindo, os resultados do presente estudo, evidenciam que a biotransformação do cianeto varia de maneira marcante, considerando a faixa etária e o estado fisiológico dos suínos fêmeas, e que são os animais gestantes, provavelmente, os mais sensíveis aos efeitos tóxicos, da exposição crônica as baixas doses do cianeto. Ainda, que esta exposição materna ao cianeto durante a gestação promove efeito tóxico no feto, no entanto, essas alterações são observadas apenas na fase pós-natal.

Palavras Chaves: Intoxicação. Suínos. Toxicocinética. Toxicologia do Desenvolvimento.

ABSTRACT

MANZANO, H. **Toxicity of cyanide in swine: Evaluation of perinatal effects.** [Toxicidade do cianeto em suínos: Avaliação dos efeitos perinatais] 2006.222f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Cyanide and cyanogenic compounds are ubiquitous in nature and widely studied in toxicology. Long-term cyanide exposure has been associated to development of goiter, pancreatic diabetes, and several neurological diseases in humans and animals. However, the exact mechanism involved in induction of these diseases are not fully elucidated. It is believed that these effects are consequence of the toxic action of cyanide and/or its main product of transformation, thiocyanate. Thus, the objective of the present study was to determinate the effects of long term exposure to potassium cyanide (KCN) in swines, during perinatal period. Initially, it was realized a toxicokinetic study in female swines, in three different states, using thiocyanate as biomarker. Twenty two swines were randomly allocated in four groups: 6 with 60 days of age; 5 with 95 days of age, 6 with 80 days of gestation, and 6 with 21 days of lactation. All the animals received orally a single dose of 3.0 mg/kg/body weight of KCN. Thiocyanate concentrations in blood were measured within 24 h. The time of peak concentration (T_{max}) and constant of elimination (K_{el}) was higher in lactation sows (15h; 0.045, respectively); on the other hand the higher concentrations of thiocyanate (C_{max}) as well as area under the curve (AUC) were observed in pregnant sows (161.8; 158.834.34). The elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) and volume of distribution (V_d area) was higher in female swines with 95 days of age (41.57 h ; 1.23 L/kg), however the clearance value (Cl) was the smallest (0.017 L/kg/h). In the second step it was utilized 24 pregnancies sows, randomly allocated in four equal groups: 1 control and 3 experimental. The experimental groups was treated with 1.0, 2.0 and 3.0 mg/kg/ KCN added in commercial ration, twice a day, since 3rd week of pregnancy until the last day of gestation. The control group received only commercial ration. All fetuses were evaluated by ultra-sonographic in the 21, 35, 45, 55 e 65 days of gestation (GD). All the sows was weigthy weekly and blood colleted for biochemical evaluation. In the 110 GD, one animal per group was euthanized and fragments from some tissues were collected for histopathological study. Yet, the levels of thiocynate were evaluation in the amniotic fluid. The other sows that following gestation was collected colostrum for thiocynate evaluation levels. Histopathology revealed degenerative vacuolar alterations in the liver, pancreas, thyroid and kidney cells, and in the neurons of the central nervous system in the animals that received the KCN. In the lungs was observed widening of the epithelium alveolar. In the third step the development of the piglets was evaluate, the same biochemical parameters observed in mothers were done, with exception T3 and T4, until 45 postnatal days as well as weight and body weight gains for 120 days; in this day carcasses weights and bacon thickness were evaluated. From the biochemical parameters in relation in the piglets, it was verified that the thiocynade levels were significantly increased in several experimental groups; otherwise, too feel alterations were observed in the enzymes and other substances analyzed. The histopathological study revealed the same alterations of thyroid and lungs of the sows. In conclusion, the results of the present study support the hypothesis that the metabolism of cyanide is extremely variable, considering the age and the physiological state of female swine's. Furthermore this study suggest that pregnancies sows are most sensible to the toxic effect, of the long-term exposition the low doses of cyanide; still, this work showed that exposition leaded the maternal and development toxicity of de pliglets.

Uniterms: Intoxication; Cyanide; Swine; Toxicokinetcs; Developmental Toxicology

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	SOBRE O CIANETO.....	1
1.1.2	História e Uso do Cianeto	2
1.1.3	Fontes de Exposição ao Cianeto	4
1.1.4	Toxicocinética do Cianeto	9
1.1.5	Intoxicação por Cianeto	12
1.2	SOBRE A TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO	15
1.3	O SUÍNO COMO MODELO NA EXPERIMENTAÇÃO.....	17
1.3.1	Uso da Espécie Suína em Testes de Teratogenicidade	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22

3.1	ANIMAIS	22
3.2	MATERIAL	23
3.2.1	Reagentes:	23
3.2.2	Soluções:	24
3.2.2.1	Solução p-FDA.....	24
3.2.2.2	Solução de piridina	24
3.2.2.3	Mistura de piridina- p- FDA:	25
3.2.2.4	Solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10%:.....	25
3.2.3	“kits” Comerciais	25
3.2.4	Ração Comercial	26
3.3	APARELHAGEM.....	26
3.4	PROCECIMENTOS	26
3.4.1	Alimentação dos Animais	27
3.4.2	Manejo para o Acasalamento por Monta Natural e ou Inseminação Artificial	27
3.4.3	Caracterização do Diestro	31
3.4.4	Administração do Cianeto de Potássio	31
3.4.5	Avaliação do Peso e Ganho de Peso	33
3.4.6	Coleta de Sangue	34

3.4.7	Coleta de Colostro e Leite.....	35
3.4.8	Coleta do Líquido Amniótico	36
3.4.9	Dosagem de Tiocianato no Soro, no Leite, no Colostro e no Líquido Amniótico	36
3.4.10	Dosagem Bioquímica	37
3.4.11	Dosagem de T3 e T4 Livres.....	37
3.4.12	Ultra-Sonografia.....	38
3.4.13	Manejo Zootécnico das Proles	40
3.4.14	Abate e Exame Anátomo-Patológico	42
3.4.15	Rendimento de Carcaça	45
3.4.16	Avaliação da Espessura de Toucinho e Espessura Relativa de Toucinho	45
3.4.17	Avaliação do Peso e do Peso relativo das Glândulas Tireóide das Proles ao Abate.....	45
3.4.18	Cálculos dos Índices Zootécnicos; Mortalidade e Desempenho	46
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	50
3.5.1	Experimento 1: Validação da Metodologia para Determinação de Tiocianato, por Espectrofotometria, em Soro, Leite e Colostro, e Líquido Amniótico de Suínos	50

3.5.2	Experimento 2: Estudo da Cinética de Transformação do Cianeto em Tiocianato em Suínos, Fêmeas, com 60 dias de idade	52
3.5.3	Experimento 3: Estudo da Cinética de Transformação do Cianeto em Tiocianato, em Suínos, Fêmeas, na Fase de Crescimento/Terminação, com 95 dias de Idade	52
3.5.4	Experimento 4: Estudo da Cinética de Transformação do Cianeto em Tiocianato em Suínos, Fêmeas, no 80º dia de Gestação	53
3.5.5	Experimento 5: Estudo da Cinética de Transformação do Cianeto em Tiocianato em Suínos, Fêmeas, em Diestro, no 21º dia de Lactação	53
3.5.6	Experimento 6: Efeitos da Administração de KCN em Marrãs durante a Gestação: Avaliação Bioquímica e Anátomo-Patológica	54
3.5.7	Experimento 7: Avaliação de Tiocianato no Líquido Amniótico e Colostro de Marrãs, tratadas com diferentes doses de KCN, por via oral, durante a Gestação.....	55
3.5.8	Experimento 8: Efeitos da Administração de KCN em Marrãs durante a Gestação: Acompanhamento do Desenvolvimento Fetal por Ultra-Sonografia, Avaliação Pós-natal e Anatomo-Patológica da Prole.....	55
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4	RESULTADOS	58

4.1	EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE TIOCIANATO, POR ESPECTROFOTOMETRIA, EM SORO, LEITE, COLOSTRO E LÍQUIDO AMNIÓTICO DE SUÍNOS.....	58
4.2	EXPERIMENTO 2: ESTUDO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO EM SUÍNOS, FÊMEAS, EM FASE DE CRECHE, COM 60 DIAS DE IDADE.....	60
4.3	EXPERIMENTO 3: ESTUDO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO, EM SUÍNOS FÊMEAS, EM FASE DE CRESCIMENTO/TERMINAÇÃO, COM 95 DIAS DE IDADE.....	62
4.4	EXPERIMENTO 4: ESTUDO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO, EM MARRÃS, FÊMEAS NO 80º DIA DE GESTAÇÃO	64
4.5	EXPERIMENTO 5 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO, EM PORCOS, FÊMEAS COM 21 DIAS DE LACTAÇÃO.....	66
4.6	EXPERIMENTO 6: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KCN EM MARRÃS DURANTE A GESTAÇÃO: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ANATOMO-PATOLÓGICA	72
4.7	EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TIOCIANATO NO LÍQUIDO AMNIÓTICO E COLOSTRO DE PORCAS GESTANTES, TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE KCN, POR VIA ORAL	97
4.8	EXPERIMENTO 8: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KCN À SUÍNAS FÊMEAS DURANTE A GESTAÇÃO:	

	ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO FETAL POR ULTRA-SONOGRAFIA E AVALIAÇÃO PÓS-NATAL DA PROLE.....	99
5	DISCUSSÃO.....	136
6	CONCLUSÕES.....	163
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais plantas com glicosídeos cianogênicos identificados.....	6
Tabela 2 –	Coeficiente de variação (CV), expresso em porcentagem, intra e inter dias, obtidos pela análise dos níveis de tiocianato de amostras do padrão de 100mcmol/L em água e em pool de amostras de soro, leite, colostro e líquido amniótico. A recuperação (REC) do método, expressa em porcentagem, determinada por meio da relação obtida entre as absorbâncias das amostras de solução padrão de tiocianato de potássio (KSCN) e de amostras de soro, leite, colostro e líquido amniótico de suínos do grupo controle adicionados das soluções padrão de KSCN nas concentrações 100 e 200 mcmol/L	59
Tabela 3 –	Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L), de suínos fêmeas jovens, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	61
Tabela 4 –	Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L), de suínos fêmeas em fase de crescimento/terminação, com 95 dias de idade, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 5 animais por tempo avaliado. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	63
Tabela 5 –	Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L), de marrãs, fêmeas adultas, com 80 dias de gestação, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 5 animais por tempo avaliado São	

	apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	63
Tabela 6 -	Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L), de porcas, com 21 dias de lactação, da espécie suína, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	67
Tabela 7 -	Níveis lácteos de tiocianato (em mcmol/L), de porcas com 21 dias de lactação, da espécie suína, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	68
Tabela 8-	Parâmetros toxicocinéticos do tiocianato em suínos, fêmeas, em diferentes fases de vida: creche, terminação, gestação e lactação, que receberam, por via oral, a dose única de 3,0mg/Kg de KCN, juntamente com ração comercial. (Cmax: concentração máxima; Tmax: tempo para atingir a Cmax; ASC: área sob a curva; Kel; constante de eliminação; Cl: clearance; t1/2β: meia vida de eliminação; Vd: volume aparente de distribuição).	71
Tabela 9 -	Peso (em Kg) semanal de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), a partir da 3º semana de gestação, por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 5 animais por grupo. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	74
Tabela 10 -	Ganho de peso (em Kg) semanal de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), a partir da 3º semana de gestação, por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 5 animais por grupo São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	75
Tabela 11 -	Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), administrados por via oral, junto com ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	82

Tabela 12 -	Níveis séricos de glicose (em mg/dL) e colesterol (em mg/dL), de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	83
Tabela 13 -	Níveis séricos de uréia (em mg/dL) e creatinina (em mg/dL), de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez, São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	84
Tabela 14 -	Níveis séricos de ALT (em U/L), AST (em U/L) e GGT (em U/L) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez, São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	87
Tabela 15-	Níveis séricos de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) livres de suínos, fêmeas, com 110 dias de prenhez, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez. Foram utilizados 5 animais. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	89
Tabela 16-	Níveis de tiocianato do líquido amniótico, aos 110 dias de gestação e do colostro obtido no parto, de suínos fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez. Foram utilizados 5 animais. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões	98
Tabela 17 -	Mensurações de comprimento crânio-caudal (CCC), diâmetro abdominal (DA), diâmetro torácico (DT) e diâmetro biparietal dos fetos no 45º, 55º e 65º dias de gestação de marrãs tratadas a partir da 3º semana de prenhez, com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto à ração comercial, durante a gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	103
Tabela 18 -	Parâmetros reprodutivos de marrãs tratadas ou não, com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia),	

	por via oral, junto a ração comercial, a partir do 21º dia de prenhez, durante a gestação. Foram utilizados 5 animais	104
Tabela 19-	Peso de suínos ao nascer, aos 21, 42, 60 e 120 dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez e ganho de peso total daqueles que conseguiram chegar até os 120 dias de vida. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	105
Tabela 20 -	Índice (em porcentagem) de mortalidade: ao nascer (NM), do parto ao desmame (MND), de creche (MC) e do crescimento à terminação (MCT). Número médio de leitões vivos: ao nascer (LVL), desmamados (LDL) e terminados (LTL) por leitegada nascida. Peso médio de leitões ao nascer (PLN), ganho de peso médio diário dos leitões até o desmame (GPMDD), na creche (GPMDC) e na fase de crescimento à terminação (GPMDC) de proles provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), a partir do 21º dia de prenhez, durante a gestação.	107
Tabela 21 -	Espessura de toucinho, espessura relativa de toucinho, peso e rendimento de carcaça quente e fria, dos suínos terminados, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0mg/Kg), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões	108
Tabela 22 -	Peso médio e relativo das tireóides das proles de marrãs tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	110
Tabela 23-	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L), de suínos, machos e fêmeas de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia) por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. Foram utilizados 5 animais machos e 5 animais fêmeas. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões	114

Tabela 24 -	Níveis séricos de glicose (mg/dL), de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	116
Tabela 25 -	Níveis séricos de colesterol (mg/dL) de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões	118
Tabela 26 -	Níveis séricos de uréia (mg/dL) de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	120
Tabela 27 -	Níveis séricos de creatinina (mg/dL) de machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	122
Tabela 28 -	Níveis séricos de aspartato aminotransferase - AST (U/L) de suínos, machos e fêmeas, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	127
Tabela 29 -	Níveis séricos de alanina aminotransferase - ALT (U/L) de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.....	129
Tabela 30 -	Níveis séricos de gama glutamiltransferase - GGT (U/L) de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com a diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial,	

durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões..... 131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Processo básico envolvido no metabolismo do cianeto (adaptado de ANSELL e LEWIS, 1970).....	11
Figura 2 -	Caminho alternativo para remoção do cianeto do organismo (adaptado de ANSELL e LEWIS, 1970)	11
Figura 3 -	Fêmea em baixo em estro, em cima pró estro.....	28
Figura 4 -	Fêmea em estro.....	28
Figura 5 -	Método da mão enluvada	29
Figura 6 -	Método da mão enluvada	29
Figuras 7-9 -	Procedimentos realizados na inseminação artificial.....	30
Figura 10 -	Administração de KCN para várias marrãs ao mesmo tempo.....	32
Figura 11 -	Detalhe da Marrã comendo ração com KCN	32
Figura 12 -	Contenção do animal por meio de cachimbo.....	34
Figura 13 -	Coleta de sangue.....	34
Figura 14 -	Coleta de colostro e/ou leite	35
Figura 15 -	Diagnóstico de prenhez positiva (21ºdia).....	39
Figura 16 -	Diagnóstico de prenhez positiva (35ºdia).....	39

Figura 17 -	Procedimento de US.....	39
Figura 18 -	Procedimentos para localizar o útero.....	39
Figura 19 -	Imagem ultra-somográfica, medindo o comprimento crânio caudal no 45º dia de gestação	39
Figura 20 -	Imagem ultra-somográfica, medindo o comprimento crânio caudal no 55º dia de gestação	39
Figura 21 -	Imagem ultra-somográfica, medindo o diâmetro torácico no 65º dia de gestação	40
Figura 22 -	Imagem ultrassonográfica medindo o diâmetro abdominal no 65º dia de gestação.....	40
Figura 23 -	Imagem ultrassonográfica, medindo o diâmetro biparietal no 65º dia de gestação.....	40
Figuras 24/27 -	Seqüência de eventos até o nascimento dos fetos.....	41
Figura 28 -	Porca em trabalho de parto, sendo auxiliada.....	42
Figura 29 -	Retirada de um natimorto do útero	42
Figura 30 -	Secagem e limpeza do leitão.....	42
Figura 31 -	Prática da corte dos dentes	42
Figura 32 -	Curva de calibração de solução aquosa de tiocianato de potássio nas concentrações 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200 e 300mcomol/L.....	59
Figura 33 -	Níveis séricos de tiocianato, em mcmol/L, em suínos fêmeas com; 60dias (A) e 95dias (B) de idade, e com 80dias de gestação (C), antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial	69
Figura 34 -	Níveis séricos(D) e lácteos (E) de tiocianato, em mcmol/L, em porcas com; 21 dias de lactação antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercia.....	70
Figura 35 -	Peso em Kg (A), Ganho de peso em Kg (B) das semanas (-2º)-0, 1º-5 e 6º-13º e Ganho de peso da 1º a	

	13º semana (C) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), a partir da 3º semana de gestação, por via oral, junto com ração comercial.....	76
Figura 36 -	Níveis séricos de tiocianato (em $\mu\text{mol/L}$) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), administrados por via oral, junto com ração comercial, durante o período gestacional, a partir do 21º dia de prenhez.....	82
Figura 37 -	Níveis séricos de glicose (em mg/dL) e colesterol (em mg/dL), de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez	85
Figura 38 -	Níveis séricos de uréia (em mg/dL) e creatinina (em mg/dL), de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez	86
Figura 39 -	Níveis séricos de ALT, em U/L (A), AST, em U/L (B) e γGT , em U/L (C) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez.....	88
Figura 40 -	Níveis séricos de T3 e T4 (ng/dL) livres de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez	89
Figura 41 -	Fotomicrografia de corte histológico do SNC de mães dos grupos, controle e experimentais, que receberam as doses de 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN a partir do 21º dia de gestação. Cerebelo de fêmea do grupo controle (A) e de fêmea tratada com 6,0 mg/kg de KCN (B), notar a dissociação dos neurônios da camada granular (setas) da substância cinzenta (4x). (C e D) Células de Purkinje degeneradas (setas) em cerebelos de mães dos grupos controle e experimental 6,0 mg/kg de KCN (10x). Células de Purkinje de cerebelo de fêmea tratada com 4,0 mg/kg de KCN (E). As setas mostram o citoplasma acidofílico destas células (20x). Células de Purkinje de mãe tratada com a maior dose de KCN com presença de vacuolização (setas) (20X).	

	(G e H) As setas indicam a presença de neuroniofagia em córtex cerebral de mãe tratada com a dose de 6,0 mg/kg de KCN (20 e 40x, respectivamente) (H.E.).....	90
Figura 42 -	Fotomicrografia de corte histológico de tireóides, de mães, controle (A) e experimentais (B, C e D) que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0, 4,0 e 6,0mg/kg de KCN/dia, a partir da 3 ^o semana de prenhez, durante a gestação, mostrando aumento dos folículos tiroideanos em relação ao corte histológico da glândula tireóide de mãe do grupo controle; AU 4X.....	91
Figura 43 -	Fotomicrografia de corte histológico de tireóides de mães, controle (A) experimentais, que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0, 4,0 e 6,0mg/kg de KCN/dia (B, C e D, respectivamente), a partir da 3 ^o semana de prenhez, durante a gestação, mostrando espessamento do colóide, vacuolização do epitélio folicular e aumento na quantidade de vacúolos de reabsorção no colóide dos folículos tiroideanos em relação à tireóide de mãe do grupo controle (AU 20X).....	92
Figura 44 -	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de mães, controle (A) e experimentais que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0, 4,0 e 6,0mg/kg de KCN/dia (B, C e D, respectivamente), a partir da 3 ^o semana de prenhez, durante a gestação, mostrando degeneração vacuolar (AU 10X e Fig D, AU 20x).....	93
Figura 45 -	Fotomicrografia de corte histológico de rins de mães que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0, 4,0 e 6,0mg/kg de KCN/dia (A, B e C, respectivamente), a partir da 3 ^o semana de prenhez, durante a gestação, mostrando degeneração vacuolar em epitélio do túbulo renal (AU 20x).....	94
Figura 46 -	Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de mãe que recebeu, por via oral, junto a ração comercial, a dose de 6,0mg/kg de KCN/dia (B), a partir da 3 ^o semana de prenhez, durante a gestação, mostrando espessamento dos septos alveolares, caracterizando pneumonia intersticial. Do lado esquerdo, verifica-se o corte histológico de pulmão de uma mãe pertencente ao grupo controle (A), mostrando o parênquima pulmonar sem nenhuma alteração (AU de 4x).	95

Figura 47 -	Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de mães do grupo controle (A) e experimentais, que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0, 4,0 e 6,0mg/kg de KCN/dia (B, C e D respectivamente), a partir da 3º semana de prenhez, durante a gestação. Pode-se verificar que o parênquima pancreático daquelas fêmeas dos diferentes grupos experimentais apresenta-se desarranjado; o mesmo não é observado no tecido pancreático daqueles animais pertencente ao grupo controle (AU de 20X)96
Figura 48 -	Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de mãe do grupo que recebeu por via oral, junto a ração comercial, a dose de 6,0mg/kg de KCN/dia (B), a partir da 3º semana de prenhez, durante a gestação, mostrando desarranjo do parênquima pancreático com desorganização dos ácinos e diminuição dos grânulos de zimogênio em relação ao corte histológico de pâncreas, de mãe do grupo controle (A), AU de 40x.96
Figura 49 -	Níveis de tiocianato do líquido amniótico, aos 110 dias de prenhez, e do colostro, obtido no parto, de suínos fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, a partir do 21º dia gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão98
Figura 50 -	Peso ao nascer (A), aos 21 (B), aos 42 (C), 60 (D) e 120 dias de idade (E) e de ganho de peso total 1º-120º (F), de suínos provenientes de mães tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, a partir do 21º dia de prenhez, durante a gestação 106
Figura 51 -	Parâmetros de espessura média e relativa de toucinho (A e B), pesos médios de carcaças quente e fria (B e C) e rendimento de carcaças (D e E) de suínos terminados, provenientes de mães tratadas com diferentes tratamentos com KCN (2,0, 4,0 e 6,0mg/Kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação 109
Figura 52 -	Peso médio e relativo das tireóides das proles de marrãs tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação 110

Figura 53 -	Níveis séricos de tiocianato de suínos, machos (A e B) e fêmeas (C e D) aos 7 e 21 dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação.	115
Figura 54 -	Níveis séricos de glicose de suínos, machos (A, C e E) e fêmeas (B, D e F) com 14, 21 e 45 dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia) por via oral, junto a ração comercial durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação.	117
Figura 55 -	Níveis séricos de colesterol de suínos, machos e fêmeas com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação.	119
Figura 56 -	Níveis séricos de uréia de suínos, machos e fêmeas com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação.	121
Figura 57 -	Níveis séricos de creatinina de suínos, machos e fêmeas, com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação.	123
Figura 58 -	Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) de suínos, machos e fêmeas, com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação	128
Figura 59 -	Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) de suínos, machos e fêmeas com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação	130

Figura 60 -	Níveis séricos de gama-glutamilttransferase (GGT) de suínos, machos e fêmeas, com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação 132
Figura 61 -	Fotomicrografia de corte histológico de tireóides de suínos, ao abate, vindos de mães, controle(A) e experimentais que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0, 4,0 e 6,0mg/kg de KCN/dia (B, C e D, respectivamente), a partir da 3º semana de prenhez, durante a gestação, mostrando aumento dos folículos tiroideanos em relação ao tamanho dos folículo de suíno ao abate, nascido de mãe controle (AU 0,5X) 134
Figura 62 -	Fotomicrografia de corte histológico de tireóides, de suíno ao abate, vindo de mãe que recebeu, por via oral, junto a ração comercial, a dose de 6,0mg/kg de KCN/dia, a partir da 3º semana de prenhez, durante a gestação, mostrando espessamento do epitélio folicular e vacúolos no epitélio folicular cúbico, AU 20X 134
Figura 63 -	Fotomicrografia de corte histológico de pulmão, de suínos ao abate, provenientes de mães, controle (A) e experimentais, que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0, 4,0 e 6,0mg/kg de KCN/dia (B, C e D, respectivamente), a partir da 3º semana de prenhez, durante a gestação, mostrando espessamento dos septos alveolares (AU de 10x)..... 135

1 INTRODUÇÃO

1.1 SOBRE O CIANETO

O cianeto é considerado, há tempos como uma substância tóxica e mortal, sendo usado como veneno por centenas de anos. Este composto está presente em certos alimentos, nos produtos da combustão de materiais sintéticos, e é usado extensivamente na indústria.

Os cianetos fazem parte de um grupo de compostos que possuem o grupo ciano, presente no hidrogênio de cianeto (HCN) e no íon cianeto (CN⁻). Os cianetos orgânicos são chamados de nitrilas e uma parte destas se dissociam para produzir CN⁻ ou HCN (USEPA, 1989). Dentre os cianetos estão: o ácido cianídrico (HCN, ácido prússico ou nitrilo fórmico); o cianeto de sódio (NaCN), e o cianeto de potássio (KCN). Todos são potencialmente tóxicos, tanto para humanos como para animais (OSWEILER et al., 1985, SAAD e CAMARGO, 1967; SALKOWSKI e PENNEY, 1994).

O HCN é encontrado na forma de gás incolor, ou líquido azul pálido com leve odor de amêndoas amargas. É um ácido muito fraco, com valor de pK_a de 9,22 em 25°C, solúvel em água e álcool (ASTDR, 1993). Esta substância é gerada quando os cianetos de sódio e potássio entram em contato com o dióxido de carbono e umidade do ar (CHANDRA et al., 1980). Este composto também ocorre de forma livre, como sais inorgânicos, e está presente nas plantas, como heterosídeos (OSWEILER et al., 1985).

O NaCN e o KCN são os principais sais de cianeto, tendo como características químicas serem sólidos brancos, solúveis em água. O NaCN é comercialmente encontrado com 95-98% de pureza e o KCN com 95%. Em solução aquosa, ambos são fortemente alcalinos e decompõem-se rapidamente. Tanto o NaCN, como o KCN, produzem o HCN quando em contato com ácidos ou sais ácidos (WHO, 2004). Sabe-se que o NaCN é mais tóxico que o KCN pois, quando ingerido, reage com o ácido clorídrico do suco gástrico e desprende maior quantidade de HCN no organismo (SAAD e CAMARGO, 1967 e SALGADO LARINI, 1993).

1.1.2 História e Uso do Cianeto:

Desde os dias da Roma antiga, o cianeto e seus derivados foram usados como arma química (SYKES, 1981). Nero usava a água de cerejas silvestres, que contêm cianeto, para envenenar os membros de sua família ou outras pessoas que o desagradassem. Napoleão III propôs o uso do cianeto para realçar a eficácia das baionetas de seus soldados durante a guerra franco-prussiana.

Embora as substâncias que contêm cianeto fossem usadas por séculos como venenos, a sua identificação ocorreu somente em 1782, sendo este isolado a partir de plantas, pelo químico sueco, Scheele¹, que foi vítima desta sua descoberta, morrendo mais tarde em acidente em seu laboratório. (BASKIN; BREWER, 1997).

Na 1ª guerra mundial, entre 1915 e 1916, os franceses eram os únicos que usavam uma solução concentrada de KCN diluído em ácido sulfúrico, originando o gás, altamente tóxico, o HCN. Ainda, os alemães, na aprendizagem de seu uso, equiparam suas tropas com uma máscara que fosse capaz de filtrar o gás. Estes

¹ Scheele, apud VENESLAND, 1982, p.10

fatores combinados fizeram com que outras formas de cianeto também fossem exploradas, como o cianeto de cloro e o de bromo. No entanto, o ácido cianídrico continuou sendo utilizado, e durante a 2ª Guerra foi empregado em uma base farmacológica dispersível, denominado “ziklon B”, um fumigante e rodenticida, usado para eliminar milhões de civis e soldados inimigos a campo (ROBINSON, 1971; BASKIN. et al, 1987). Mais tarde, em 1980, relatos indicaram o uso do cianeto e de seus derivados contra os habitantes de Kurdish, cidade do Iraque, e, possivelmente, em Shahabad, Irã, durante a guerra entre o Irã e Iraque (BASKIN; BREWER, 1997).

Em 1817, Magine² sugeriu o uso de pequenas doses de cianeto para o tratamento de tosses e doenças pulmonares, foi proposto, então, o uso terapêutico desta substância como, por exemplo, no tratamento de alguns tipos de câncer, onde se utilizava a Laetrila, substância que contém amidalina, que quando ingerida, libera o cianeto (SUCHARD et al, 1998). A partir daí, o interesse pelos compostos cianogênicos ganhava outras dimensões, procurando-se explicar os seus efeitos sob o organismo. Assim, Hope-seygler³ (1876) mostrou que o cianeto inibia reações oxidativas em tecidos, e Batteli e Stern⁴ (1907) observaram que estas reações eram reversíveis. Estes achados motivaram os estudos de Warburg e Keilin⁵ (1920) sobre a aplicação do cianeto na oxidação tecidual e, somente, em 1927, Iorque Warbug⁶ determinou o mecanismo de ação tóxica do cianeto (VENESLAND et al., 1982). Em 1928 descobriu-se que com o uso de nitroprussiato de sódio para o tratamento de crises hipertensivas, bem como para falência congestiva do coração, também havia liberação do cianeto (FRIEDERICH; BUTTERWORTH, 1995).

² Magine, apud VENESLAND, 1982, p.10

³ Hope-seygler, apud VENESLAND, 1982, p.10

⁴ Batteli e Stern, apud VENESLAND, 1982, p.10

⁵ Warburg e Keilin, apud VENESLAND, 1982, p.10

⁶ Iorque Warbug, apud VENESLAND, 1982, p.10

1.1.3 Fontes de Exposição ao Cianeto

Os cianetos compreendem uma larga escala de compostos, com grande variedade de graus de complexidade química, que contêm a unidade CN^- , aos quais os seres humanos e animais podem ser expostos. As fontes antropogênicas da liberação do cianeto ao meio ambiente são diversas. O HCN é usado primeiramente na produção de substâncias tais como: a adiponitrila, o metacrilato, agentes quelantes, cloreto de cianeto, metionina e análogos hidroxilados, e cianeto de sódio e de potássio (WHO, 2004). O HCN é usado como fumigante em navios, trens, edifícios, silos de grãos, moinhos de farinha, bem como na fumigação de ervilhas e sementes em câmaras de vácuo (WHO, 2004).

As emissões deste composto no ar podem ocorrer por meio de processos manufaturados ou industriais de substância químicas e também em processos envolvidos com a metalurgia, como o chapeamento de metal, a extração do ouro e da prata. O ácido cianídrico pode ser encontrado em fumaças como aquelas de incêndio, de veículos, de cigarros e de incineradores, pois a combustão incompleta de carbono gera a liberação desta substância (ATSDR, 1993; RICKERT et al., 1980; WHO, 2004). O HCN também é formado durante a combustão incompleta de polímeros que contêm nitrogênio, tais como determinados plásticos, de poliuretanos, e lãs. Este toxicante também está presente em fumigantes-vermicidas (BALLENTYNE, 1988). O HCN pode ainda ser formado a partir de cianetos orgânicos (nitrilas), usados na produção de fibras, resinas, plásticos, produtos farmacêuticos e vitaminas (AMINLARI et al., 1994).

Outros cianetos, como o de potássio e o de sódio, são amplamente empregados em segmentos industriais, tais como: a extração e refino de metais preciosos (ouro

e prata), deposição eletrolítica de revestimentos metálicos (cobre, zinco, cádmio, etc), tratamentos térmicos do aço, síntese de produtos químicos inorgânicos e orgânicos (por exemplo, nitrilas, ácidos carboxílicos, amidos, esters, e aminas; cianeto de metal pesado) (WHO, 2004), aditivos especiais e fabricação de plásticos (especialmente o acrilonitrilo-estireno) (MAINIER, 2000), em laboratórios farmacêuticos, na indústria de cosméticos, de curtumes, na fabricação da amônia e outros (MANDSFELDT; BIERNATH, 2000; POTTER et al.; 2001).

Há um número relativamente grande de plantas utilizadas na alimentação humana e animal que são cianogênicas. Denomina-se cianogênese a capacidade das plantas e de outros organismos vivos (bactérias, fungos e plantas) em produzir e liberar HCN (CONN, 1978; MONTGOMERY, 1980; POULTON, 1983) ou íon cianeto (CAGNON et al., 2002). A liberação do HCN pelas plantas foi inicialmente atribuída a um composto isolado das amêndoas amargas, a amidalina, por Robiquet e Charlard. Nos vegetais tidos como cianogênicos, o cianeto é encontrado principalmente na forma de glicosídeo, os quais são derivados de aminoácidos como valina, isoleucina, leucina, fenilalanina e tirosina (POULTON, 1983; LIANGCHENG DU et al., 1995).

O fenômeno da cianogênese tem sido observado em vários vegetais. Atualmente, são conhecidas 2650 plantas chamadas cianogênicas provenientes de 550 gêneros e 130 famílias (CAGNON et al., 2002). As famílias nas quais a cianogênese é especialmente comum são: Araceae, Asteraceae (Compositae), a Euphorbiaceae, Fabaceae (Leguminosae), a Passifloraceae, Flacourtiaceae, Malesherbiaceae, Papaveracea, Poacea (Gramineae), Proteaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Sapindaceae e Turneraceae. Essas famílias são responsáveis pela produção de mais e 60 glicosídeos cianogênicos diferentes (SEIGLER, 1991).

Algumas plantas cianogênicas, bem com os seus respectivos glicosídeos, são mais conhecidos que outros devido à importância, principalmente do ponto de vista econômico no setor agropecuário. A tabela 1 lista algumas culturas que são produzidas em maior tonelagem no mundo (dados estimados pela FAO, 2000; JONES, 1998) para as quais seus respectivos glicosídeos cianogênicos foram identificados.

Tabela 1- Principais plantas com glicosídeos cianogênicos identificados

Nome popular	Nome científico	Glicosídeo
AVEIA	<i>Avena sativa</i>	Linamarina
BROTO DE FEIJÃO	<i>Phaseolus lunatus</i>	Linamarina/Lotaustralina
CEVADA	<i>Hordeum vulgare</i>	Epiheterodendrina
FEIJÕES	<i>P. vulgaris</i>	Linamarina/Lotaustralina
MAÇÃ	<i>Malus pumila hybrids</i>	Amigdalina, prunasina
MANDIOCA	<i>Manihot esculenta</i>	Linamarina / lotaustralina
MILHETO	<i>Eleusina caracana</i>	Triglochinina
SORGO	<i>Sorghum bicolor</i>	Durrina
TARO	<i>Colocasia esculenta</i>	Triglochinina
TRIGO	<i>Trifolium aestivum</i>	Durrina
	<i>T. suelta</i>	Durrina
	<i>T. monococaem</i>	Linamarina/Lotaustralina/Epilotaustralina

Fonte: JONES, D.A, 1998.

Dentre todas estas plantas destaca-se, pela grande importância econômica, particularmente em nosso país, a mandioca. Esta planta pertence à família da Euphorbiaceae, é um arbusto perene, com crescimento de 1-4m com boa adaptação ecológica. Este tubérculo é uma das mais eficientes fontes conversoras de carboidratos para humanos e animais (PRAWAT et al., 1995), provendo

elevada energia por hectare quando comparada a outras grandes culturas como, por exemplo, a do milho e a do arroz (COCK, 1982; WAY, 1984). A mandioca, além de oferecer uma boa fonte de energia, possui outras características desejáveis para o seu plantio, tais como, o crescimento em solos pobres, resistência à pragas e doenças de modo geral e a períodos de seca, além de ser uma excelente fonte de amido para a alimentação animal. Um outro fator que diferencia a cultura da mandioca é a elevada produtividade por área. Utilizando os dados médios de produtividade da Conab, observa-se que um mandiocal produz 14 toneladas por hectare, enquanto que as lavouras de arroz, milho, soja e trigo produzem, respectivamente, 3,2; 3,1; 2,1 e 1,8 toneladas por hectare (GAMEIRO, 2002). Além disto, são baixos os custos para o seu cultivo, o que vem acarretando na gradativa e crescente substituição do emprego do milho por mandioca como fonte de energia na alimentação animal; de fato, verifica-se um crescente uso da mandioca na criação animal, principalmente em suínos, pelos quais é consumida na forma *in natura*, sem ser descascada (HENRY; CORREA, 1992; OKE, 1984).

Em contraposição às inúmeras vantagens do uso da mandioca na alimentação, há os possíveis efeitos tóxicos da exposição prolongada a este tubérculo, seja na forma *in natura* ou na forma processada, como farinha. De fato, dentre os diversos tipos de mandioca, não se conhece nenhuma variedade que não contenha glicosídeos cianogênicos (MARIATH et al., 1988), o gênero *Manihot* possui de 100 a 200 espécies, e a linamarina, principal glicosídeo cianogênico, está presente em 163 espécies de mandioca existente, sendo que cerca de 130 estão localizadas no Brasil (HOENE, 1937).

Nas plantas cianogênicas comestíveis, os níveis de HCN freqüentemente variam entre as diferentes partes da planta. Desta maneira, altas concentrações de

glicosídeos foram observadas nas sementes da maçã, do pêssgo, do damasco e da cereja, todos da família Rosaceae (SEIGLER, 1975). Deve-se também considerar a variação dos teores de cianeto entre as diferentes plantas dentro de uma mesma espécie ou mesma variedade; por exemplo, os níveis de HCN encontrados em raízes descascadas de mandioca foram de 15-400 mg/kg; porém, em outras amostras já foram verificados entre 10 mg/kg a 2000 mg/kg, sendo que os teores de cianeto mais comumente encontrados neste vegetal encontram-se na faixa entre 30-150 mg/kg (POULTON, 1983). Outros autores dizem que os valores de cianeto na mandioca variam de 240-890 mg/kg nas raízes tuberosas e podem chegar a 1040 mg/kg nas folhas. Em outros vegetais, como o feijão fradinho, detectou-se quantidades de HCN variando entre 100-400 mg/kg.

Há também grande variação nos níveis de cianeto entre os vegetais, assim enquanto que numa variedade de sorgo detectou-se apenas 6,0 mg/ kg, no broto de bambu os níveis de cianeto obtido foram de 8000 mg/ kg (POULTON, 1983). Ainda, deve se considerar que a quantidade de glicosídeo cianogênico, encontrada numa determinada espécie de planta é influenciada por uma série de fatores; entre estes destacam-se, o período do dia, a estação do ano, o tipo de ambiente, a nutrição e os fatores genéticos (JONES, 1998).

É amplamente conhecido que o cianeto não ocorre livremente dentro da planta (SAUNDERS et al., 1977), é necessário que ocorram processos que envolvam desidratação, maceração, congelamento entre outros, para que haja união do glicosídeo cianogênico, encontrado dentro de vacúolos, com a sua respectiva enzima, uma β -glicosidase, encontrada no citosol, propiciando, desta maneira, o início da degradação enzimática (CHEEK; SHULL, 1985; CONN, 1978; OSWEILER et al., 1985; POULTON, 1983). Portanto, o glicosídeo cianogênico pode ser então

definido como glicosídeo de α -hidroxinitrilas (cianohidrinas) e como produto do metabolismo secundário de plantas (CARVALHO, 1979). O processo de liberação ocorre por processos físicos, tais como mastigação, congelamento e secagem. Estes processos permitem o contato dos vacúolos, contendo o glicosídeo, que proporciona seu desdobramento em açúcar e aglicona, sendo que este último composto sofrerá ainda ação de mais uma enzima denominada hidroxinitrila-liase, que, por sua vez, formará o íon e um composto aldeído ou cetônico (CONN, 1978; OKE, 1980).

1.1.4 Toxicocinética do Cianeto

O cianeto é rapidamente absorvido pelos pulmões, trato gastrointestinal e pele, tanto por animais como por humanos (BEASLY; GLASS, 1998; MONTGOMERY, 1980). Uma vez absorvido, é rapidamente distribuído pelo sangue por todo o organismo. Sua distribuição varia conforme a forma de exposição (USEPA, 1989). Após a absorção, o cianeto apresenta alta afinidade pela forma heme férrica da enzima citocromo a-a₃. Neste processo, forma um complexo relativamente estável, deixando o ferro no estado trivalente. Neste estado, o ferro interrompe o transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória, o que leva à anóxia histotóxica e, conseqüentemente, alteração na coloração sangüínea, pois a oxihemoglobina, não conseguindo liberar o seu oxigênio para o transporte de elétrons, faz com que o sangue venoso se torne “arteriolizado”, assumindo coloração vermelho cereja brilhante (ONG, 1989; PANIGRAHI et al., 1992; POULTON, 1983; WAY, 1984).

No organismo, em geral, independente da espécie, existe um mecanismo de detoxificação do cianeto que é bastante eficiente. Este mecanismo é regido por uma

enzima intramitocondrial, a acetilsulfotransferase, também conhecida por rodanase. A rodanase é amplamente difundida nos tecidos, sendo encontrada em altas concentrações no fígado, rins, tireóides, adrenais e pâncreas (MONTGOMERY, 1980). Esta enzima catalisa a transferência de um átomo de enxofre de um doador, o tiosulfato, para o cianeto, formando o tiocianato (GUSMAN; OCHOA; GIL, 1977; USEPA, 1989; ONG, 1989; WAY, 1984;). Uma outra forma de detoxificação inclui as reações espontâneas com cisteína, quando parte do cianeto absorvido sofre conjugação com a substância e forma o 2-imino-4-ácido carboxílico tiazolidina e 2-aminotiazotiazolina-4-ácido carboxílico (USEPA, 1989; VENNESLAND et al., 1982; WESTLEY et al., 1983).

A excreção do cianeto se dá, primariamente, pela urina, como tiocianato; contudo, alguns cianetos entram no metabolismo de compostos de um carbono e são eliminados no ar expirado como CO_2 e também em pequena quantidade como HCN (ANSELL; LEWIS, 1970; USEPA, 1989). Desta maneira, as dosagens de tiocianato na urina e/ou plasma, bem como do cianeto do plasma são formas de monitoramento da exposição ocupacional em humanos que manipulam o íon cianeto (LAUWERYS, 1996). As figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, o processo básico envolvido no metabolismo do cianeto, bem como o caminho alternativo para sua remoção.

Figura 1- Processo básico envolvido no metabolismo do cianeto (adaptado de ANSELL e LEWIS, 1970)

Figura 2 - Caminho alternativo para remoção do cianeto do organismo (adaptado de ANSELL e LEWIS, 1970)

1.1.5 Intoxicação por Cianeto

A ocorrência dos sintomas de intoxicação irá depender da velocidade da redução do cianeto nos tecidos. Assim, os fatores decisivos são determinados pelo tipo de cianeto, modo da exposição, dose e também pela capacidade do organismo em detoxificá-lo (POULTON, 1983).

A toxicidade aguda irá ocorrer quando a parte não biotransformada do cianeto absorvido exceder demasiadamente a concentração mínima necessária para inibir a citocromo-oxidase. Sendo assim, para se ter os efeitos tóxicos, a quantidade de cianeto deverá ser superior àquela suportada pelas enzimas de detoxificação, presentes, principalmente, em mitocôndrias de células hepáticas e renais de mamíferos (GUSMAN, 1977; ONG, 1989; WAY, 1984). O cianeto exerce seu efeito tóxico agudo pela combinação com metaloporfirina, contida em sistemas enzimáticos. A mais importante ação está na ligação extremamente forte com a citocromo-oxidase, o que produz bloqueio da transferência de elétrons por toda a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, impedindo, assim, rapidamente, a utilização de oxigênio pela célula. A morte resulta da anóxia citotóxica generalizada. Devido à necessidade de altas concentrações de oxigênio no sistema nervoso central e coração, são estes os tecidos que primeiramente são afetados pela anóxia (VOLGEL et al., 1981).

Quando a intoxicação aguda por cianeto ocorre, há uma predominância do metabolismo anaeróbico, as células intoxicadas pelo cianeto induzem a uma redução na razão de adenosina trifosfato/adenosina difosfato, e assim, alteração nos processos dependentes de energia; como a homeostase do cálcio. O

rompimento da regulação do cálcio leva a mudanças na liberação de neurotransmissores e à conseqüente alteração da atividade elétrica no cérebro, o que pode ser um importante fator para os efeitos neurotóxicos, tais como tremores e convulsões, causados pelo cianeto (ASTDR, 1993).

A intoxicação aguda por plantas cianogênicas tem sido controlada em vários países por meio de diversas medidas tais como educação, seleção de plantas e regulamentação governamental para importação das mesmas (POULTON, 1983). No entanto, a toxicidades subaguda e crônica do cianeto ainda não estão satisfatoriamente esclarecidas. De fato, diversos estudos são encontrados na literatura relacionando neuropatias como, por exemplo, a neuropatia atáxica tropical (OSUNTOKUM, 1981; OSUNTOKUM, 1994; OSUNTOKUM et al., 1969), a paraparesia espástica ou “konzo”, a neurite retrobulbar (ASTDR 1993), a atrofia óptica de Leber (ASTDR, 1993; FREEMAN, 1988) e a ambliopia por tabaco (SOLBERG, et al 1998).

Dentre as doenças citadas anteriormente, a neuropatia atáxica tropical (NAT) é a que mais se destaca no que se refere ao número de trabalhos encontrados na literatura (HIRANO et al., 1967; MAKENE; WILSON, 1972; MONEKOSSO; WILSON, 1966; OSUNTOKUM, 1981). Esta doença caracteriza-se por mielopatia, atrofia óptica bilateral, surdez bilateral e polineuropatia; além destas ocorrências, o Parkinson, a degeneração cerebelar, a psicose e a demência são também descritas (ASTDR, 1993; OSUNTOKUM, 1981; OSUNTOKUM, 1994; POULTON, 1983; ROMÁN, 1994; ROSLING, 1994).

Outra alteração que vem sendo associada à ingestão crônica de cianeto é o bócio, sendo esta afecção verificada tanto em humanos como nos animais. O efeito bociogênico não se faz pela presença direta do cianeto, mas sim, pelo seu principal

produto de biotransformação, o tiocianato (KANEKO, 1997). O tiocianato atua como substância anti-tiroideana, interferindo na elaboração dos hormônios tiroideanos por inibir a captação do iodeto pela tireóide e, conseqüentemente, impedindo a síntese e a liberação destes hormônios (KANEKO, 1997). Portanto, baixas concentrações destes hormônios, além de produzir os sintomas característicos do hipotireoidismo, causam aumento nos níveis séricos do hormônio tireotropina (TSH) o qual, por sua vez, produz aumento da tireóide, ou seja, o bócio. Como o crescimento e a diferenciação celular estão diretamente envolvidos com o metabolismo energético, sendo este relacionado aos hormônios tiroideanos (KANEKO, 1997), pode-se imaginar que estas funções serão comprometidas quando da intoxicação crônica pelo cianeto.

Vários estudos experimentais realizados em diferentes espécies animais, como suínos, (OKE, 1980; ONG, 1989; TEWE et al., 1984), ratos (EKPECHI et al., 1996; TEWE, MANER, GOMES 1977), coelhos (EKPECHI, 1992; RATNAKUMAR; RAJAN, 1992), cães (KAMALU; ANGHRANYA, 1991), caprinos (BAHRI, 1987; SOTO-BLANCO, 1999) e ovelhas (GUTZWILLER, 1993), verificaram que há diminuição nos níveis de hormônios tiroideanos e aumento da glândula tireóide nos animais tratados com cianeto ou plantas cianogênicas, sendo que estes também apresentavam altos níveis sangüíneos de tiocianato. Esta alteração, bem como aumento na quantidade de vacúolos de reabsorção no colóide dos folículos tiroideanos, também foram observados em caprinos, ratos e suínos expostos prolongadamente ao cianeto (MANZANO, 2001; SOTO-BLANCO, 1999, 2003; SOUSA 2000, 2004).

A nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade, decorrente da exposição prolongada ao cianeto foi descrita recentemente por Okolie e Osagie (1999), em coelhos e

posteriormente identificada em ratos (SOUSA, 2000) e em suínos (MANZANO, 2001). Além destes, existem outros estudos que mostram relações entre a ingestão de alimentos que contêm glicosídeos cianogênicos, com outras patologias. Neste sentido, Adams et al., (1969) observaram que animais da espécie eqüina, mantidos em pastagem de *Sorghum* sp, apresentaram cistite e ataxia enzoótica. Já McKenzie e McMicking (1977) verificaram um quadro semelhante em bovinos alimentados com o mesmo tipo de pastagem, incoordenação motora e incontinência urinária decorrente da degeneração valeriana da massa branca da medula espinhal e dos pedúnculos cerebrais e cerebelares.

Sugere-se ainda que uma outra afecção, o diabetes pancreático, esteja associada à intoxicação por cianeto, proveniente da mandioca (AKANJI e FAMUYIWA, 1993; KAMALU, 1991, MCMILLAN, GREEVARGHESE, 1979), e que esta alteração seja causada devido ao acúmulo de cianeto no plasma. Assim, supõe-se que esse acúmulo promoveria a destruição das ilhotas de Langerhan e a diminuição na produção de insulina, ocasionando o diabetes (POULTON, 1983). Por outro lado, deve-se considerar que pesquisas nas quais foram utilizados diferentes modelos animais, como em coelhos (OKOLIE; OSAGIE, 1999 e 2000), ratos (MATHANGI; NAMASIVAYAM, 2000; SOUSA, 2000) e suínos (MANZANO, 2001) a reprodução da doença não foi evidenciada.

1.2 SOBRE A TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Foi principalmente a partir de meados do século 20 que se instalou uma preocupação crescente quanto ao possível efeito sobre o embrião ou feto em desenvolvimento de substâncias ou organismos a que uma mulher grávida pudesse

estar exposta. A princípio, a identificação da síndrome da rubéola congênita em 1941 derrubou a idéia de que a placenta seria uma barreira eficaz de proteção contra organismos exógenos (WEBSTER, 1998). No entanto, foi somente na década de 60 que, devido à avaliação e interpretação incorreta de resultados experimentais levou-se à liberação e recomendação do uso, durante a gestação da talidomida, um medicamento utilizado como sedativo, empregado em situações para o controle de ansiedade e náuseas, o que acarretou em um tipo raro de mal formação congênita: a focomegalia, caracterizada por encurtamento dos membros, muitas vezes preservando as extremidades. Assim, após este episódio, houve a real conscientização da necessidade de testes eficazes de avaliação de risco da exposição a substâncias químicas.

A toxicologia do desenvolvimento se refere ao ramo da ciência médica preocupada com o estudo da contribuição ambiental ao desenvolvimento pré-natal alterado (SMITHELLS, 1980) e abrange o estudo da cinética, mecanismo de ação tóxico, patogênese e as conseqüências da exposição a agentes tóxicos ou condições que levam ao desenvolvimento anormal do animal (ROGERS; KAVLOCK, 2001). Este termo “toxicologia do desenvolvimento” está sendo empregado há, relativamente, pouco tempo; no entanto, tem suas raízes relacionadas à teratologia, um termo utilizado antigamente para denominar alterações de ordem estrutural no conceito. Etimologicamente, a teratologia refere-se ao estudo de monstros (originada da palavra grega *teratos*, que designa monstro); portanto, por um longo período de tempo seu campo de investigação restringiu-se apenas às alterações morfológicas, em particular, aquelas que envolviam o sistema esquelético. Por outro lado, estudos realizados no século passado mostraram claramente que outros sistemas do organismo também

poderiam ser comprometidos quando de uma injúria durante o desenvolvimento fetal. Consequentemente, o termo teratologia passou a ser utilizado como um sinônimo da toxicologia do desenvolvimento; no entanto, hoje abrange não só as anormalidades morfológicas, mas também avalia as manifestações no retardo de crescimento, as alterações funcionais, comportamentais e/ou morte da prole.

O desenvolvimento de mamíferos pode ser dividido em quatro períodos. O período de implantação, que compreende desde a fusão do óvulo e do espermatozóide até o implante do blastocisto no útero. A exposição a um agente tóxico nesta fase pode levar à embrioletalidade, sendo rara a ocorrência de teratogênese. O período de organogênese, organogenético ou embriogênico abrange desde a proliferação e migração celular até a formação de órgãos rudimentares. Neste período, poderá ocorrer a teratogênese, se as lesões produzidas por um agente tóxico forem compatíveis à vida; por outro lado, se não forem, haverá embrioletalidade. Finalmente, o período fetal e o neonatal, no qual todos os tecidos estão formados, e ocorre o crescimento e maturação fisiológica do animal e humana (BERNARDI, 2002; ROGERS; KAVLOCK, 2001).

1.3 O SUÍNO COMO MODELO NA EXPERIMENTAÇÃO

Desde os primórdios da medicina até os dias atuais, as mais diferentes espécies de animais vertebrados e invertebrados têm sido utilizadas como objeto de experimentação. Essa prática continua sendo amplamente empregada com o intuito de se desenvolver métodos e técnicas que possam gerar instrumentos de “cura” ou alívio para os males que acometem o homem e outros animais. Dentre as várias espécies utilizadas em experimentação biomédica destaca-se o porco (*Sus*

scropha). Como citado por Swinddle (1983), o uso do suíno em pesquisas científicas é uma prática antiga. Nos anos de 1540, Versalius, em sua famosa obra *De Humani Corporis Fabrica*, ao tentar descrever os mecanismos que regem o corpo humano; desenhou um porco sendo utilizado em experimentação da maneira como o médico grego Galeno o fizera há mais de mil anos antes. Segundo o autor essa deve ser a mais antiga ilustração do uso desses animais nas diferentes áreas da ciência. Em 1628, Willian Havey, que descreveu os mecanismos que regem a circulação sangüínea, também utilizou o suíno como animal de experimentação para melhor compreender a fisiologia humana. Segundo Swindle, Moody e Phillips (1992) esses estudos embasaram as normas da medicina experimental por Claude Bernard 250 anos após, normas essas que regem até os nossos dias, os procedimentos experimentais em biologia e medicina.

Tumbleson (1986) complementa que o suíno é um modelo útil para estudos em pesquisas biomédicas, pois apresenta similaridade de estrutura e funções com o homem, incluindo tamanho, padrão de alimentação, fisiologia digestiva, hábitos dietéticos, estrutura e funções do rim, estrutura vascular do pulmão, distribuição da artéria coronária, propensão para a obesidade, taxa respiratória e comportamento social. Uma vez que o suíno é um onívoro, é considerado um modelo adaptável para avaliar as exposições crônicas e agudas ao álcool, cafeína, tabaco, aditivos alimentares e poluentes do ambiente, entre outros. Além disto, esse animal tem sido usado com sucesso como modelo para avaliar várias doenças como o alcoolismo, diabetes, absorção, nutrição parental total, arteriosclerose, hipertensão, tumores, nefropatias, osteocondrose. Ainda, vem sendo empregado na pesquisa de transplante de órgãos, hemorragia e choque séptico (TUMBLESON, 1986).

1.3.1 Uso da Espécie Suína em Testes de Teratogenicidade

Muita controvérsia existe atualmente no que se refere à adequação e a validação dos métodos propostos pelas diferentes agências responsáveis pela regulamentação dos protocolos de avaliação de teratogenicidade. Assim, embora algumas modificações venham sendo feitos nestes protocolos, basicamente até hoje são usados modelos de mais de 40 anos atrás. Estes modelos foram diretamente influenciados pela tragédia ocorrida com a talidomida, que sem dúvidas, teve um papel fundamental para o desenvolvimento da teratologia; no entanto, a simples observação de malformações e/ou anomalias somente não traduzem o risco de teratogênese de uma dada substância química. Basicamente, um ponto deve ser reavaliado quando se consideram os atuais protocolos utilizados e este se refere justamente às espécies animais a serem escolhidas para a realização dos testes.

Sabe-se que não existe uma espécie animal que preencha totalmente as características da gestação em humanos, e o rato, por apresentar vários requisitos desejáveis, principalmente o baixo custo, é a espécie animal de escolha para os protocolos de avaliação de teratogenicidade. Por outro lado, deve-se incentivar a pesquisa relativa ao uso de outras espécies animais que possam melhor traduzir os potenciais riscos da exposição de mulheres gestantes às diferentes substâncias químicas. Entre algumas espécies que potencialmente teria grandes possibilidades para ser utilizada nos testes de teratogenicidade é a suína, já que possui, como exposto anteriormente, várias semelhanças anatômicas, fisiológicas e metabólicas com o ser humano. As vantagens da utilização desta espécie seriam o grande número de filhotes por prole (10 a 11); ciclo estral curto (o estro ocorre a cada 21

dias); precocidade para a maturação sexual da fêmea (ao redor de 7 meses); e gestação relativamente curta (ao redor de 114 dias). Além disto, a incidência de teratogênese sem causa aparente é bastante baixa nesta espécie (menor que 1%). Ainda, se comparado com o cão, há a grande vantagem de não haver uma relação afetiva tão grande com o homem.

Assim, o presente trabalho dá continuidade à Dissertação de Mestrado, intitulada “Avaliação da toxicidade do cianeto em suínos durante a fase de crescimento à terminação: aspectos bioquímicos e anatomopatológicos”, da qual foi possível obter informações sobre os efeitos tóxicos da administração prolongada ao cianeto, em diferentes doses, em suínos. Portanto, dando prosseguimento a esta pesquisa, agora procurou-se avaliar os efeitos da exposição deste agente, nesta mesma espécie animal, durante o período perinatal. Este estudo objetivou não só de avaliar a toxicidade reprodutiva do cianeto em suínos, mas também propor o protocolo de avaliação de risco de diversas substâncias (toxinas de plantas, micotoxinas, fármacos, aditivos alimentares etc.), utilizando o suíno como modelo animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a toxicocinética da biotransformação do cianeto, utilizando o tiocianato como biomarcador, na espécie suína, em diferentes fases fisiológicas.
- Avaliar os efeitos da administração oral de cianeto, em marrãs e em suas respectivas proles, durante o período perinatal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica para a determinação de tiocianato em soro, leite, colostro e líquido amniótico de suínos.
- Determinar a variação dos níveis séricos de tiocianato em fêmeas da espécie suína, em diferentes fases: creche (60dias de idade), crescimento/terminação (95dias de idade), gestação (com 80dias) e lactação (com 21dias).
- Verificar os possíveis efeitos tóxicos da administração de KCN, por via oral, em marrãs, durante a gestação.
- Verificar os possíveis efeitos tóxicos da administração de KCN, por via oral, na prole de marrãs expostas a diferentes doses de KCN, durante a gestação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução desta tese foram utilizados os seguintes materiais e métodos:

3.1 Animais

Foram utilizados fêmeas da espécie suína para os experimentos envolvendo a cinética do cianeto, sendo: seis em fase de creche, com 60 dias de idade, pesando 25Kg; cinco, em fase de crescimento/terminação, com 95 dias de idade, pesando ao redor de 35Kg; cinco prenhes, primíparas, no 80º dia de gestação, pesando em média 210Kg e seis lactantes, em diestro, pesando em média 180Kg.

Quanto aos estudos sobre os efeitos tóxicos do cianeto durante o período perinatal foram utilizadas 24 fêmeas, adultas primíparas, em idade reprodutiva ($\pm$ 195 dias de idade), pesando, em média, 160Kg, bem como machos reprodutores das raças *Landrace* e *Large White*.

Todos os animais foram obtidos da Suinogem Genética e Reprodução Ltda (Distrito de Tiberiçá, Cidade de Bauru) e alojados na suinocultura da Prefeitura do Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo (PCAPS-USP). Estes animais foram colocados no experimento após um período de, no mínimo, 30 dias após a chegada. Os experimentos foram realizados neste mesmo local. Um período anterior ao desenvolvimento da pesquisa, realizou-se o exame sorológico para doença de Aujeszky, síndrome reprodutiva e respiratória de suínos, *Compylobacter*

sp, *Mycobacterium avium* e *Brucella suis*, principais patologias que envolvem abortamento em suínos⁷.

3.2 Material

Para a realização dos diversos experimentos foram utilizados os materiais descritos abaixo.

3.2.1 Reagentes:

- Ácido Clorídrico (HCl) 1M, 12N e 0,5N (Ecibra®);
- Ácido Tricloro Acético (Vetec®),
- Água de Bromo Saturada (Haloquímica®);
- Bissulfito de sódio (Reagem®).
- Cianeto de potássio (KCN) (Nuclear®);
- Hidróxido de Sódio em lentilha (NaOH) 0,1M (Merk®);
- Piridina (Merk®);
- Solução Padrão de tiocianato;
- Solução p- fenilenodiamina (p-FDA)-(Sigma®),

⁷ O Dr Prof Silvio Arruda Vasconcelos, do Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, foi o responsável por essas análises.

- Trióxido de Arsênico (As_2O_3)(Sigma®);

3.2.2 Soluções:

3.2.2.1 Solução p-FDA:

Esta solução, corresponde à adição de 2 g de p-FDA em um litro de HCl 0,5M. O p-FDA apresenta-se como cristais brancos ou ligeiramente avermelhados. Esta substância química é facilmente oxidada em presença de ar, adquirindo uma coloração amarronzada. Neste caso, faz-se necessário a recristalização, que constitui em dissolver 5g de p-FDA em 20 ml de água quente com 0,5g de carvão ativado e 0,2g de bissulfeto de sódio; filtrar a quente e resfriar o filtrado numa mistura de gelo e sal. Os cristais obtidos devem ser filtrados em funil de Butchner com papel de filtro e lavados com 2 ml de água gelada. Os cristais devem ser secos em dissecador ao abrigo da luz, com vácuo.

3.2.2.2 Solução de piridina:

Esta solução, consistiu em misturar 6 partes iguais de piridina com 1 parte de HCl a 12N e 4 partes de água destilada. Esta solução deve ser preparada na capela e em banho-maria.

3.2.2.3 Mistura de piridina- p- FDA:

Esta mistura consiste em 3 partes iguais de piridina para 1 parte de p-FDA. Fazer no dia de usar.

3.2.2.4 Solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10%:

Esta solução foi feita da seguinte maneira: dissolveu-se 100g de TCA (grau PA) e completou-se, para 1 L com água destilada; a solução resultante foi filtrada e armazenada em frasco previamente identificado.

3.2.3 “kits” Comerciais:

- Para dosagem de glicose (Reactoclin-Celm®), colesterol (Celm®), uréia e creatinina (Merck®);
- Para dosagem enzimática de gama-glutamilttransferase (GGT), aspartato-aminotransferase (AST), alanina- aminotransferase (ALT) (Diasys®);
- Para dosagens hormonais de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (Coat-a-Count®, *Diagnostic Products Corporation*, DPC);
- Para citologia vaginal, Panótico Rápido (Merck®).

3.2.4 Ração Comercial:

Durante os experimentos utilizou-se ração comercial para suínos, produzida no próprio Campus Administrativo de Pirassununga, compatível para as diferentes fases: gestação, lactação, creche, crescimento e terminação.

3.3 APARELHAGEM

Espectrofotômetro B382 Micronal regulado para um comprimento de onda 540 nm, para a dosagem de tiocianato; aparelho de ultra-som PIE Medical® scanner 100LCVet ; transdutor setorial 5,0MHz e microconvexo de 7,5MHz, para diagnóstico de prenhez, centrífuga Excelsa Baby II FANEM Modelo 206R, para a obtenção do soro e Sistema Bioquímico Automático -CELM®, SAB-200, para as dosagens bioquímicas.

3.4 PROCECIMENTOS

Para a execução dos diversos experimentos foram realizados os procedimentos descritos abaixo.

3.4.1 Alimentação dos Animais

A quantidade diária de ração administrada foi de 3 a 4 Kg de ração fracionada duas vezes ao dia, uma pela manhã, e outra à tarde para as fêmeas gestantes. Para as proles a ração foi oferecida *ad libitum*.

A água foi administrada *ad libitum* tanto para as mães com para as proles.

3.4.2. Manejo para o Acasalamento por Monta Natural e ou Inseminação Artificial

O primeiro passo para este procedimento foi a identificação do cio; para tal, observou-se diariamente o comportamento das fêmeas por, no mínimo, duas vezes ao dia (manhã e tarde). A fêmea apresenta alterações características no comportamento e modificações no organismo em períodos diferenciados; a saber:

PRÓ ESTRO: Alterações no comportamento de dois a quatro dias, em média, antes do início do cio, vulva inchada e avermelhada, secreção vulvar com consistência de muco aquoso, nervosismo, redução do apetite, salta sobre as companheiras, mas não aceita o salto de outra (Figura 3)

ESTRO ou CIO: imobilidade, membros posteriores afastados, cabeça baixa, movimento de elevação das orelhas, aceitação do salto e da cópula, e apresenta tolerância à pressão do criador sobre o lombo e os flancos (Figuras 3 e 4).

PÓS ESTRO volta à normalidade: recupera o apetite e as atividades normais, mas não tolera a monta do macho ou da pressão lombar.

O acasalamento das fêmeas foi realizado por meio de monta natural e/ou, então, por inseminação artificial. A realização deste último procedimento foi condicionada à observação de mais de uma fêmea no cio. Estes animais foram submetidos ao acasalamento somente quando apresentavam peso maior ou igual a 120Kg, com idade aproximada de 8 meses e no momento em que foi detectada a presença de três cios corridos.

Figura 3 - Fêmea em baixo em estro, em cima pró estro.

Figura 4- Fêmea em estro

Procurou-se utilizar o mesmo cachaço para cobrir e/ou inseminar estas fêmeas. Na eventual impossibilidade deste procedimento foi utilizado um outro macho, irmão deste cachaço.

Foram realizados passeios com o cachaço, para indução e identificação do cio durante o período da manhã e da tarde. Uma vez identificado o 3º cio das fêmeas, estas foram cobertas e/ou inseminadas, e a não repetição deste, após 21 dias,

juntamente com a realização do exame ultra-sonográfico permitiu confirmar a prenhez.

Para a coleta de sêmen, o reprodutor foi treinado para subir no manequim, com o auxílio de uma porca no cio. Este procedimento foi realizado sempre no período matutino (a partir das 7:00h), com prévia higienização do prepúcio e empregando-se o método da mão enluvada (KING; MACPHETERSON, 1973). Foram utilizados frascos graduados, adaptados com papel filtro e protegidos por um recipiente isotérmico (Figuras 5 e 6).

Figura 5- Método da mão enluvada

Figura 6- Método da mão enluvada

Imediatamente após a coleta de sêmen, as amostras deste foram encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia de Sêmen e Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP (Pirassununga), para a avaliação dos seguintes parâmetros: volume do ejaculado, fração gelatinosa, pH do sêmen, motilidade e vigor espermático, aglutinação, concentração espermática e número total de células espermáticas⁸.

⁸ Foram avaliadas segundo as amostras encaminhadas com emprego da técnica tripla coloração com sondas fluorescentes sob orientação do Professor Doutor Aníbal de Sant'Anna Moretti do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), FMVZ/USP.

A inseminação artificial foi realizada, utilizando-se pipetas de borracha, devidamente esterilizadas em nosso laboratório e embaladas em papel de embrulho. Fez-se a higienização da vulva com auxílio de papel higiênico, a seco ou com água deionizada. Cortou-se a ponta do adaptador do frasco de sêmen (bisnaga), retirou-se a pipeta do papel, umedeceu-se a ponta da mesma com algumas gotas do sêmen, abriu-se, lentamente, os lábios vulvares com a mão esquerda e com a direita introduziu-se a pipeta de inseminação artificial na vulva, na direção dorso-cranial (levemente dirigida para cima e para frente), com leves movimentos de rotação para a esquerda, até a fixação na cervix; a seguir, coaptou-se o frasco de sêmen à pipeta fazendo-se leve pressão sobre o frasco durante um período mínimo de 4 min., com a finalidade de introduzir o sêmen dentro da cervix. Procurou-se utilizar sempre o sêmen fresco (Figuras 7-9).

Figuras 7 a 9- Procedimentos realizados na inseminação artificial

3.4.3 Caracterização do Diestro

Para a identificação deste período do ciclo estral, realizou-se esfregaço vaginal, procedendo-se, à seguir, à citologia vaginal. Para tal, as lâminas obtidas do esfregaço foram submetidas ao procedimento para coloração com panótico da seguinte forma: colocou-se em três beckers os corantes panóticos nº 1, 2 e 3; em seguida, as lâminas foram imersas no corante nº1 (coloração verde) por 5 segundos (5 imersões de 1 segundo), deixou-se escorrer bem e, posteriormente, as lâminas foram imergidas no panótico rápido nº 2 (coloração vermelha) e, consecutivamente, no de nº 3 (coloração azul). Ao final deste procedimento as lâminas foram lavadas com água deionizada, secas ao ar, e examinadas em microscópio de luz; a observação de células parabasais em maior número caracterizou o diestro. Além deste procedimento, observou-se a não tolerância à monta ao macho e resposta negativa quando da compressão lombar.

3.4.4 Administração do Cianeto de Potássio

A administração do cianeto foi feita por via oral, juntamente com a ração, pela manhã (às 8:00h) e à tarde (às 17:00h), em cochos individuais de madeira, permitindo, desta maneira precisar a quantidade exata de cianeto para cada animal (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Administração de KCN para várias marrãs ao mesmo tempo

Figura 11- Detalhe da Marrã comendo ração com KCN

Para aqueles experimentos envolvendo a cinética, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas, administrando-se o KCN também por via oral, juntamente com 200 gramas de ração comercial, na dose única de 3,0mg/kg, no período da manhã (às 8:00h).

3.4.5 Avaliação do Peso e Ganho de Peso

Foram realizadas pesagens individuais das gestantes, semanalmente, durante todo o período experimental (114 dias). O cálculo do ganho de peso seguiu a seguinte equação: Peso final – peso inicial.

Para os filhotes destas mães foram realizadas pesagens ao nascer, aos 21, 42, 60 e 120 dias de idade. O ganho de peso foi calculado conforme equação acima (1º ao 120º dia pós nascimento). Também estimou-se o ganho de peso médio, para cada fase de vida desses animais: ao nascer (PLN); inicial ou maternidade, até 21 dias idade (GPMDD); recria ou creche, de 35 até 75 dias de idade (GPMDC); crescimento e terminação, de 75º até o 120º dia de idade (GPMCT), da seguinte maneira:

$$\text{PLN} = \frac{\text{soma do peso dos leitões nascidos vivos}}{\text{número total de leitões vivos pesados}}$$

$$\text{GPMD} = \frac{\text{peso final total} - \text{peso inicial total}}{\text{número de suínos no final de cada fase} \times \text{número total de dias do período}}$$

3.4.6 Coleta de Sangue

Os animais foram contidos por meio de cachimbo (Figura 12), coletou-se o sangue por punção da veia carótida externa, em seringas descartáveis não heparinizadas (Figura 13). Após este procedimento, este material biológico foi centrifugado por 15 min. a 3000 rpm e o sobrenadante, o soro, acondicionado individualmente, em tubos plásticos (Eppendorf®), devidamente identificados e estocados, em congelador a -20°C, até o processamento.

Figura 12- Contenção do animal por meio de cachimbo

Figura 13- Coleta de sangue

3.4.7 Coleta de Colostro e Leite

As coletas de colostro e leite foram feitas com auxílio de copos coletores, pressionando-se com os dedos a glândula mamária. Na eventual não obtenção de uma amostragem razoável (2mL), utilizou-se ocitocina, na dose preconizada e aguardou-se 10 minutos. Após este procedimento, os copos foram devidamente marcados e as amostras biológicas congeladas a -20°C , até o processamento. (Figura 14).

Figura 14 -Coleta de colostro e/ou leite

3.4.8 Coleta do Líquido Amniótico

Este procedimento foi realizado durante o abate das gestantes para retirada dos diferentes fragmentos de órgãos. Foi realizada incisão crânio caudal da cavidade abdominal e subsequente exposição do útero e placenta. O líquido amniótico foi coletado de 5 sacos embrionários (5mL de cada), utilizando-se seringas descartáveis. Após este procedimento, esse material foi acondicionado individualmente em tubos plásticos, devidamente identificados e estocados em freezer -20°C até o processamento.

3.4.9 Dosagem de Tiocianato no Soro, no Leite, no Colostro e no Líquido Amniótico:

Em um tubo de ensaio, pipetou-se 0,2 mL de soro, leite, colostro e líquido amniótico, e 1,8 mL de solução de ácido tricloroacético a 10%. Logo após a homogeneização, esse material foi centrifugado a 10.000 rpm, por 20 minutos. Posteriormente, pipetou-se 0,5 mL do sobrenadante em um tubo de ensaio e adicionou-se 0,25mL de HCl 1M e agitou-se. Adicionou-se 0,05 mL de água de bromo saturada e agitou-se novamente; em seguida, adicionou-se 0,10mL de solução de trióxido de arsênico, agitou-se e colocou-se 0,90 mL da mistura de piridina-pFDA. Após 15 min., foi realizada a leitura no espectrofotômetro, a 540 nm contra um branco de reativo. A concentração de tiocianato destas substâncias foi

calculada com o auxílio da curva montada a partir da solução-padrão de tiocianato de potássio, que sofreu o mesmo procedimento.

3.4.10 Dosagem Bioquímica

Foram dosados os níveis séricos de glicose, colesterol, uréia, creatinina, gama-glutamyltransferase (GGT), aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), dos animais experimentais e controle através de Kits comerciais (Diasys® e Coat-a-Count®, *Diagnostic Products Corporation*, DPC). As dosagens foram feitas no mesmo dia ou, caso contrário, este material foi congelado à temperatura de -20°C, por um período nunca superior àquele recomendado pelos Kits.

3.4.11 Dosagem de T3 e T4 Livres

As amostras de soro das mães aos 110 dias de gestação foram encaminhadas ao CRIESp, Laboratório de Análises Clínicas⁹. As análises dos hormônios T3 e T4 foram realizadas através de Eletroquimioluminescência.

⁹ O Dr. Mario Giovani Pradal foi o médico-endocrinologista, responsável por esta análise

3.4.12 Ultra-Sonografia

O exame ultra-sonográfico foi realizado por meio do aparelho PIE Medical scanner 100LCVet, durante o período gestacional, no 21º dia após a cobertura e ou inseminação. Este exame foi feito por via transcutânea, procurando-se observar presença ou não de vesículas embrionárias, indicativas de prenhez (Figuras 15 e 16). Os animais foram examinados em estação no momento do exame; a superfície de contato do transdutor foi coberta com gel, carboximetilcelulose (Figura 17), para garantir a propagação do som, e este foi posicionado nos flancos direito e esquerdo, aproximadamente no ponto médio entre a articulação fêmuro-tíbio-patelar e a última costela, 10 cm acima do teto (Figura 18); como pontos de referência, foram considerados a localização dos ovários e conseqüentemente útero e placenta, a bexiga, na posição caudal, e as alças intestinais, na posição cranial. Este procedimento foi realizado durante os seguintes dias de gestação: 35º, 45º, 55º e 65º dia, e teve como objetivo mensurar os parâmetros apresentados a seguir: comprimento crânio caudal - CCC (Figuras 19 e 20), diâmetro torácico - DT (Figura 21), diâmetro abdominal - DA (Figura 22), diâmetro biparietal - DBP (Figura 23), bem como a presença ou não de filhotes.

Figura 15 - Diagnóstico de prenhez positiva (21ºdia)

Figura 16 - Diagnóstico de prenhez positiva (35ºdia)

Figura 17- Procedimento de US

Figura 18 - Procedimentos para localizar o útero

Figura 19 - Imagem ultra-sonográfica, medindo o comprimento crânio caudal no 45º dia de gestação

Figura 20 - Imagem ultra-sonográfica, medindo o comprimento crânio caudal no 55º dia de gestação

Figura 21 - Imagem ultra-sonográfica, medindo o diâmetro torácico no 65º dia de gestação

Figura 22 - Imagem ultra-sonográfica medindo o diâmetro abdominal no 65º dia de gestação

Figura 23 - Imagem ultra-sonográfica, medindo o diâmetro biparietal no 65º dia de gestação

3.4.13 Manejo Zootécnico das Proles

Foram realizados manejos zootécnicos após o nascimento. Todas as mães tiveram seus partos assistidos (Figuras 24-27) e quando se fez necessário, houve intervenção, tomando-se os seguintes cuidados: limpeza das mãos e braço com água e sabão, higienização do posterior e principalmente da vulva, lubrificação da mão e do braço com glicerina. No auxílio ao parto, fez-se a introdução da mão e dedos em forma de concha, tomando o cuidado para evitar lesões, ao encontro do leitão; este foi tracionado vagarosamente, pela cabeça ou membros, esperando

sempre a contração da mãe (Figuras 28 e 29). O parto foi concluído quando a fêmea liberou as placentas em igual número de leitões nascidos.

Figuras 24- 27-Sequência de eventos até o nascimento dos fetos

Imediatamente após o nascimento, procedeu-se à secagem dos filhotes esfregando-se o papel toalha por todo o corpo (Figura 30).

Considerando-se que o cordão umbilical é uma porta de entrada para infecções, após o seu corte fez-se a desinfecção com tintura de iodo a 5 ou 7%. Para este procedimento, foi feito amarração do cordão com barbante numa distância de 3 a 4cm do abdômen (hemostasia) e, posteriormente, cortou-se com tesoura. A seguir, procedeu-se ao corte dos dentes, que foi realizado com auxílio de um alicate, bem rente à gengiva, tomando o devido cuidado para não lesioná-la. Foram retirados os quatro dentes superiores e inferiores dos leitões (Figura 31). Após esta prática os

leitões foram colocados no escamoteador por alguns minutos e auxiliados na primeira mamada.

Figura 28 - Porca em trabalho de parto, sendo auxiliada

Figura 29 - Retirada de um natimorto do útero

Figura 30- Secagem e limpeza do leitão

Figura 31- Prática da corte dos dentes

3.4.14 Abate e Exame Anátomo-Patológico

Os animais foram abatidos no Matadouro-Escola da PCAPS-USP.

Uma mãe por grupo (controle e experimental) foi abatida no 110º dia de gestação, para coleta de fragmentos representativos de diferentes órgãos: tireóide, coração, pulmão, pâncreas, baço, fígado, rim e cérebro.

A prole daquelas mães que prosseguiram com a gestação foi abatida aos 120 dias após o nascimento.

Inicialmente foi realizada a insensibilização pelo método do atordoamento, no qual consiste em insensibilização elétrica com tensão de 220V, amperagem entre 1,2 e 1,5 A, frequência de 60Hz, tendo tempo de contato dos eletrodos entre a cabeça e paleta dos animais de 3 segundos. Após esse procedimento, o animal ficou inconsciente, suas patas traseiras foram presas em uma corrente e procedeu-se à sangria, por meio de incisão na veia jugular, em posição vertical (animal suspenso na nória).

Após a sangria, os suínos foram lavados com água fria para eliminar o sangue presente. As mães foram colocadas em uma mesa e prosseguiu-se com a abertura da cavidade abdominal, através de incisão crânio caudal, e retirada subsequente dos órgãos, citados anteriormente, para coleta de fragmentos representativos dos mesmos, nos quais foram devidamente fixados em formol 10%. Quanto a prole, após a sangria, foi escaldada, para facilitar a remoção dos pêlos. Este procedimento foi feito por imersão em água a 61°C por 3 a 4 minutos.

Após a escaldagem, prosseguiu-se com a depelagem em máquina, com acabamento à mão, para a retirada de unhas e pêlos. Em seguida, os animais foram pendurados pelos tendões das patas traseiras e eviscerados.

Para a realização da evisceração, cortou-se ao redor do reto amarrando-o, impedindo, desta maneira, que não houvesse contaminação da carcaça pelas fezes. As vísceras foram retiradas e dividiu-se a carcaça ao meio com o auxílio de

uma serra elétrica. Após este procedimento, realizou-se pesagem das carcaças (quentes), leitura da espessura de toucinho e retirada de fragmentos de medula espinhal. Depois de tais procedimentos, as carcaças foram colocadas em câmara fria a -25°C , por uma hora e meia, para sofrerem um choque térmico, e, a seguir, para a câmara de equalização a -10°C . No dia seguinte, foram efetuadas as pesagens das carcaças frias.

Durante a depelagem foi realizada a coleta da glândula tireóide. Para tal, realizou-se uma incisão cervical ventral, próximo ao primeiro anel da traquéia. A tireóide foi então retirada com cuidado, com o auxílio de uma pinça e um bisturi. Após este procedimento, esta glândula foi devidamente pesada e fixada em formol a 10%, por 3 dias, sendo posteriormente, colocada em álcool 70%.

No momento da evisceração, foi realizada a inspeção macroscópica dos órgãos dos animais, retirando-se fragmentos representativos de tecido hepático, pancreático, renal, cardíaco, pulmonar, esplênico e do sistema nervoso central. Estes fragmentos foram fixados em formol 10%. Após a fixação do sistema nervoso central (SNC), foram feitos cortes seriados para a separação de fragmentos contendo córtex, hipocampo e cerebelo.

Para a confecção das lâminas, todos os fragmentos provenientes de mães e prole foram incluídos em parafina, cortados com 5 μm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE), para observação de possíveis lesões microscópicas¹⁰.

¹⁰ Análise histopatológica dos órgãos foi feita sob orientação da Prof. Maria Lucia Zaidan Dagli e do Prof Dr. Paulo César Maiorka, no departamento de Patologia Experimental e Comparada (VPT) da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.4.15 Rendimento de Carcaça

Este procedimento foi realizado somente para as proles. O rendimento de carcaça quente e fria dos animais foi calculado por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{rendimento de carcaça quente} = \frac{\text{peso de carcaça quente}}{\text{peso animal vivo}} \times 100$$

$$\text{rendimento de carcaça fria} = \frac{\text{peso de carcaça fria}}{\text{peso animal vivo}} \times 100$$

3.4.16 Avaliação da Espessura de Toucinho e Espessura Relativa de Toucinho

Após a tomada de peso dos animais abatidos, com o auxílio de um paquímetro mensurou-se a espessura de toucinho entre a 10^a e a 11^a vértebra torácica; e calculou-se a espessura relativa do toucinho utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{espessura relativa de toucinho} = \frac{\text{espessura de toucinho}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

3.4.17 Avaliação do Peso e do Peso Relativo da Tireóide das Proles ao Abate

Após a tomada de peso vivo dos animais abatidos, e coleta da tireóide, essa foi pesada em balança analítica, e procedeu-se ao cálculo do peso relativo da seguinte forma:

$$\text{Peso relativo da tireóide} = \frac{\text{peso das glândulas}}{\text{peso vivo do animal}} \times 100$$

3.4.18 Cálculos dos Índices Zootécnicos; Mortalidade e Desempenho

A mortalidade foi medida pelo número de natimortos por leitegada (MNL); considerou-se morto ou natimorto o leitão que, ao nascer, tinha todas as estruturas formadas e não se movimentava. O número de leitões mumificados (NML) também foi incluído.

$$\text{MNL} = \frac{\text{total de leitões nascidos mortos}}{\text{número de leitegadas paridas}} \times 100$$

$$\text{MLM} = \frac{\text{total de leitões mumificados}}{\text{número de leitegadas paridas}} \times 100$$

A taxa de mortalidade do nascimento ao desmame (MND) expressa o número de leitões mortos no período entre parto e o desmame. Neste caso, considerou-se leitão nascido vivo aquele que nasceu e se afastou do posterior da mãe. Essa taxa fornece informações sobre o manejo e a sanidade durante este período. Para tanto, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{MND} = \frac{\text{número de leitões mortos}}{\text{número de leitões nascidos vivos}} \times 100$$

As taxas de mortalidade na creche (MC) e na fase de crescimento/terminação (MCT) expressam a mortalidade dos animais nestas fases e foram calculadas ao término destas, da seguinte maneira:

$$MC = \frac{\text{número de mortos na creche}}{\text{número total de animais no lote}} \times 100$$

$$MCT = \frac{\text{número de mortos no crescimento/terminação}}{\text{número total de animais no lote}} \times 100$$

Para o cálculo do peso médio do leitão ao nascer (PLN), dividiu-se o peso total de todos os leitões ao nascer pelo número de leitões que foram pesados.

$$PLN = \frac{\text{soma do peso dos leitões nascidos vivos}}{\text{número total de leitões vivos pesados}}$$

O número médio de leitões desmamados por leitegada parida (LDL) foi calculado dividindo-se o número de leitões desmamados de um grupo ou de um período de tempo, pelo número de leitegadas paridas para produzir esses leitões.

$$LDL = \frac{\text{número de leitões desmamados}}{\text{número de leitegadas nascidas}}$$

A porcentagem de leitões desmamados (%LD) expressa o número de leitões nascidos vivos e que foram desmamados e a porcentagem de leitões mortos entre o parto e o desmame.

$$\%LD = \frac{\text{número de leitões desmamados}}{\text{número de leitões nascidos vivos}} \times 100$$

O peso médio ao desmame (PMD) foi obtido dividindo-se o peso dos leitões desmamados pelo número de leitões.

$$PMD = \frac{\text{peso dos leitões desmamados}}{\text{número de leitões desmamados}}$$

O ganho de peso médio diário (GPMD) é o ganho/dia de peso por suíno durante um período de tempo definido e foi descrito no item 3.5.2.

$$GPMD = \frac{\text{peso final total} - \text{peso inicial total}}{\text{número de suínos no final} \times \text{número total de dias no período}}$$

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 Experimento 1: Validação da Metodologia para Determinação de Tiocianato, por Espectrofotometria, em Soro, Leite e Colostro, e Líquido Amniótico de Suínos

A determinação dos níveis de tiocianato no soro, leite, colostro e líquido amniótico, de suínos, foi realizada de acordo com a metodologia de Pettigrew e Fell (1972), modificado neste laboratório. Na validação desta metodologia procedeu-se ao estudo da linearidade da resposta, confecção da curva de calibração, determinação da precisão e recuperação do tiocianato.

A linearidade da resposta, que é o intervalo de concentração no qual o valor da absorbância é diretamente proporcional à concentração da amostra, foi verificada por meio da utilização de soluções padrão de KSCN e submetidas ao processo analítico, conforme o item 3.4.9. Para isto, foram preparadas 3 soluções mães de KSCN de concentrações 100, 200 e 300 mcmol/L, das quais foram obtidas as concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200 e 300mcoml/L. Essas concentrações foram processadas 10 vezes cada, conforme no item 3.4.9. Em seguida, calculou-se a média e o erro padrão de cada concentração em estudo. A correlação entre as concentrações de tiocianato nas soluções padrão e os valores obtidos das absorbâncias foi utilizada para a curva de calibração.

Para a determinação da precisão da metodologia intralaboratorial, realizou-se a análise dos níveis de tiocianato, conforme item 3.4.9 da solução padrão de 100mcmol/L de tiocianato e de um *pool* de amostras de soro, leite e líquido

amniótico, por cinco vezes cada, em dois dias diferentes. Calculou-se o coeficiente de variação ou imprecisão pela fórmula:

$$CV= S.100/X$$

Onde: CV: coeficiente de variação,

S desvio padrão,

X=média das replicatas.

A porcentagem de recuperação do tiocianato, pelo método empregado, foi determinada por meio da relação obtida entre as médias das absorbâncias de 5 amostras das soluções de 100 e 200 mcmol/L de KSCN e as médias das absorbâncias de 5 amostras de soro, leite, colostro e líquido amniótico, de suínos do grupo controle. Estas amostras foram submetidas ao processo analítico, contra o branco dos reativos e das amostras dos meios biológicos descritos. Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula:

$$R=X.100/Y$$

Onde: R: porcentagem de recuperação,

X: média da concentração da solução padrão,

Y:média da concentração do meio biológico estudada adicionando do analito.

3.5.2 Experimento 2: Estudo da Cinética de Transformação do Cianeto em Tiocianato em Suínos, Fêmeas, com 60 Dias de Idade

Foram utilizados seis suínos, fêmeas, em fase de creche, com 60 dias de idade, nas quais foi administrado, por via oral, conforme procedimento descrito em 3.4.4, o KCN, na dose única de 3,0 mg/Kg no período da manhã. O sangue destes animais foi coletado conforme o item 3.4.6 antes da administração do cianeto e, 15, 30 minutos; 1; 3; 6; 9; 12; 15, 18 e 24 horas após a administração do KCN. As amostras assim obtidas foram utilizadas para dosar o tiocianato conforme descrito no item 3.4.9.

3.5.3 Experimento 3: Estudo da Cinética de Transformação do Cianeto em Tiocianato, em Suínos, Fêmeas, na Fase de Crescimento/Terminação, com 95 Dias de Idade

Foram utilizadas cinco fêmeas adultas, com 95 dias de idade, sabidamente na fase de diestro, por meio de avaliação como descrito no item 3.4.3. Na manhã seguinte realizou-se novamente a pressão lombar e após resposta negativa procedeu-se a administração por via oral de KCN, na dose única de 3,0 mg/Kg, conforme procedimento descrito em 3.4.4. O sangue destes animais foi coletado conforme o item 3.4.6 antes da administração do cianeto e, 15, 30 minutos, 1; 3; 6;

9; 12; 15, 18 e 24 horas após a administração do KCN. As amostras assim obtidas foram utilizadas para dosar o tiocianato conforme descrito no item 3.4.9.

3.5.4 Experimento 4: Estudo da Cinética de Transformação do Cianeto em Tiocianato em Suínos, Fêmeas, no 80º Dia de Gestação

Foram utilizadas cinco marrãs, adultas, no 80º dia de gestação. Administrou-se, nestes animais, por via oral, conforme procedimento descrito em 3.4.4, o KCN, na dose única de 3,0 mg/Kg. O sangue das marrãs foi coletado, conforme descrito no item 3.4.6, antes da administração do cianeto e, 1; 3; 6; 9; 12; 15 e 21 hs¹¹ após a administração do KCN. As amostras, assim obtidas, foram utilizadas para dosar o tiocianato, conforme descrito no item 3.4.9.

3.5.5 Experimento 5: Estudo da Cinética de Transformação do Cianeto em Tiocianato em Suínos, Fêmeas, em Diestro, no 21º Dia de Lactação

Foram utilizadas seis porcas, adultas, no 21º dia de lactação. Administrou-se, nestas fêmeas, por via oral, conforme procedimento descrito em 3.4.4, o KCN, na dose única de 3,0 mg/Kg. O sangue e o leite destes animais foram coletados,

¹¹ Como a retirada de sangue destes animais é muito estressante e na última coleta de sangue (15ª h), verificou-se que estas fêmeas apresentavam as veias já bastante comprometidas, optou-se, então, por realizar apenas mais uma coleta, na 21ª h, que seria intermediária entre a 18ª e 24ª h.

conforme os itens 3.4.6 e 3.4.7 respectivamente, antes da administração do cianeto e, 1; 3; 6; 9; 12; 15, 18 e 24 hs após a administração do KCN. As amostras, assim obtidas, foram utilizadas para dosar o tiocianato, conforme descrito no item 3.4.9.

3.5.6 Experimento 6: Efeitos da Administração de KCN em Marrãs durante a Gestação: Avaliação Bioquímica e Anátomo-Patológica

Foram utilizadas 24 marrãs, divididas em 4 grupos iguais. A partir da detecção da prenhez (21 dias após o acasalamento e/ou inseminação), que foi confirmada conforme descrito no item 3.4.2, os animais dos distintos grupos experimentais receberam, por via oral, como descrito no item 3.4.4, as diferentes doses de KCN, a saber: 2.0; 4.0 e 6,0 mg/Kg¹². As fêmeas pertencentes ao grupo controle receberam somente ração comercial. Durante este período, coletas de sangue foram realizadas aos 21, 50, 80 e 110 dias da gestação, conforme item 3.4.6, para a realização das dosagens de tiocianato (item 3.4.9), e das seguintes substâncias: GGT, AST, ALT, uréia, creatinina, glicose e colesterol conforme descrito no item 3.4.10. No 110º dia de gestação procedeu-se também a coleta de sangue para análise de hormônios tiroideanos (item 3.4.11).

Uma mãe por grupo foi abatida no 110º dia de gestação para estudo anatomo-patológico (item 3.4.14).

¹² Estas doses de KCN foram escolhidas, tomando-se como base os dados de um experimento “piloto”, realizado em nosso laboratório

3.5.7 Experimento 7: Avaliação de Tiocianato no Líquido Amniótico e Colostro de Marrãs, tratadas com Diferentes Doses de KCN, por Via Oral, durante a Gestação

Daquela mãe que foi abatida no 110º dia de gestação para estudo anatomo-patológico (veja item 3.5.6), retirou-se também o líquido amniótico, conforme o item 3.4.8, para verificar os níveis de tiocianato (item 3.4.9).

As mães dos grupos, controle e experimentais, tiveram seus partos assistidos e coletou-se, nesta ocasião, o colostro, conforme o item 3.4.7 para a dosagem de tiocianato (item 3.4.9).

3.5.8 Experimento 8: Efeitos da Administração de KCN em Marrãs durante a Gestação: Acompanhamento do Desenvolvimento Fetal por Ultra-Sonografia, Avaliação Pós-Natal e Anatomo-Patológica da Prole

Durante o período de prenhez de 20 fêmeas foi realizada a avaliação por ultrassom de 1 feto por mãe, pertencente aos grupos, controle e experimentais, aos 21, 35, 45, 55 e 65 dias de gestação, para as mensurações de: comprimento crânio-caudal (CCC), diâmetro torácico (DT), diâmetro abdominal (DA) e diâmetro biparietal (DBP) conforme descrito no item 3.4.12.

Dois filhotes de cada uma daquelas mães que prosseguiram na gestação foram submetidos à eutanásia, ao nascimento, para retirada de fragmentos

representativos de órgãos, para o estudo anatomo-patológico (item 3.4.14). O restante dos filhotes das mães pertencentes aos diferentes grupos, controle e experimentais, foram assistidos até o abate, registrando-se o peso e o ganho de peso (item 3.4.5) e procedendo-se às coletas de sangue (item 3.4.6) aos 7, 14, 21 e 45 dias após o nascimento, para análise bioquímica (item 3.4.10) e de tiocianato (item 3.4.9). Ao abate, avaliou-se o rendimento de carcaças, quente e fria (3.4.15), espessura de toucinho (3.4.16), peso relativo de tireóides (g/100) (item 3.4.17) e exame anatomo-patológico de diferentes órgão (item 3.4.14). Do nascimento até o abate, essas proles foram avaliadas procedendo-se com a medição de mortalidade e desempenho (3.4.18).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados na forma de média, seguidos por seu respectivo erro padrão. Foi empregada a análise de variância ANOVA, proposta por Snedcor (1946), para a comparação das médias entre os vários grupos. Para a detecção das diferenças significantes entre os grupos, foi utilizado posteriormente à ANOVA, o teste de Dunnett (SPIEGEL, 1972).

A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os grupos.

As curvas de calibração e da concentração de tiocianato, nos diversos líquidos biológicos, *versus* o tempo, obtidas após os tratamentos, foram confeccionadas utilizando o programa GraphPad Prism 3.00 para Windows 95 (GRAPHPAD, 1999).

Em relação aos dados toxicocinéticos, o pico de concentração máxima (C_{max}) do tiocianato nos diferentes estudos e o tempo para atingir este pico (T_{max}) foram obtidos diretamente dos dados experimentais sem interpolação do mesmo. A área sob a curva (ASC) foi calculada pelo método dos trapezóides lineares. Todos os outros parâmetros toxicocinéticos foram calculados conforme descrito por Shargel e Yu (1993).

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE TIOCIANATO, POR ESPECTROFOTOMETRIA, EM SORO, LEITE, COLOSTRO E LÍQUIDO AMNIÓTICO DE SUÍNOS

A linearidade do procedimento analítico foi testada nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{mol/L}$ de tiocianato de potássio (KSCN), em 10 amostras para cada concentração. O coeficiente de determinação (r^2) obtido foi de 0,9911, a inclinação (*slope*) de 0,0008097 e a interceptação de eixo y em 0,005267 (Figura 32).

A precisão intralaboratorial dos resultados obtidos pela metodologia empregada, expressa pelo coeficiente de variação ou imprecisão (CV), intra dias, foi obtida pela análise dos níveis de tiocianato em amostras do padrão de 100 $\mu\text{mol/L}$ em água, e em *pool* de amostras de soro, leite, colostro e líquido amniótico, processadas 5 vezes cada, em 2 dias diferentes. O CV variou de 1,3 a 5,8% intra dia e de 2,1 a 4,8% inter dias (Tabela 2). A recuperação do analito, o tiocianato, pela metodologia empregada, conforme descrito no item 3.5.1 expressa em porcentagem, foi de 95,5 e 98,3 para o soro; 94,5 e 96,6, para o leite; 97,51 para o colostro e 98,8 e 98,2 para o líquido amniótico, adicionados de solução padrão de KSCN nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, com exceção do colostro, onde utilizou-se somente a concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 2).

Tabela 2 – Coeficiente de variação (CV), expresso em porcentagem, intra e inter dias, obtidos pela análise dos níveis de tiocianato de amostras do padrão de 100mcmol/L em água e em *pool* de amostras de soro, leite, colostro e líquido amniótico. A recuperação (REC) do método, expressa em porcentagem, determinada por meio da relação obtida entre as absorbâncias das amostras de solução padrão de tiocianato de potássio (KSCN) e de amostras de soro, leite, colostro e líquido amniótico de suínos, do grupo controle, adicionados das soluções padrão de KSCN nas concentrações 100 e 200 mcmol/L

	Padrão de 100mcmol/L	Soro	Leite	Colostro	Líquido amniótico
CV intra dia	4,0	5,8	2,8	1,3	5,6
CV inter dia	2,1	2,4	3,5	3,2	4,8
Rec 100mcmol/L	-	95,5	94,5	97,51	98,8
Rec 200mcmol/L	-	98,3	96,6	-	98,2

Figura 32 - Curva de calibração de solução aquosa de tiocianato de potássio nas concentrações 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200 e 300mcomol/L

4.2 EXPERIMENTO 2: ESTUDO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO EM SUÍNOS, FÊMEAS, EM FASE DE CRECHE, COM 60 DIAS DE IDADE

A tabela 3 mostra e a figura 33A ilustra os resultados obtidos nas dosagens dos níveis séricos de tiocianato de suínos, fêmeas, com 60 dias de idade, imediatamente antes ($t=0$), da administração de 3,0mg/Kg de KCN via oral, junto com ração comercial, e aos 15 e 30min e depois 1, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 h após este procedimento. Assim, pôde-se verificar que houve aumento significativo ($F=13.674$, $d/f=5/50/59$, $p<0,05$) nos níveis séricos de tiocianato nos seguintes horários, 30min, 1, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 horas após a administração do KCN, quando comparado ao dado obtido no tempo 0. Verificou-se, ainda, que a concentração plasmática máxima (C_{max}) de tiocianato foi detectada na 12^a hora (T_{max}). A constante de eliminação (K_{el}) foi de $0,018h^{-1}$, o *clearance* (Cl) foi de 0,017L.Kg/h, a meia vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) foi de 37,26, o volume aparente de distribuição (V_d) foi de 0,38 e a área sob a curva (ASC) 143.970,5 (Tabela 8).

Tabela 3 – Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L), de suínos, fêmeas jovens, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

Tempo	Concentração de tiocianato (mcmol/L)
0^a	47,81 ± 1,58 ^a
15 min.	63,11 ± 7,08
30min.	77,61 ± 8,67*
1 h	107,61 ± 6,27*
3 h	115,95 ± 8,54*
6h	122,31 ± 9,37*
9h	120,13 ± 6,38*
12h	124,30 ± 9,37*
18h	105,42 ± 6,80*
24h	94,29 ± 4,17*

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

* p<0,05 em relação ao tempo 0 (teste de Anova para medidas repetidas, seguido de teste de Dunnett)

4.3 EXPERIMENTO 3: ESTUDO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO, EM SUÍNOS, FÊMEAS, EM FASE DE CRESCIMENTO/TERMINAÇÃO, COM 95 DIAS DE IDADE

A tabela 4 mostra e a figura 33B ilustra os resultados obtidos nas dosagens dos níveis séricos de tiocianato das marrãs com 95 dias de idade, na fase de crescimento/terminação, imediatamente antes ($t=0$), da administração de 3,0mg/Kg de KCN via oral, junto com ração comercial, e 15 e 30min e depois 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 24h após este procedimento. Assim, quando se comparam os dados obtidos antes ($T=0$) e após a administração de KCN, verifica-se que houve aumento significativo ($F=5,130$, $d/f=10/43/53$, $p<0,05$) nos níveis séricos de tiocianato a partir da 1ª hora, após a administração, permanecendo-se elevada até a última mensuração (24ª hora). Verificou-se, ainda, que a concentração plasmática máxima (C_{max}) de tiocianato foi detectada na 12ª hora após a administração de KCN. A constante de eliminação (K_{el}) foi de $0,017h^{-1}$, o *clearance* (CI) foi de 0,020L.Kg/h, a meia vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) foi de 41,57, o volume aparente de distribuição (V_d) foi de 1,23 e a área sob a curva (ASC) 140.513,12 (Tabela 8).

Tabela 4 – Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L), de suínos, fêmeas, em fase de crescimento/terminação, com 95 dias de idade, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 5 animais por tempo avaliado.

São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

Tempo	Concentração de tiocianato (mcmol/L)
0^a	46,70 ± 2,15
15 min.	66,96 ± 3,16
30min.	68,41 ± 3,16
1 h	83,41 ± 11,608*
3 h	89,61 ± 26,16*
6h	106,30 ± 16,27*
9h	107,49 ± 15,018*
12h	112,74 ± 8,85*
15h	102,01 ± 9,62*
18h	93,90 ± 5,30*
24h	83,41 ± 5,26*

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

*p<0,05 em relação ao tempo 0 (Anova para medidas repetidas seguido de Dunnett)

4.4 EXPERIMENTO 4: ESTUDO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO, EM MARRÃS, NO 80º DIA DE GESTAÇÃO

A tabela 5 mostra e a figura 33C ilustra os resultados obtidos nas dosagens dos níveis séricos de tiocianato de marrãs, no 80º dia de gestação, imediatamente antes ($t=0$), da administração de 3,0mg/Kg de KCN via oral, junto com ração comercial, e 1, 3, 6, 9, 12, 15 e 21 horas após este procedimento. Assim, pôde-se verificar que houve aumento significativo ($F=23,993$, $d/f=7/31/38$, $p<0,05$) nos níveis séricos de tiocianato nos seguintes horários já na 1ª hora, sendo que esta elevação se manteve até a última hora de avaliação (21ª após a administração do KCN. Verificou-se, ainda, que a concentração plasmática máxima de tiocianato foi detectada na 6ª hora após a administração de KCN. A constante de eliminação (K_{el}) foi de $0,019h^{-1}$, o *clearance* (Cl) foi de 0,016L.Kg/h, a meia vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) foi de 36,21, o volume aparente de distribuição (V_d) foi de 0,82 e a área sob a curva (ASC) 158.834,34 (Tabela 8).

Tabela 5 – Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L), de marrãs, com 80 dias de gestação, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 5 animais por tempo avaliado
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

Tempo	Concentração de tiocianato (mcmol/L)
0^a	58,14 ± 4,16 ^a
1 h	66,25 ± 2,64*
3 h	122,51 ± 6,47*
6h	161,84 ± 11,90*
9h	153,26 ± 6,30*
12h	155,83 ± 7,66*
15h	147,78 ± 4,81*
21h	131,75 ± 18,50*

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

*p<0,05 em relação ao tempo 0 (Anova para medidas repetidas seguido de Dunnett)

4.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO, EM PORCAS, COM 21 DIAS DE LACTAÇÃO

As tabelas 6 e 7 mostram e a figura 34 (D e E) ilustra, respectivamente, os resultados obtidos nas dosagens dos níveis séricos e lácteos, de tiocianato de porcas, no 21º dia de lactação, imediatamente antes ($t=0$), da administração de 3,0mg/Kg de KCN via oral, junto com ração comercial, e 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas após este procedimento. Assim, pôde-se observar que houve aumento significativo nos níveis séricos ($F=20,568$, $d/f=9/50/59$, $p<0,05$) e lácteos ($F=10.574$, $d/f=9/43/52$, $p<0,05$) de tiocianato a partir da 6º hora. Verificou-se ainda, que a concentração máxima do tiocianato sérico ocorreu na 15º hora e no leite na 18º hora após a administração do KCN. Os parâmetros toxicocinéticos do tiocianato sérico, Kel (h^{-1}), o *clearance* (CI), meia vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$), volume aparente de distribuição (V_d) e a área sob a curva (ASC) foram: 0,045; 0,019; 15,47; 0,42 e 57.080,61 respectivamente (Tabela 8).

Tabela 6 - Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L), de porcas, com 21 dias de lactação, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

Tempo	Concentração de tiocianato (mcmol/L)
0^a	42,8 ± 4,6
1 h	54,9 ± 3,1
3 h	68,2 ± 3,6
6h	90,9 ± 6,6*
9h	104,9 ± 10,3*
12h	133,6 ± 12,0*
15h	136,02 ± 8,1*
18h	118,9 ± 6,1*
21h	99,4 ± 3,7*
24h	92,3 ± 4,7*

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

*p<0,05 em relação ao tempo 0 (Anova para medidas repetidas seguido de Dunnett)

Tabela 7 - Níveis lácteos de tiocianato (em mcmol/L), de porcas, com 21 dias de lactação, antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

Tempo	Número de animais	Concentração de tiocianato (mcmol/L)
0^a	6	47.9 ± 1,4 ^a
1 h	6	54,1 ± 1,5
3 h	6	59,7 ± 2,8
6h	6	66,8 ± 5,0*
9h	5	70,9 ± 7,1*
12h	5	78,1 ± 3,4*
15h	4	80,3 ± 4,3*
18h	5	85,8 ± 3,7*
21h	6	63,5 ± 1,9*
24h	4	64,0 ± 1,9*

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

*p<0,05 em relação ao tempo 0 (Anova para medidas repetidas seguido de Dunnett)

Figura 33 - Níveis séricos de tiocianato, em mcmol/L, em suínos fêmeas com; 60dias (A) e 95dias (B) de idade, e com 80dias de gestação (C), antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial

* $p < 0,05$ em relação ao valores antes da administração do KCN

Figura 34 - Níveis séricos(D) e lácteos (E) de tiocianato, em mcmmol/L, em porcas, com 21 dias de lactação antes e após a administração de 3,0mg/Kg de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto com ração comercial

* $p < 0,05$ em relação ao valores antes da administração do KCN

Tabela 8 - Parâmetros toxicocinéticos do tiocianato, em suínos, fêmeas, em diferentes fases de vida: creche, terminação, gestação e lactação, que receberam, por via oral, a dose única de 3,0 mg/Kg de KCN, juntamente com ração comercial. (Cmax: concentração máxima; Tmax: tempo para atingir a Cmax; ASC: área sob a curva; Kel: constante de eliminação; Cl: *clearance*; $t_{1/2\beta}$: meia vida de eliminação; Vd: volume aparente de distribuição)

GRUPOS DE FÊMEAS EM DIFERENTES FASES				
Parâmetros toxicocinéticos	CRECHE (n=6)	TERMINAÇÃO (n=5)	GESTAÇÃO (n=5)	LACTAÇÃO (n=6)
Cmax (mcmol/L)	124,3	112,7	161,8	136,0
Tmax (h)	12	12	6	15
Kel (h ⁻¹)	0,018	0,017	0,019	0,045
Cl (L.Kg/h)	0,017	0,020	0,016	0,019
$T_{1/2\beta}$	37,26	41,57	36,21	15,47
Vd (L/kg)	0,38	1,23	0,82	0,42
ASC $0-\infty$ (mcmol/L)	143.970,5	140.513,12	158.834,34	57.080,61

4.6 EXPERIMENTO 6: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KCN EM MARRÃS DURANTE A GESTAÇÃO: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ANATOMO-PATOLÓGICA

A tabela 9 mostra e a figura 35A ilustra as médias de peso dos animais, tratados ou não, com as diferentes doses de KCN 2,0, 4,0 e 6,0 mg/Kg/dia. Desta maneira, a comparação estatística entre os grupos controle e experimental revelou haver alterações significantes ($p < 0,05$) neste parâmetro antes da exposição ao cianeto e, também, na 1ª ($F=8,215$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$), 4ª ($F=10.038$ $d/f=3/16$, $p < 0,05$), e 13ª ($F=11.105$, $d/f=$, $p < 0,05$) semana após o início do tratamento. Na 1ª semana, pós-cobertura e/ou inseminação, o Teste de Dunnett revelou aumento significativo ($p < 0,05$), no peso dos animais dos grupos separados para o tratamento de 2,0 mg/kg de KCN. Na 4ª semana de gestação (1ª semana de tratamento), este mesmo teste estatístico empregado mostrou que aqueles animais pertencentes ao grupo tratado com 2,0mg/Kg de KCN, tinham peso significativamente maior ($p < 0,05$). Já na 7ª de semana de gestação (4ª semana de tratamento), a comparação estatística revelou que estes mesmos animais (isto é, tratados com 2,0 mg/kg KCN), apresentavam ainda peso significativamente maior que aquele das marrãs do grupo controle; no entanto, verificou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) neste parâmetro naqueles animais tratados com a maior dose de KCN (6,0 mg/Kg/dia). Na ultima semana de tratamento (13ª semana), o teste de estatístico revelou diminuição significativa de peso naqueles animais tratados com as maiores doses de KCN, ou seja 4,0 e 6,0 mg/Kg/dia de KCN.

Em relação ao ganho de peso destes suínos, a análise de variância mostrou haver alterações significantes neste parâmetro, entre a 1ª -5ª ($F=3,598$, $d/f=3/16$, $p<0,05$), 6ª-13ª ($F= 5,718$, $d/f=3/16$, $p<0,05$) semana e, ainda, quando se comparou o ganho de peso total, da 1ª-13ª ($F=8,673$, $d/f=3/16$, $p<0,05$) semana do experimento. A aplicação do Teste Dunnett revelou queda significativa ($p<0,05$) no ganho de peso daquelas marrãs tratadas com 2,0 mg/kg de KCN na 1ª-5ª semana, de tratamento, quando comparado aos valores obtidos dos animais do grupo controle. Quando a mesma comparação foi feita com aqueles animais do grupo tratado com a dose intermediária de KCN (4,0 mg/kg), verificou-se diminuição significativa na 6ª-13ª semana, bem como da 1ª-13ª semana (Tabela 10 e Figura 35B e C).

Tabela 9 - Peso (em Kg) semanal de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), a partir da 3ª semana de gestação, por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 5 animais por grupo
São apresentados as médias e os respectivos erros padrões

Semana da pesagem	Controle	KCN (mg/Kg)		
		2,0	4,0	6,0
-2^a	164,8 ± 13,3 ^a	200,4 ± 4,2*	159,2 ± 5,1	133,8 ± 10,6
-1	174,6 ± 13,6	207,8 ± 4,6	159,8 ± 4,0	146,8 ± 11,3
0^b	180,8 ± 15,1	212,0 ± 4,7	171,2 ± 4,1	154,0 ± 11,8
1	181,6 ± 15,3	222,4 ± 7,5*	167,0 ± 3,9	156,2 ± 10,0
2	192,0 ± 14,0	225,6 ± 7,9	172,4 ± 4,8	157,4 ± 9,7
3	196,2 ± 15,1	229,8 ± 6,71	182,2 ± 5,20	161,2 ± 11,0
4	201,0 ± 14,3	238,0 ± 6,5*	184,0 ± 4,6	164,6 ± 10,2
5	207,6 ± 15,6	237,20 ± 6,0	189,8 ± 4,2	172,0 ± 9,4
6	211,8 ± 16,1	244,0 ± 6,2	187,6 ± 4,1	177,4 ± 9,5
7	215,0 ± 16,7	250,6 ± 7,7	192,4 ± 5,4	189,2 ± 6,6
8	215,8 ± 16,8	250,0 ± 8,1	196,6 ± 3,9	191,4 ± 8,4
9	221,8 ± 17,6	253,4 ± 7,6	200,6 ± 3,8	194,6 ± 8,1
10	225,6 ± 16,6	255,6 ± 6,8	205,0 ± 4,0	198,0 ± 9,1
11	230,2 ± 15,3	260,4 ± 7,6	207,2 ± 4,4	203,2 ± 9,6
12	231,2 ± 16,5	265,4 ± 9,5	210,2 ± 5,0	205,8 ± 7,4
13	250,4 ± 13,4	267,2 ± 9,4	201,0 ± 3,0*	213,4 ± 7,7*

^a A pesagem dos animais foi realizada a partir da realização de monta e/ou inseminação artificial

^b Semana de início da administração do KCN

* Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguida de Dunnett) em relação ao grupo controle

Tabela 10 - Ganho de peso (em Kg) semanal de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), a partir da 3ª semana de gestação, por via oral, junto com ração comercial. Foram utilizados 5 animais por grupo
São apresentados as médias e os respectivos erros padrões

Período da avaliação (Semanas)	KCN (mg/Kg)			
	0,0	2,0	4,0	6,0
- 2ª – 0ª ^a	16,0 ± 4,3	11,6 ± 2,5	12,0 ± 1,5	20,2 ± 1,9
1º - 5º	25,9 ± 3,2	14,8 ± 3,7*	22,8 ± 2,8	15,8 ± 0,5
6º -13º	38,6 ± 4,5	23,2 ± 3,3	13,4 ± 4,2*	36,0 ± 6,8
1º -13º	69,6 ± 4,6	55,2 ± 5,1	29,8 ± 4,1*	59,4 ± 8,2

^a Semana de início do tratamento com KCN

* Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 35 - Peso em Kg (A), Ganho de peso em Kg (B) das semanas (-2°)-0, 1°-5 e 6°-13° e Ganho de peso da 1° a 13° semana (C) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), a partir da 3° semana de gestação, por via oral, junto com ração comercial

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

A tabela 11 mostra e a figura 36 ilustra os valores obtidos nas dosagens de tiocianato sérico de marrãs, tratadas ou não, com diferentes doses de KCN, durante o período gestacional (115 dias). A análise de variância mostrou haver alterações significantes, nos 50° ($F=13,273$, $d/f=3/16$ e $p<0,05$), 80° ($F=33,173$, $d/f=3/16$ e $p<0,05$) e 110° ($F=82,294$, $d/f=3/13$ e $p<0,05$) dias de gestação. A comparação estatística entre os valores obtidos dos animais pertencentes ao grupo controle com aqueles das marrãs que receberam as diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg), revelou haver aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis sanguíneos de tiocianato, em todos os grupos de animais dos diferentes grupos experimentais, nestes 3 dias.

Em relação aos níveis séricos de glicose, a análise de variância revelou haver alterações significantes no 110° dia de experimento ($F=4.412$, $d/f=3/13$, $p<0,05$). A subsequente aplicação do teste Dunnett mostrou haver diminuição significativa ($p<0,05$) dos valores obtidos naqueles animais que receberam a dose de 6,0 mg/Kg/dia de KCN, quando comparados aos valores dos animais que não receberam o KCN (Tabela 12 e Figura 37).

Quanto ao colesterol, o estudo estatístico mostrou alterações significantes em todas as datas avaliadas, ou seja, respectivamente no 21° ($F=13.871$, $d/f=3/16$, $p<0,05$), 50° ($F=30,851$, $d/f=3/12$, $p<0,05$), 80° ($F=12,074$, $d/f=3/16$, $p<0,05$) e 110° ($F=6,400$ $d/f=3/13$, $p<0,05$) da avaliação. A comparação entre os valores obtidos das gestantes do grupo controle e aqueles das fêmeas dos diferentes grupos experimentais revelou aumento significativo ($p<0,05$) dos níveis séricos desta substância naquelas porcas tratadas com a maior dose do KCN, no 21° e 50°; no entanto, estes mesmos animais apresentaram queda significativa ($p<0,05$) de colesterol no 80° dia do experimento. As marrãs tratadas com 2,0 e 4,0 mg/kg de

KCN, mostraram níveis séricos de colesterol significativamente maiores ($p<0,05$) que aquele do grupo controle, no 50º e 110º dia de gestação, respectivamente (Tabela 12 e Figura 37).

A tabela 13 mostra e a figura 38 ilustra os valores sanguíneos de uréia obtidos dos animais tratados ou não com as diferentes doses de KCN, a partir da 3ª semana de gestação. A análise de variância revelou haver diferenças significantes entre os valores obtidos dos animais dos grupos controle e experimentais, no 50º ($F=11,814$; $d/f=3/16$, $p<0,05$), 80º ($F=7,849$; $d/f=3/16$, $p<0,05$) e 110º ($F=3,352$; $d/f=3/13$, $p<0,05$) dias de gestação. A aplicação do teste estatístico subsequente revelou haver aumento nos valores sanguíneos de uréia naqueles suínos que receberam a dose de 6,0 mg/Kg/dia de KCN, nos 3 dias avaliados, quando comparado àqueles valores dos animais do grupo controle. Esta mesma comparação revelou, ainda, aumento nos níveis sanguíneos de uréia dos animais do grupo tratado com 4,0 mg/Kg de KCN, no 80º dia de gestação.

Em relação à creatinina, a análise de variância revelou diferenças significantes nos níveis séricos desta substância no 50º dia de gestação ($F=4,967$; $d/f=3/16$, $p<0,05$). A subsequente aplicação do teste de Dunnet mostrou haver aumento significativo ($p<0,05$) dos níveis sanguíneos da uréia naqueles animais tratados com 4,0 mg/kg de KCN, quando comparado aos valores de creatinina obtido dos animais do grupo controle (Tabela 13 e Figura 38).

A tabela 14 mostra e a figura 39A ilustra os dados relativos aos efeitos da administração de diferentes doses de KCN, nos níveis séricos de aspartato-aminotransferase (AST) dos suínos, fêmeas, durante o período gestacional. A análise de variância revelou a existência de alterações significantes neste parâmetro no 80º ($F=16,216$; $d/f=3/16$, $p<0,05$) e no 110º ($F=11,728$; $d/f=3/13$,

$p < 0,05$) dia do experimento. A aplicação do Teste Dunnett, no 80º dia mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) neste parâmetro, nos animais que receberam as doses de 4,0 e 6,0 mg/Kg de KCN/dia quando comparado aos valores obtidos dos níveis séricos de AST dos animais do grupo controle. Este mesmo teste revelou, ainda, aumento dos níveis sanguíneos desta substância, naqueles animais que receberam a dose de 4,0 mg/Kg/dia de KCN, no 110º dia de gestação.

Já em relação aos dados relativos ao estudo bioquímico dos níveis sanguíneos de alanina-aminotransferase (ALT) dos animais que receberam diferentes doses de KCN, a análise de variância revelou diferenças significantes apenas no 50º dia do experimento ($F=9,919$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$). A análise estatística subsequente mostrou haver aumento significativo ($p < 0,05$) deste parâmetro, naqueles animais que receberam a dose de 4,0 mg/kg de KCN/dia no 50º dia do experimento, quando comparado aos valores obtidos dos animais do grupo controle (Tabela 14 e Figura 39B).

Quanto à análise bioquímica dos níveis séricos gama-glutamilttransferase (GGT) destas marrãs, o estudo estatístico mostrou não haver alterações significantes ($p > 0,05$), em nenhum dos dias avaliados (Tabela 13 e Figura 37C).

A tabela 15 mostra e a figura 40 ilustra os níveis séricos de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) livres de suínos fêmeas, com 110 dias de prenhez, tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/kg). A análise de variância revelou não haver diferenças significantes ($p > 0,05$) nos níveis sangüíneos destes hormônios.

Com relação ao estudo histopatológico do SNC, a observação em menor aumento (4x) do cerebelo, sugere uma dissociação dos neurônios da camada granular da substância cinzenta de mãe que recebeu por via oral, juntamente com

ração, a maior dose de KCN, ou seja 6,0 mg/Kg a partir da 3º semana de gestação, quando comparado ao cerebelo de mãe do grupo controle (Figura 41 A e B). A avaliação em aumento maior (10x) permitiu verificar degeneração de células de purkinje em cerebelo de mães experimentais e controle (Figura 41 C e D). Esta análise sugeriu maior número de células de Purkinje com citoplasma acidofílico em cerebelo de mães experimentais (Figura 41 E), e evidenciou presença de vacúolos nas células de purkinje somente no cerebelo da mãe que recebeu a maior dose, ou seja 6,0 mg/Kg/dia (Figura 41 F). Em relação ao córtex cerebral o estudo histopatológico sugeriu aumento na celularidade, bem como de neuroniofagia em todos os grupos experimentais, sendo mais evidente naquelas que receberam, por via oral, juntamente com ração, a dose de 6,0 mg/Kg de KCN, a partir da 3º semana de gestação (Figura 41 G e H).

O estudo histopatológico das glândulas tireóides mostrou haver aumento dos folículos (Figura 42), do número de vacúolos de reabsorção no colóide e espessamento do epitélio cúbico folicular (Figura 43) das glândulas tiroideanas das mães que receberam as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg de KCN por dia, durante a gestação, abatidas no 110º dia de prenhez.

A histopatologia do fígado destas fêmeas revelou haver degeneração vacuolar de hepatócitos, tanto em mães pertencentes aos diferentes grupos experimentais como naquelas do grupo controle (Figura 44).

No que se refere à histopatologia dos rins, este estudo revelou degeneração vacuolar no epitélio do túbulo renal (Figura 45) em todas as mães pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

A figura 46 mostra a fotomicrografia do corte histológico de pulmão, de fêmea gestante, que recebeu a dose de 6,0mg/kg de KCN a partir da 3º semana de

prenhez. Assim, pode-se verificar que este órgão apresenta espessamento dos septos alveolares, caracterizando pneumonia intersticial. Esta alteração foi encontrada em todas as mães experimentais (2,0; 4,0, 6,0mg/kg de KCN/dia) de forma dose-dependente.

O exame histopatológico do pâncreas destas mães mostrou que todas as fêmeas tratadas com KCN apresentaram desarranjo do parênquima pancreático, desorganização dos ácinos (Figura 47) e diminuição dos grânulos de zimogênio, sendo esta alteração, observada de forma mais intensa, naquelas mães que receberam a maior dose de KCN (Figura 48).

O estudo histopatológico do baço, miocárdio e do hipocampo, de mães, tratadas ou não com KCN, revelou não haver alterações significantes nestes órgão, em todos os grupos avaliados.

Tabela 11 - Níveis séricos de tiocianato (em mcmol/L) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), administrados por via oral, junto com ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

Dias da gestação	KCN (mg/Kg)			
	Controle	2,0	4,0	6,0
21	67,9 ± 4,2(5) ^b	70,3 ± 5,45(5)	61,0 ± 4,30(5)	65,0 ± 3,14(5)
50	66,0 ± 4,8(5)	127,0 ± 12,9*(5)	145,6 ± 12,3*(5)	176,6 ± 17,6*(5)
80	64,1 ± 2,9(5)	154,2 ± 10,2*(5)	161,1 ± 5,7*(5)	182,8 ± 13,5*(4)
110	50,3 ± 1,1(5)	166,1 ± 10,1*(5)	169,2 ± 3,0*(4)	159,0 ± 6,6*(3)

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

^b numero de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida de Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 36 - Níveis séricos de tiocianato (em µmol/L) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), administrados por via oral, junto com ração comercial, durante o período gestacional, a partir do 21º dia de prenhez

*p< 0,05 em relação ao grupo controle

Tabela 12- Níveis séricos de glicose (em mg/dL) e colesterol (em mg/dL), de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Glicose (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
21º dia de gestação^a		
0,0	56,7 ± 3,0 (5) ^b	93,0 ± 4,6 (5)
2,0	63,0 ± 4,4 (5)	108,3 ± 8,3 (5)
4,0	73,2 ± 6,3 (5)	82,6 ± 5,3 (5)
6,0	63,0 ± 4,6 (5)	130,3 ± 2,1*(5)
50º dia de gestação		
0,0	75,0 ± 3,5 (5)	87,8 ± 3,9 (5)
2,0	63,1 ± 7,0 (5)	117,7 ± 9,6*(5)
4,0	66,2 ± 6,5 (5)	69,0 ± 3,4 (5)
6,0	66,9 ± 4,1 (5)	138,1 ± 1,2*(5)
80º dia de gestação		
0,0	64,1 ± 3,1 (5)	92,6 ± 6,6 (5)
2,0	65,5 ± 2,9 (5)	92,5 ± 14,8 (5)
4,0	67,8 ± 2,8 (5)	66,3 ± 2,4*(5)
6,0	65,7 ± 2,6 (5)	65,9 ± 1,9*(5)
110º dia de gestação		
0,0	75,8 ± 3,7 (5)	89,2 ± 3,8 (5)
2,0	70,7 ± 1,4 (5)	99,3 ± 7,6 (5)
4,0	66,8 ± 3,3 (3)	61,1 ± 1,4*(3)
6,0	62,9 ± 0,7*(4)	82,9 ± 6,1 (4)

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

^b número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Tabela 13- Níveis séricos de uréia (em mg/dL) e creatinina (em mg/dL), de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
21º dia de gestação^a		
0,0	33,5 ± 2,0 (5) ^b	1,7 ± 0,19 (5)
2,0	34,0 ± 1,0 (5)	2,0 ± 0,07 (5)
4,0	33,0 ± 2,5 (5)	1,7 ± 0,08 (5)
6,0	39,0 ± 5,9 (5)	1,9 ± 0,08 (5)
50º dia de gestação		
0,0	34,0 ± 0,6 (5)	1,74 ± 0,08 (5)
2,0	35,0 ± 0,7 (5)	1,77 ± 0,08 (5)
4,0	32,0 ± 2,6 (5)	2,14 ± 0,08*(5)
6,0	55,5 ± 5,7*(5)	2,01 ± 0,08 (5)
80º dia de gestação		
0,0	39,0 ± 2,0 (5)	1,6 ± 0,1 (5)
2,0	38,5 ± 1,2 (5)	1,9 ± 0,1 (5)
4,0	57,5 ± 5,7*(5)	2,0 ± 0,1 (5)
6,0	52,5 ± 2,8*(5)	1,9 ± 0,08 (5)
110º dia de gestação		
0,0	33,0 ± 3,6 (5)	1,7 ± 0,07 (5)
2,0	37,0 ± 1,2 (5)	1,8 ± 0,05 (5)
4,0	41,6 ± 4,4 (3)	1,8 ± 0,1 (4)
6,0	50,6 ± 6,7*(4)	1,8 ± 0,1 (4)

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

^b número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 37 -Níveis séricos de glicose (em mg/dL) e colesterol (em mg/dL), de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21° dia de prenhez
 *p< 0,05 em relação ao grupo controle

Figura 38-Níveis séricos de uréia (em mg/dL) e creatinina (em mg/dL), de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21° dia de prenhez

*p< 0,05em relação ao grupo controle

Tabela 14 - Níveis séricos de ALT (em U/L), AST (em U/L) e GGT (em U/L) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez
São apresentados as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)
21º dia de gestação^a			
0,0	20,6 ± 1,5 (5) ^b	36,7 ± 2,1 (5)	27,2 ± 3,2 (5)
2,0	23,4 ± 1,7 (5)	37,7 ± 1,5 (5)	24,0 ± 1,4 (5)
4,0	22,5 ± 1,3 (5)	43,7 ± 2,6 (5)	27,4 ± 3,2 (5)
6,0	24,1 ± 1,4 (5)	36,7 ± 4,5 (5)	28,6 ± 1,6 (5)
50º dia de gestação			
0,0	19,9 ± 1,6 (5)	45,8 ± 5,4 (5)	26,8 ± 2,4 (5)
2,0	19,2 ± 1,7 (5)	37,0 ± 2,2 (5)	28,2 ± 1,0 (5)
4,0	22,0 ± 4,5 (5)	61,2 ± 3,9*(5)	27,0 ± 2,6 (5)
6,0	24,7 ± 0,9 (5)	34,5 ± 3,0 (5)	27,6 ± 0,8 (5)
80º dia de gestação			
0,0	20,8 ± 0,4 (5)	38,8 ± 1,1 (5)	28,2 ± 1,9 (5)
2,0	19,9 ± 1,2 (5)	35,3 ± 1,5 (5)	26,8 ± 2,7 (5)
4,0	25,2 ± 0,6*(5)	57,0 ± 10,8 (5)	26,2 ± 1,3 (5)
6,0	25,4 ± 0,3*(5)	44,4 ± 2,7 (5)	28,9 ± 0,9 (5)
110º dia de gestação			
0,0	21,5 ± 0,8 (5)	37,5 ± 2,0 (5)	27,6 ± 2,0 (5)
2,0	19,4 ± 0,7 (5)	31,7 ± 2,5 (5)	28,1 ± 1,9 (5)
4,0	28,8 ± 1,8*(3)	44,1 ± 2,3 (3)	26,6 ± 1,1 (3)
6,0	22,0 ± 1,3 (4)	40,3 ± 3,3 (4)	25,9 ± 1,4 (4)

^a coleta de sangue realizada antes da administração de cianeto de potássio

^b número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 39 - Níveis séricos de ALT, em U/L (A), AST, em U/L (B) e GGT, em U/L (C) de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21° dia de prenhez

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 15 - Níveis séricos de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) livres de suínos, fêmeas, com 110 dias de prenhez, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez. Foram utilizados 5 animais. São apresentados as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	110º dia de gestação	
	T3 livre (ng/dL)	T4 livre (ng/dL)
0,0	0,039 ± 0,005	0,84 ± 0,4
2,0	0,033 ± 0,001	1,10 ± 0,1
4,0	0,034 ± 0,002	0,79 ± 0,1
6,0	0,034 ± 0,002	0,93 ± 0,2

Figura 40 - Níveis séricos de T3 e T4 (ng/dL) livres de suínos, fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez

Figura 41 - Fotomicrografia de corte histológico do SNC de mães dos grupos, controle e experimentais, que receberam as doses de 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN a partir do 21º dia de gestação. Cerebelo de fêmea do grupo controle (A) e de fêmea tratada com 6,0 mg/kg de KCN (B), notar a dissociação dos neurônios da camada granular (setas) da substância cinzenta (4x). (C e D) Células de Purkinje degeneradas (setas) em cerebelos de mães dos grupos controle e experimental 6,0 mg/kg de KCN (10x). Células de Purkinje de cerebelo de fêmea tratada com 4,0mg/kg de KCN (E). As setas mostram o citoplasma acidofílico destas células (20x). Células de Purkinje de mãe tratada com a maior dose de KCN com presença de vacuolização (setas) (20X). (G e H) As setas indicam a presença de neuroniofagia em córtex cerebral de mãe tratada com a dose de 6,0 mg/kg de KCN (20 e 40x, respectivamente) (H.E.)

Figura 42-Fotomicrografia de corte histológico de tireóides, de mães, controle (A) e experimentais (B, C e D) que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN/dia, a partir da 3ª semana de prenhez, durante a gestação, mostrando aumento dos folículos tiroideanos em relação ao corte histológico da glândula tireóide de mãe do grupo controle; AU 4X

Figura 43- Fotomicrografia de corte histológico de tireóides de mães, controle (A) e experimentais, que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN/dia (B, C e D, respectivamente), a partir da 3ª semana de prenhez, durante a gestação, mostrando espessamento do colóide (*), vacuolização do epitélio folicular e aumento na quantidade de vacúolos de reabsorção (setas) no colóide dos folículos tireoideanos em relação à tireóide de mãe do grupo controle (AU 20X)

Figura 44 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de mães, controle (A) e experimentais que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN/dia (B, C e D, respectivamente), a partir da 3^o semana de prenhez, durante a gestação, mostrando degeneração vacuolar (AU 10X e Fig D, AU 20x)

Figura 45 - Fotomicrografia de corte histológico de rins de mães que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN/dia (A, B e C, respectivamente), a partir da 3ª semana de prenhez, durante a gestação, mostrando degeneração vacuolar em epitélio do túbulo renal (AU 20x)

Figura 46 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de mãe que recebeu, por via oral, junto a ração comercial, a dose de 6,0 mg/kg de KCN/dia (B), a partir da 3ª semana de prenhez, durante a gestação, mostrando espessamento dos septos alveolares, caracterizando pneumonia intersticial. Do lado esquerdo, verifica-se o corte histológico de pulmão de uma mãe pertencente ao grupo controle (A), mostrando o parênquima pulmonar sem alteração (AU de 4x)

Figura 47 - Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de mães do grupo controle (A) e experimentais, que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN/dia (B, C e D respectivamente), a partir da 3ª semana de prenhez, durante a gestação. Pode-se verificar que o parênquima pancreático daquelas fêmeas dos diferentes grupos experimentais apresenta-se desarranjado; o mesmo não é observado no tecido pancreático daqueles animais pertencente ao grupo controle (AU de 20X)

Figura 48 - Fotomicrografia de corte histológico de pâncreas de mãe do grupo que recebeu por via oral, junto a ração comercial, a dose de 6,0 mg/kg de KCN/dia (B), a partir da 3ª semana de prenhez, durante a gestação, mostrando desarranjo do parênquima pancreático com desorganização dos ácinos e diminuição dos grânulos de zimogênio em relação ao corte histológico de pâncreas, de mãe do grupo controle (A), AU de 40x

4.7 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TIOCIANATO NO LÍQUIDO AMNIÓTICO E COLOSTRO DE PORCAS GESTANTES, TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE KCN, POR VIA ORAL

Em relação à avaliação dos níveis séricos de tiocianato do líquido amniótico, coletado aos 110 dias de gestação, e do colostro, obtido no parto, a análise de variância revelou haver diferenças significantes nos níveis deste metabólito em ambos os meios biológicos ($F= 27,350$, $d/f=3/16$, $p<0,05$) e ($F=12,708$, $d/f=3/14$, $p<0,05$), respectivamente. A aplicação do teste de Dunnett revelou aumento, neste parâmetro, tanto no líquido amniótico como no colostro, naqueles animais prenhes que receberam as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN/dia, quando comparados aos valores dos níveis de tiocianato obtidos das gestantes pertencentes ao grupo controle (Tabela 16 e Figura 49).

Tabela 16 - Níveis de tiocianato do líquido amniótico, aos 110 dias de gestação e do colostro obtido no parto, de suínos fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez. Foram utilizados 5 animais
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/Kg)	Tiocianato (mcmol/L)	
	Líquido amniótico 110º dia de prenhes	Colostro ao parto
0,0	20,5 ± 1,1	18,9 ± 1,5
2,0	51,1 ± 3,1*	32,7 ± 1,8*
4,0	55,9 ± 3,3*	35,1 ± 3,3*
6,0	65,7 ± 5,8*	38,2 ± 1,5*

* diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 49- Níveis de tiocianato do líquido amniótico, aos 110 dias de prenhez, e do colostro, obtido no parto, de suínos fêmeas, tratadas com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto a ração comercial, a partir do 21º dia gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

4.8 EXPERIMENTO 8: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE KCN À SUÍNAS FÊMEAS DURANTE A GESTAÇÃO: ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO FETAL POR ULTRA-SONOGRAFIA E AVALIAÇÃO PÓS-NATAL DA PROLE

A análise dos resultados obtidos por ultra-sonografia mostrou não haver alterações significantes ($p>0,05$) para as mensurações de comprimento crânio-caudal (CCC), diâmetro abdominal (DA), diâmetro torácico (DT) e diâmetro biparietal (DBP), entre os fetos das mães dos grupos experimentais e das mães do grupo controle em nenhum dos dias avaliados, a saber: 45º, 55º e 65º dia de gestação (Tabela 17). Assim, pode-se verificar que em todos os parâmetros avaliados, não foi verificada diferenças significantes entre os diferentes grupos ($p>0,05$), nos diferentes dias avaliados.

Na tabela 18 são apresentados os parâmetros reprodutivos de marrãs prenhes tratadas com diferentes doses de KCN, a partir do 21º dia de prenhez, durante a gestação, onde pode ser observado que as mães que receberam a dose de 4,0 mg/kg de KCN tiveram maior número de partos auxiliados, maior número de filhotes nascidos mortos e mal formados.

A tabela 19 mostra e a figura 50 ilustra, o parâmetro peso, ao nascer, aos 21, 42, 60 e 120 dias de idade, dos suínos provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/Kg) durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação, e o ganho de peso total dos suínos que chegaram até o abate (120 dias). A análise de variância mostrou haver alterações significantes nesse parâmetro ao nascer ($F= 6,715$, $d/f=3/195$, $p<0,05$), aos 21 dias de idade ($F= 29,777$, $d/f=3/158$,

$p < 0,05$); aos 42 dias de idade ($F=7,342$, $d/f=3/155$, $p < 0,05$) e aos 120 dias de idade ($F=11,322$; $d/f=3/137$, $p < 0,05$). A aplicação do teste de Dunnett revelou diminuição significativa ($p < 0,05$) no peso, ao nascer, dos suínos provenientes de mães expostas à dose de 2,0 mg/Kg de KCN/dia, durante a gestação; aumento significativo ($p < 0,05$) no peso, aos 21 dias de idade, dos suínos provenientes de mães expostas à dose de 4,0 mg/Kg de KCN/dia, durante a gestação. Ainda, analisando-se os dados relativos aos 42 dias, a aplicação desse estudo estatístico revelou aumento significativo ($p < 0,05$) nesse parâmetro para os suínos provenientes de mães expostas às doses de 2,0 e 4,0 mg/Kg de KCN/dia, durante a gestação, e ao abate, ou seja 120 dias de idade, mostrou diminuição significativa ($p < 0,05$) do peso, nos suínos, provenientes de mães expostas à dose de 2,0mg/Kg de KCN/dia, a partir do 21º dia de prenhez, durante a gestação. Já para o ganho de peso total dos suínos terminados, ou seja que chegaram até os 120 dias de idade, o teste de Dunnett mostrou diminuição significativa ($p < 0,05$), nesse parâmetro, naqueles animais nascidos de mães experimentais dos grupos 2,0 e 4,0 mg/Kg de KCN.

A tabela 20 mostra os índices de mortalidade, ao nascer (NM%), do parto ao desmame (MND%), na creche (MC%) e do crescimento à terminação (MCT%), bem como o número médio de leitões vivos ao nascer, desmamados e terminados por leitegada nascida (LVL, LDL e LTL, respectivamente). Assim, observou-se que os animais provenientes das mães expostas às doses de 4,0 e 6,0 mg/Kg de KCN/dia, durante a gestação tiveram maior NM% e MND%, respectivamente. As taxas de mortalidade na creche (MC%) e do crescimento à terminação (MCT%); bem como o número médio de leitões vivos, ao nascer, desmamados e terminados, foram maiores nas proles de mães do grupo controle.

O desempenho desses animais, avaliado por meio do peso médio do leitão ao nascer (PNL) e do ganho médio de peso diário (GPMD) de leitões, nas diferentes fases; desmame (GPMDD), creche (GPMDC), e crescimento à terminação (GPMDCT) mostra que, de maneira geral, os animais provenientes de mães tratadas com a dose de 2,0 mg/kg de KCN dia tiveram desempenho inferior, quando comparado ao dos animais do grupo controle (Tabela 20).

A tabela 21 mostra e a Figura 51 ilustra, os parâmetros de espessura média e relativa de toucinho, peso médio e rendimento de carcaças, quente e fria, dos suínos provenientes de mães submetidas aos tratamentos de diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/Kg) durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. A análise de variância mostrou haver alterações significantes nesses parâmetros ($F=22,260$, $d/f=3/137$, $p<0,05$; $F=16,170$, $d/f=3/137$, $p<0,05$; $F=27,092$, $d/f=3/137$, $p<0,05$; ($F=29,823$; $d/f=3/137$, $p<0,05$; $F=9,748$, $d/f=3/137$, $p<0,05$ e $F=16,343$, $d/f=3/137$, $p<0,05$, respectivamente). A aplicação do teste de Dunnett revelou diminuição significativa ($p<0,05$) na espessura de toucinho dos suínos provenientes de mães expostas à dose de 2,0 mg/Kg de KCN/dia, durante a gestação. Esta mesma diminuição foi encontrada, no que se refere à espessura relativa de toucinho nos suínos provenientes de mães tratadas com as doses de 2,0 e 4,0 mg/kg de KCN/dia, quando comparado aos valores de espessura, média e relativa, de toucinho dos animais provenientes de mães controle.

Quanto ao peso das carcaças, quente e fria, este estudo estatístico revelou, respectivamente, diminuição e aumento, desses parâmetros naqueles animais que vieram dos grupos experimentais 2,0 e 4,0 mg/kg de KCN. Já para o rendimento de carcaça, verificou-se diminuição significativa ($p<0,05$) tanto para a carcaça quente,

como para a fria, quando comparados aos valores obtidos destes parâmetros, em animais provenientes do grupo controle (Tabela 19 e Figura 51).

A tabela 22 mostra e figura 50 (A e B) ilustra os dados referentes ao peso médio e relativo das tireóides das proles, terminadas, de mães submetidas a diferentes doses de KNC durante a gestação. A análise de variância revelou haver diferenças significantes nesses parâmetros ($F=7,523$, $d/f=3/137$, $p<0,05$ e $F=11,579$, $d/f=3/137$, $p<0,05$, respectivamente). A aplicação do estudo estatístico subsequente mostrou diminuição significativa ($p<0,05$) nos pesos, médio e relativo, das tireóides dos animais provenientes dos grupos experimentais, 2,0 e 6,0 mg/kg/KCN/dia, e 4,0 e 6,0 mg/kg/KCN/dia respectivamente, quando comparado aos pesos, médio e relativo, das tireóides dos animais do grupo controle.

Tabela 17- Mensurações de comprimento crânio-caudal (CCC), diâmetro abdominal (DA), diâmetro torácico (DT) e diâmetro biparietal dos fetos no 45º, 55º e 65º dias de gestação de marrãs, tratadas, a partir da 3ª semana de prenhez, com diferentes doses de cianeto de potássio (KCN), por via oral, junto à ração comercial, durante a gestação

São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/Kg/dia)	45 dias de gestação			
	CCC			
0,0	3,62 ± 0,45 (5) ^a			
2,0	3,58 ± 0,47 (5)			
4,0	2,70 ± 0,22 (5)			
6,0	3,54 ± 0,70 (5)			
	55 dias de gestação			
	CCC	DA	DT	DBP
0,0	4,15 ± 0,5 (4)	3,3 ± 0,8 (3)	2,35 ± 0,11 (5)	2,3 ± 0,2 (5)
2,0	4,61 ± 0,5 (4)	2,2 ± 0,2 (5)	2,33 ± 0,14 (5)	2,1 ± 0,08 (5)
4,0	4,01 ± 0,01 (2)	2,3 ± 0,6 (3)	2,35 ± 0,10 (5)	1,8 ± 0,2 (5)
6,0	5,20 ± 0,8 (2)	2,8 ± 0,3 (5)	2,48 ± 0,29 (5)	2,0 ± 0,2 (5)
	65 dias de gestação			
	CCC	DA	DT	DBP
0,0	11,55 ± 0,9 (2)	3,4 ± 0,1 (5)	2,7 ± 0,2 (5)	2,5 ± 0,1 (5)
2,0	9,2 ± 0,6 (2)	2,7 ± 0,2 (5)	2,6 ± 0,04 (5)	2,2 ± 0,1 (5)
4,0	8,4 ± 0,9 (3)	2,6 ± 0,6 (3)	2,3 ± 0,03 (5)	2,3 ± 0,2 (5)
6,0	9,9 ± 0,7 (2)	2,9 ± 0,4 (5)	2,3 ± 0,1 (5)	2,7 ± 0,2 (4)

^a número de fetos avaliados

Tabela 18 - Parâmetros reprodutivos de marrãs tratadas ou não, com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, a partir do 21º dia de prenhez, durante a gestação. Foram utilizados 5 animais

Parâmetros reprodutivos	KCN (mg/kg)			
	0,0	2,0	4,0	6,0
nº de partos naturais	5	5	1	4
nº de partos auxiliados	0	0	4	1
nº de filhotes nascidos	63	59	59	61
nº de filhotes nascidos vivos	57	55	36	51
nº de filhotes mortos	6	4	23	10
-Natimortos	5	4	14	7
-Mumificados	1	0	9	3
nº de filhotes vivos				
-Machos	27	30	13	24
-Fêmeas	30	25	23	27
Malformações	-	-	-	
Polidactilia	-	-	-	1
Anquilose	-		2	-

Tabela 19 - Peso ao nascer, aos 21, 42, 60 e 120 dias de idade, e ganho de peso total, do 1º -120º dia de vida, dos suínos, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/kg), por via oral, junto a ração comercial, durante a gestação, a partir do 21º dia de prenhez, e ganho de peso total daqueles que conseguiram chegar até os 120 dias de vida

São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN(mg/Kg/dia)	Peso dos filhotes ao nascer
0,0	1,68 ± 0,04 (57) ^a
2,0	1,44 ± 0,03*(55)
4,0	1,71 ± 0,07 (36)
6,0	1,60 ± 0,05 (51)
	21º dia
0,0	4,63 ± 0,15 (47)
2,0	4,08 ± 0,16 (45)
4,0	6,80 ± 0,30* (32)
6,0	4,28 ± 0,25 (38)
	42º dia
0,0	8,26 ± 0,36 (47)
2,0	10,91 ± 0,75* (44)
4,0	11,38 ± 0,39* (31)
6,0	9,13 ± 0,47 (37)
	60º dia
0,0	16,19 ± 0,55 (45)
2,0	15,29 ± 0,70 (44)
4,0	17,41 ± 0,64 (29)
6,0	16,20 ± 0,70 (37)
	120º dia
0,0	60,31 ± 2,49 (38)
2,0	43,71 ± 1,74*(38)
4,0	53,56 ± 1,63 (29)
6,0	53,64 ± 2,23 (36)
	Ganho de peso total (1º- 120º dia)
0,0	58,52 ± 2,48 (38)
2,0	42,52 ± 1,73* (38)
4,0	51,77 ± 1,61 (29)
6,0	47,77 ± 2,02* (36)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 50- Peso ao nascer (A), aos 21 (B), aos 42 (C), 60 (D) e 120 (E) dias de idade e ganho de peso total 1º-120º dia de vida (F), de suínos, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, a partir do 21º dia de prenhez, durante a gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 20 - Índice (em porcentagem) de mortalidade: ao nascer (NM), do parto ao desmame (MND), de creche (MC) e do crescimento à terminação (MCT). Número médio de leitões vivos: ao nascer (LVL), desmamados (LDL) e terminados (LTL) por leitegada nascida. Peso médio de leitões ao nascer (PLN), ganho de peso médio diário dos leitões até o desmame (GPMDD), na creche (GPMDC) e na fase de crescimento à terminação (GPMDDCT) de proles provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, a partir do 21º dia de prenhez, durante a gestação

Índice de mortalidade (%)	KCN (mg/kg)			
	0,0	2,0	4,0	6,0
MN	9,5	6,8	39,0	16,4
MND	7,3	8,2	5,9	13,0
MC	9,8	8,9	9,4	7,5
MCT	11,6	7,3	0	5,26
Número médio de leitões vivos				
LVL	11,4	11	8,4	10,2
LDL	10,2	9	6,4	8
LTL	7,6	7,6	5,8	7,2
Desempenho dos suínos				
PLN	1,7	1,4	1,7	1,6
GPMDD	0,09	0,04	0,08	0,09
GPMDC	0,32	0,25	0,33	0,37
GPMDDCT	0,55	0,36	0,49	0,42

Tabela 21 - Espessura de toucinho, espessura relativa de toucinho, peso e rendimento de carcaça quente e fria, dos suínos terminados, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0mg/Kg), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Espessura de toucinho (cm)	Espessura relativa de toucinho (cm/100Kg)
0,0	1,7 ± 0,1(38) ^a	3,0 ± 0,13(38)
2,0	1,0 ± 0,04*(38)	2,4 ± 0,09*(38)
4,0	1,5 ± 0,08(29)	2,0 ± 0,11(29)*
6,0	1,8 ± 0,07(36)	3,2 ± 0,14(36)
	Peso de carcaça quente (Kg)	Peso de carcaça fria (Kg)
0,0	47,4 ± 2,3(38)	46,4 ± 2,3(38)
2,0	30,7 ± 1,6*(38)	29,7 ± 1,6*(38)
4,0	59,7 ± 1,6*(29)	58,5 ± 1,7*(29)
6,0	45,7 ± 2,8(36)	45,7 ± 2,5(36)
	Rendimento de carcaça quente (%)	Rendimento de carcaça fria (%)
0,0	79,2 ± 1,0 (38)	77,7 ± 1,0 (38)
2,0	67,4 ± 2,0* (38)	65,1 ± 2,1*(38)
4,0	78,2 ± 1,2(29)	76,6 ± 1,2(29)
6,0	74,9 ± 2,1(36)	75,2 ± 0,9(36)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 51- Parâmetros de espessura média e relativa de toucinho (A e B), pesos médios de carcaças quente e fria (B e C) e rendimento de carcaças (D e E) de suínos terminados, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/Kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação
* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 22 - Peso médio e relativo das tireóides das proles de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Peso de tireóides
0,0	7,2 ± 0,32 (38) ^a
2,0	6,2 ± 0,33*(38)
4,0	7,9 ± 0,30 (29)
6,0	6,0 ± 0,27*(36)
	Peso relativo das tireóide
0,0	12,7 ± 0,5 (38)
2,0	14,0 ± 0,6 (38)
4,0	10,5 ± 0,4*(29)
6,0	10,2 ± 0,3*(36)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 52 - Peso médio e relativo das tireóides das proles de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* p<0,05 em relação ao grupo controle

A análise dos níveis séricos de tiocianato desses suínos mostrou haver alterações significantes no 7º dia de vida, tanto em machos ($F=114,63$, $d/f=3/16$, $p<0,05$) como em fêmeas ($F=39,509$, $d/f=6/16$, $p<0,05$). A aplicação do teste de Dunnet revelou aumento significativo ($p<0,05$), nesse parâmetro, nos filhotes machos provenientes de mães experimentais, que receberam as diferentes doses de KCN, quando comparado aos valores séricos de tiocianato dos machos provenientes de mães controle. Já em relação às fêmeas, este estudo estatístico revelou aumento significativo ($p<0,05$), somente para aquelas nascidas do grupo experimental 6,0 mg/kg de KCN. A aplicação da análise de variância, referente aos dados dos níveis séricos de tiocianato no 21º dia de vida destas proles, mostrou não haver alteração desta substância entre os diferentes grupos (Tabela 23 e Figura 53).

A tabela 24 mostra e a figura 54 ilustra os níveis séricos de glicose de filhotes, machos e fêmeas, nascidos de mães que receberam diferentes doses de KCN, durante a gestação. A comparação estatística entre os valores obtidos de suínos, de mães do grupo controle e dos grupos experimentais, mostrou haver alterações significantes ($p<0,05$), nesse parâmetro. A aplicação do teste de Dunnet revelou aumento nos níveis séricos de glicose nos machos, no 14º ($F=8,627$, $d/f=3/14$, $p<0,05$) e no 21º dia de idade ($F=10,282$, $d/f=3/15$, $p<0,05$), nascidos de mães experimentais do grupo que recebeu a dose de 4,0 mg/kg de KCN/dia, durante a gestação. Em fêmeas, este estudo estatístico revelou não haver alterações em nenhum dos dias avaliados, ou seja 14, 21 e 45 dias de idade.

Quanto à análise dos níveis séricos de colesterol de suínos, machos e fêmeas, nascidos de mães que receberam as diferentes doses de KCN, durante a gestação, o estudo estatístico revelou haver alterações significantes ($p<0,05$). Os machos

nascidos de mães expostas à dose de 4,0 mg/kg de KCN durante a gestação, apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) nesse parâmetro, aos 14 dias de idade ($F=17,257$, $d/f=3/15$, $p < 0,05$), quando comparado aos valores dos níveis séricos de colesterol dos machos pertencentes às mães do grupo controle. A aplicação do teste de Dunnett, revelou também, aumento significativo ($p < 0,05$) nesses valores, em machos provenientes de mães que receberam a dose de 6,0 mg/kg de KCN, durante a gestação, aos 14 ($F=17,257$, $d/f=3/15$, $p < 0,05$), 21 ($F=6,990$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$) e 45 ($F=15,154$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$) dias de vida, quando comparado aos valores séricos de colesterol de machos, nascidos do grupo controle. Em relação às fêmeas, a análise de variância revelou haver diferenças significantes, nesse parâmetro, somente aos 14 dias de vida ($F=30,248$, $d/f=3/11$, $p < 0,05$). A aplicação do estudo estatístico subsequente revelou aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores séricos de colesterol em fêmeas, vindas dos grupos experimentais (2,0, 4,0 e 6,0 mg/kg/dia de KCN), quando comparado aos valores obtidos de fêmeas, vindas do grupo controle (Tabela 25 e Figura 55).

A tabela 26 mostra e a figura 56 ilustra, os valores sangüíneos de uréia de suínos, machos e fêmeas, vindos de animais tratadas ou não com as diferentes doses de KCN, a partir da 3^o semana de gestação. A análise de variância revelou haver diferenças significantes, nesse parâmetro, somente nas fêmeas com 14 ($F=61,028$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$) e 21 ($F=13,268$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$) dias de idade. O teste de Dunnett revelou diminuição dos valores de uréia ($p < 0,05$) nas fêmeas, com 14 dias de idade, nascidas dos grupos experimentais (2,0, 4,0 e 6,0mg/kg de KCN). Aos 21 dias de idade, este teste revelou aumento ($p < 0,05$) somente para fêmeas, nascidas dos grupos experimentais 2,0 e 6,0 mg/Kg de KCN.

A tabela 27 mostra e a figura 57 ilustra os valores sangüíneos de creatinina, obtidos de suínos, machos e fêmeas, com 14, 21 e 45 dias de idade, nascidos de mães dos diferentes grupos experimentais. A análise de variância revelou haver diferenças significantes, nesse parâmetro, tanto em machos como em fêmeas, aos 14 dias de idade ($F=32,680$, $d/f=3/16$, $p<0,05$ e $F=13,996$, $d/f=3/16$, $p<0,05$, respectivamente) e somente, em machos aos 21 dias ($F=7,802$, $d/f=3/16$, $p<0,05$) de vida. O teste de Dunnett mostrou que filhotes machos, provenientes de mães de todos os grupos experimentais, apresentaram aumento nos níveis desta substância no 14º dia de vida; por outro lado, somente a prole de fêmeas tratadas com as doses maiores de KCN, apresentaram esta alteração. A aplicação da análise de variância, nos dados obtidos no 21º dia de vida, revelou que somente machos apresentaram diferenças significantes ($F=7,802$, $df=3/16$, $p<0,05$) e a aplicação subsequente do teste de Dunnet revelou que filhotes de mães experimentais, tratadas com 4,0 e 6,0 mg/Kg de KCN, apresentavam aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis de uréia, quando comparado aos valores obtidos dos animais controles.

Tabela 23 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L), de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. Foram utilizados 5 animais machos e 5 animais fêmeas
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L)	
	Machos	Fêmeas
	7º dia	
0,0	24,7 ± 1,5	27,4 ± 1,4
2,0	33,8 ± 2,5*	28,0 ± 1,4
4,0	51,9 ± 1,4*	27,9 ± 1,9
6,0	67,8 ± 1,3*	48,9 ± 1,9*
	21º dia	
	26,3 ± 2,2	25,0 ± 1,4
	23,1 ± 2,0	23,1 ± 0,9
	19,7 ± 2,2	19,7 ± 2,2
	20,2 ± 1,8	22,1 ± 1,4

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 53 - Níveis séricos de tiocianato de suínos, machos (A e B) e fêmeas (C e D) aos 7 e 21 dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 24 - Níveis séricos de glicose (mg/dL), de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KNC (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Glicose (mg/dL)	
	Machos	Fêmeas
14º dia		
0,0	96,3 ± 2,9 (5) ^a	84,3 ± 1,3 (4)
2,0	96,4 ± 3,5 (5)	85,2 ± 0,8 (4)
4,0	134,4 ± 9,6*(4)	97,4 ± 0,5 (4)
6,0	113,1 ± 7,8 (4)	92,4 ± 2,2 (4)
21º dia		
0,0	109,9 ± 2,8 (5)	89,6 ± 3,1 (5)
2,0	106,3 ± 3,2 (5)	93,4 ± 2,0 (5)
4,0	144,7 ± 6,2*(5)	88,8 ± 1,3 (5)
6,0	121,1 ± 9,4 (4)	92,6 ± 4,0 (5)
45º dia		
0,0	89,3 ± 1,9 (5)	82,6 ± 3,7 (5)
2,0	90,4 ± 4,2 (5)	85,6 ± 1,0 (5)
4,0	111,9 ± 9,6 (4)	84,2 ± 1,6 (5)
6,0	98,7 ± 9,1 (5)	76,3 ± 2,2 (4)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 54 - Níveis séricos de glicose de suínos, machos (A, C e E) e fêmeas (B, D e F) com 14, 21 e 45 dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 25 - Níveis séricos de colesterol (mg/dL) de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Colesterol (mg/dL)	
	Machos	Fêmeas
14º dia		
0,0	99,2 ± 5,1 (5) ^a	82,7 ± 4,0 (5)
2,0	97,5 ± 2,4 (5)	120,7 ± 2,1*(5)
4,0	168,8 ± 22,5*(4)	125,6 ± 1,7*(5)
6,0	177,8 ± 7,4 *(5)	139,6 ± 6,5*(5)
21º dia		
0,0	94,7 ± 8,5 (5)	80,7 ± 4,0 (3)
2,0	90,4 ± 1,6 (5)	87,9 ± 3,5 (4)
4,0	116,1 ± 10,5(5)	84,6 ± 2,9 (4)
6,0	139,2 ± 9,9*(5)	87,8 ± 2,1 (3)
45º dia		
0,0	90,4 ± 6,5 (5)	63,4 ± 2,3 (5)
2,0	89,1 ± 2,0 (5)	63,1 ± 1,5 (5)
4,0	70,0 ± 2,3 (5)	63,4 ± 5,1 (4)
6,0	130,9 ± 10,9* (5)	66,0 ± 1,2 (5)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 55 - Níveis séricos de colesterol de suínos, machos e fêmeas com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 26 - Níveis séricos de uréia (mg/dL) de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Uréia (mg/dL)	
	Machos	Fêmeas
	14ºdia	
0,0	19,7 ± 0,5 (5) ^a	27,2 ± 0,68 (5)
2,0	19,6 ± 0,9 (5)	24,0 ± 0,61*(5)
4,0	17,3 ± 1,4 (5)	22,8 ± 0,72*(5)
6,0	15,8 ± 1,8 (5)	14,9 ± 0,65*(5)
	21ºdia	
	21,5 ± 1,0 (5)	20,9 ± 0,61 (5)
	21,2 ± 1,7 (5)	27,0 ± 0,5* (5)
	23,7 ± 4,7 (3)	23,1 ± 0,6 (5)
	22,1 ± 0,9 (3)	29,5 ± 1,8*(5)
	45º dia	
	27,3 ± 1,8 (5)	25,5 ± 0,9 (5)
	23,5 ± 2,4 (5)	33,8 ± 0,4 (5)
	30,0 ± 4,0 (5)	35,0 ± 1,2 (5)
	32,0 ± 3,7 (5)	32,9 ± 1,3 (5)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 56 - Níveis séricos de uréia de suínos, machos e fêmeas com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 27- Níveis séricos de creatinina (mg/dL) de machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	Creatinina (mg/dL)	
	Machos	Fêmeas
14º dia		
0,0	0,8 ± 0,01 (5) ^a	0,7 ± 0,04 (5)
2,0	1,0 ± 0,05* (5)	0,7 ± 0,05(5)
4,0	1,3 ± 0,01* (5)	1,2 ± 0,03*(5)
6,0	1,0 ± 0,05* (5)	0,9 ± 0,1*(5)
21º dia		
0,0	0,9 ± 0,01 (5)	0,9 ± 0,02 (5)
2,0	0,9 ± 0,07 (5)	0,8 ± 0,04 (4)
4,0	1,2 ± 0,1* (5)	1,0 ± 0,03 (4)
6,0	1,2 ± 0,04* (5)	0,8 ± 0,008 (5)
45º dia		
0,0	0,9 ± 0,03 (5)	1,1 ± 0,03 (5)
2,0	0,9 ± 0,07 (5)	1,1 ± 0,03 (5)
4,0	1,3 ± 0,3 (5)	1,0 ± 0,04 (5)
6,0	1,0 ± 0,1 (5)	0,9 ± 0,04 (5)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 57 - Níveis séricos de creatinina de suínos, machos e fêmeas, com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Quanto à avaliação da bioquímica de aspartato-aminotransferase (AST) sérica, de suínos, machos e fêmeas, provenientes de mães expostas a partir da 3ª semana de prenhez, às diferentes doses de KCN, durante a gestação, a análise de variância mostrou haver alterações significantes em todos os dias avaliados. Assim, em relação ao 14º dia de vida, o emprego deste teste estatístico permitiu verificar diferenças entre os grupos, tanto em machos ($F=5,655$, $d/f=3/16$, $p<0,05$), como em fêmeas ($F=70,978$, $d/f=3/16$, $p<0,05$). O emprego do teste estatístico mostrou haver um aumento nos níveis desta enzima naqueles filhotes machos, pertencentes à mães que receberam a maior dose de KCN; por outro lado, a análise estatística proveniente de filhotes fêmeas, revelou que enquanto a prole de fêmeas tratadas com 2,0 mg/kg de KCN mostrou diminuição dos níveis desta enzima, fêmeas provenientes de mães que receberam as maiores doses de cianeto, apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) destes valores, quando comparado àquele obtido de animais pertencentes à fêmeas do grupo controle. Quanto à análise do AST no 21º dia de vida, verificou-se diferenças significantes, quando da comparação entre os valores obtidos, tanto em machos ($F=9,138$, $d/f=3/16$ $p<0,05$), como em fêmeas ($F=96,616$, $d/f=3/15$ $p<0,05$). A aplicação subsequente do teste de Dunnet, mostrou que as proles, tanto de machos, quanto de fêmeas, provenientes de mães que receberam as maiores doses de KCN, apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) dos níveis séricos de AST, quando comparado àqueles, obtidos de animais do grupo controle. Ainda, a análise de variância, aplicada a partir dos dados obtidos aos 45 dias de idade, mostrou haver diferenças entre os grupos, tanto na prole de machos ($F=96,616$, $d/f=3/15$, $p<0,05$), como na prole de fêmeas ($F=32,819$, $d/f=3/16$, $p<0,05$) e da mesma maneira que verificado no 21º dia de vida, constatou-se aumento significativo ($p<0,05$), nos níveis de AST, somente na prole de machos e

fêmeas provenientes de mães que receberam as doses mais altas do cianeto, ou seja 4,0 e 6,0 mg/kg (Tabela 28 e Figura 58)

A tabela 29 mostra e a figura 59 ilustra os valores de alanina-aminotransferase (ALT) obtidos de suínos, machos e fêmeas, com 14, 21 e 45 dias de idade, nascidos de mães que receberam ou não diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia) durante a gestação, a partir da 3ª semana de prenhez. A análise de variância revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nesse parâmetro, aos 14 ($F=8,978$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$), 21 ($F=11,797$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$) e 45 ($F=54,819$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$) dias de vida em suínos machos. O teste de Dunnett mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) em todos os dias de vida avaliados nos filhotes de mães experimentais, que receberam a maior dose de KCN, quando comparado aos valores de ALT de machos, provenientes de mães do grupo controle.

Este teste estatístico revelou também diferenças nos níveis de ALT em fêmeas, aos 14 dias de idade ($F=4,805$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$). A subsequente aplicação do teste de Dunnett mostrou haver aumento significativo naquelas proles de mães expostas às maiores doses de cianeto na gestação. O emprego da análise de variância revelou, também, haver diferenças significantes nos valores de ALT, na prole de fêmeas, avaliadas aos 21 dias ($F=5,856$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$) e aos 45 dias ($F=5,755$, $d/f=3/16$, $p < 0,05$). A aplicação do teste estatístico subsequente revelou que em ambos os dias, somente as fêmeas pertencentes às mães tratadas com a maior dose de KCN apresentaram aumento significativo desta enzima, quando comparado aos valores obtidos daqueles animais pertencentes às fêmeas do grupo controle. (Tabela 29 e Figura 59).

Na avaliação dos níveis séricos de gama-glutamilttransferase (GGT), de suínos, machos e fêmeas, provenientes de mães expostas as diferentes doses de KCN,

durante a gestação, a análise de variância mostrou a existência de alterações nesse parâmetro; aos 14 dias de idade, para fêmeas ($F=11,028$, $d/f=3/16$, $p<0,05$), aos 21 dias de idade, para machos e fêmeas ($F=6,736$, $d/f=3/16$, $p<0,05$, $F=12,317$ e $d/f=3/14$, $p<0,05$, respectivamente), e aos 45 dias de idade; para ambos os sexos, ou seja, machos ($F=9,516$, $d/f=3/14$, $p<0,05$) e fêmeas ($F=23,963$, $d/f=3/15$, $p<0,05$).

A aplicação do teste estatístico subsequente revelou aumento significativo ($p<0,05$) nos valores obtidos nesta substância, em fêmeas com 14 dias de idade, nascidas de mães dos grupos experimentais 2,0; 4,0 e 6,0 mg/Kg de KCN, expostas a partir da 3ª semana de gestação, quando comparado aos valores obtidos dos níveis séricos de fêmeas, vindas de mães controle. Aos 21 dias de idade, a aplicação do teste de Dunnett mostrou aumento significativo ($p<0,05$) nos valores de GGT de machos e fêmeas, nascidos de mães expostas à dose de 6,0 mg/kg de KCN, a partir de 3ª semana de gestação, quando comparado aos valores obtidos de machos e fêmeas, com a mesma idade, nascidos de mães controle. Esse mesmo teste estatístico, ou seja, o teste de Dunnett, mostrou ainda aumento significativo ($p<0,05$) para os suínos, de ambos os sexos, provenientes de mães dos grupos experimentais 6,0 mg/kg e 4,0; 6,0mg/Kg de KCN, respectivamente, quando comparado aos valores de machos e fêmeas, nascidos de mães do grupo controle (Tabela 30 e Figura 60).

Tabela 28 - Níveis séricos de aspartato-aminotransferase - AST (U/L) de suínos, machos e fêmeas, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	AST (U/L)	
	Machos	Fêmeas
	14º dia	
0,0	36,0 ± 1,4 (5) ^a	34,7 ± 1,1 (5)
2,0	31,2 ± 0,8 (5)	27,0 ± 1,2* (5)
4,0	46,1 ± 4,8 (5)	45,0 ± 2,0* (5)
6,0	51,5 ± 5,8* (5)	67,9 ± 3,2* (5)
	21º dia	
0,0	28,6 ± 0,4 (5)	19,5 ± 1,4 (5)
2,0	28,3 ± 0,4 (5)	24,8 ± 1,5 (5)
4,0	44,6 ± 3,9* (5)	42,1 ± 1,3* (5)
6,0	50,6 ± 6,3* (5)	51,1 ± 3,3* (5)
	45º dia	
0,0	28,5 ± 1,0 (5)	35,3 ± 2,4 (5)
2,0	33,1 ± 1,7 (5)	38,3 ± 3,3 (5)
4,0	82,3 ± 2,8* (4)	64,5 ± 1,8* (5)
6,0	48,8 ± 3,3* (5)	56,1 ± 1,9* (5)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 58 - Níveis séricos de aspartato-aminotransferase (AST) de suínos, machos e fêmeas, com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 29 - Níveis séricos de alanina-aminotransferase - ALT (U/L) de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	ALT (U/L)	
	Machos	Fêmeas
	14º dia	
0,0	25,4 ± 0,8 (5) ^a	27,7 ± 0,8 (5)
2,0	26,8 ± 1,3 (5)	29,4 ± 0,9* (5)
4,0	27,7 ± 1,3 (5)	29,6 ± 1,4* (5)
6,0	33,6 ± 1,2* (5)	26,8 ± 0,8 (5)
	21º dia	
	28,2 ± 0,8 (5)	26,0 ± 0,8 (5)
	28,7 ± 1,7 (5)	32,8 ± 0,6 (5)
4,0	27,6 ± 0,4 (5)	37,7 ± 3,4* (5)
6,0	35,4 ± 1,6* (5)	28,9 ± 2,1 (5)
	45º dia	
	28,2 ± 0,3 (5)	32,9 ± 0,8 (5)
	28,0 ± 0,3 (5)	30,9 ± 0,8 (5)
4,0	28,8 ± 1,1 (5)	33,4 ± 0,8 (5)
6,0	40,7 ± 1,1* (5)	36,4 ± 1,2* (5)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 59 - Níveis séricos de alanina-aminotransferase (ALT) de suínos, machos e fêmeas com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Tabela 30 - Níveis séricos de gama-glutamyltransferase - GGT (U/L) de suínos, machos e fêmeas provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0, 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação
São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões

KCN (mg/kg/dia)	GGT (U/L)	
	Machos	Fêmeas
14 dias de vida		
0,0	45,5 ± 3,5 (5) ^a	28,8 ± 1,8 (5)
2,0	44,1 ± 1,3 (5)	34,3 ± 1,9* (5)
4,0	53,5 ± 6,2 (5)	40,8 ± 1,2* (5)
6,0	46,2 ± 0,6 (5)	36,6 ± 0,6* (5)
21 dias de vida		
0,0	42,9 ± 2,9 (5)	35,6 ± 1,5 (5)
2,0	43,4 ± 2,8 (5)	37,1 ± 1,4 (5)
4,0	60,4 ± 3,6* (4)	45,0 ± 0,7* (5)
6,0	59,8 ± 3,1* (4)	43,2 ± 2,7* (5)
45 dias de vida		
0,0	49,5 ± 1,4 (5)	46,9 ± 2,0 (4)
2,0	46,0 ± 1,4 (4)	38,7 ± 2,8 (5)
4,0	59,6 ± 3,6 (5)	66,1 ± 1,9* (5)
6,0	72,4 ± 6,5* (4)	58,3 ± 2,9* (5)

^a número de animais utilizados

* diferença significativa (p<0,05, ANOVA seguida por Dunnett) em relação ao grupo controle

Figura 60 - Níveis séricos de gama-glutamilttransferase (GGT) de suínos, machos e fêmeas, com 14 (A e B), 21 (C e D) e 45 (E e F) dias de idade, provenientes de mães tratadas com diferentes doses de KCN (2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg/dia), por via oral, junto a ração comercial, durante a prenhez, a partir do 21º dia de gestação

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

A avaliação histopatológica dos filhotes, imediatamente após o nascimento, não permitiu detectar alteração dos diferentes órgãos avaliados (coração, pulmão, fígado, baço, rim, pâncreas, tireóides e cérebro). Já quando essa análise foi realizada em suínos terminados, com 120 dias de idade, pertencentes às mães dos diferentes grupos experimentais, observou-se alterações somente nas glândulas tireóides e no pulmão.

Nas tireóides, as lesões tiveram um padrão semelhante àquele verificado nas mães, isto é, aumento dos folículos e do número de vacúolos de reabsorção no colóide e espessamento do epitélio cúbico folicular (Figuras 61 e 62).

No pulmão desses filhotes, pertencentes às fêmeas, dos diferentes grupos experimentais, observou-se espessamento dos septos alveolares, característico de pneumonia intersticial, lesão esta, semelhante àquela verificada em suas mães (Figura 63).

Figura 61 - Fotomicrografia de corte histológico de tireóides de suínos, ao abate, vindos de mães, controle(A) e experimentais que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN/dia (B, C e D, respectivamente), a partir da 3º semana de prenhez, durante a gestação, mostrando aumento dos folículos tiroideanos em relação ao tamanho dos folículo de suíno, ao abate, nascido de mãe controle (AU 0,5X)

Figura 62 - Fotomicrografia de corte histológico de tireóides, de suíno ao abate, vindo de mãe que recebeu, por via oral, junto a ração comercial, a dose de 6,0 mg/kg de KCN/dia, a partir da 3º semana de prenhez, durante a gestação, mostrando espessamento do epitélio folicular e vacúolos no epitélio folicular cúbico, AU 20X

Figura 63 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão, de suínos ao abate, provenientes de mães, controle (A) e experimentais, que receberam, por via oral, junto a ração comercial, as doses de 2,0; 4,0 e 6,0 mg/kg de KCN/dia (B, C e D, respectivamente), a partir da 3^o semana de prenhez, durante a gestação, mostrando espessamento dos septos alveolares (AU de 10x)

5 DISCUSSÃO

Enquanto que a principal forma de exposição ao cianeto para humanos é a ocupacional (BLANC, 1985; EL GAHAWABI et al., 1975; BLANC, 1985; POTTER; SMITH; API, 2001), para os animais esta se faz, principalmente, por ingestão de glicosídeos cianogênicos, presentes em uma grande variedade de plantas (ATSDR, 2001; CONN, 1978; MONTGOMERY, 1980; POULTON, 1983; SAAD; CAMARGO 1976), dentre elas destaca-se a mandioca (*Manihot* sp) por possuir características que facilitam sua difusão e consumo, como adaptação a solos pobres, resistência às secas e pragas, tendo como resultado alta resistência biológica (PENTEADO; FLORES, 2000).

A intoxicação aguda, tanto pelo íon cianeto como por compostos cianogênicos (p.ex. glicosídeos), é bem documentada (CHIN; CALDERON, 2000; POULTON, 1983); no entanto, o perigo potencial de exposições prolongadas, com baixos níveis de cianeto, bem como exposições esporádicas não está satisfatoriamente esclarecido. Por outro lado, há evidências epidemiológicas, terapêuticas e experimentais relevantes, indicando consequências importantes da exposição prolongada ao cianeto, tanto na saúde pública como na produção animal (BUZALEH et al., 1989), podendo, neste último caso, acarretar em significantes prejuízos econômicos. (DOHERTY; VERGIL; SMITH, 1982; SOTO-BLANCO, 1999; TEWE; MANNER; GOMES, 1977).

O presente estudo dá continuidade à pesquisa que vem sendo realizada neste laboratório, a qual objetiva melhor caracterizar os efeitos tóxicos da administração prolongada pelo KCN. Assim, visa-se, agora, verificar os efeitos da exposição

prolongada, em doses baixas de cianeto na espécie suína, particularmente durante o período perinatal, uma vez que escassos são os dados relativos à toxicologia reprodutiva desta substância.

A primeira etapa desse estudo procurou verificar os níveis séricos de tiocianato, pois este parâmetro é aquele utilizado como referência para o monitoramento da exposição prolongada ao cianeto (HASUIKE et al., 2004; POTTER; SMITH; API, 2001; SETO; KATAOKA; TSUGE, 2000; SIQUEIRA; BARROS; OLIVEIRA, 1996; SOUSA *et al.*, 2003, SOUSA, 2004, THORNE, 2001), permitindo, desta maneira, melhor compreensão do comportamento deste ânion no organismo.

Várias são as metodologias empregadas para a detecção do tiocianato, em fluidos biológicos (BRUCE; HAWARD; HANDAL, 1955, CHEN et al., 1994; HOLZBECHER; ELLENBERGER, 1985; ISOM; BOROWITZ, 1995, KAGE; NAGAT; KUDO, 1996; SIQUEIRA; BARROS; OLIVEIRA, 1996; SOTO-BLANCO, 1999, SOUSA, 2000 e 2004, SOUSA et al., 2003; TOMINAGA; MÍDIO, 1990 e 1991; TSUGE; KATAOKA; SETO; 2000); dentre estas metodologias, está a técnica de espectrofotometria, inicialmente descrita por Pettigrew e Fell (1972) e posteriormente modificada por Siqueira *et al.*, (1996) e Tominaga; Mídio (1990, 1991) que utilizaram a cromatografia de troca iônica associada à espectrofotometria. Este método é bem conhecido e fundamentado na literatura, tendo sido já padronizado, em nosso laboratório, para algumas espécies animais, como caprinos (SOTO-BLANCO, 1999), ratos (SOUSA, 2000) e suínos (MANZANO, 2001), para a detecção do tiocianato tanto na urina como no sangue. A determinação deste metabólito do cianeto nestes fluidos biológicos (urina e sangue) também já está padronizada para humanos (SIQUEIRA; BARROS; OLIVEIRA, 1996; TOMINAGA; MÍDIO, 1991).

Por outro lado, no presente estudo seria necessário que se fizesse a padronização da metodologia que utiliza a espectrofotometria para a determinação do tiocianato, além do sangue, também no líquido amniótico, leite e colostro de fêmeas de suínos. Ao se levantar a literatura, objetivando-se obter dados acerca deste procedimento, verificou-se não haver citações a respeito da técnica para a quantificação do tiocianato nestes fluidos biológicos, nesta espécie animal. Assim, a validação desta metodologia foi necessária para qualificar e garantir a confiabilidade dos dados analisados. A validação deste método compreendeu o estudo de linearidade da resposta, a confecção da curva de calibração, a determinação da precisão e a recuperação em porcentagem do tiocianato.

Uma busca na literatura revelou que a recuperação do tiocianato utilizando esta metodologia, tanto para amostras de sangue de ser humano como para certas espécies animais, variam entre 92,8% a 100% (BRUCE; HAWARD; HANDAL, 1955; IMANARI; TANABE; TOIDA, 1982; SIQUEIRA; BARROS; OLIVEIRA, 1996; SOTO-BLANCO, 1999 e SOUSA, 2000; TOIDA et al., 1984; TOMINAGA; MÍDIO, 1991). Os resultados aqui obtidos mostraram que a recuperação média deste produto de transformação do cianeto foi de 95,5% e 98,3% para o soro; 98,8% e 98,2%, para o líquido amniótico; 94,5% e 96,6%, para o leite e 97,5% para o colostro. Portanto, o método utilizado neste estudo mostrou-se bastante satisfatório, para todos os materiais biológicos analisados, apresentou linearidade de resposta, e valores do coeficiente de variação de 1,3 a 5,6% intra dia, e de 2,1 a 4,8% inter dias. Deve-se ressaltar que estes valores aqui obtidos estão no limite inferior em relação àquele preconizado para as metodologias analíticas, que é de no máximo 15% (CHASIN; SALVADORI, 1994).

A partir da validação do método para detecção dos níveis de tiocianato nos diferentes fluidos biológicos, foi objetivo no estudo seguinte, verificar a cinética de transformação do cianeto, utilizando-se do tiocianato como biomarcador, em fêmeas, da espécie suína, em diferentes fases de vida (creche, terminação, gestação e lactação), uma vez que, como dito, anteriormente, este dado é fundamental para o monitoramento da exposição prolongada ao cianeto, permitindo a melhor compreensão do comportamento deste toxicante na espécie suína.

As informações sobre a toxicocinética de transformação do cianeto em tiocianato são bastante limitadas, o que torna muito difícil interpretar os achados toxicológicos e avaliar os riscos de exposição que o cianeto pode causar e, embora a absorção, transformação e a eliminação deste íon e de seu metabólito venham sendo estudadas em várias espécies animais, o perfil comparativo da cinética de transformação do cianeto em tiocianato, dentro de uma mesma espécie animal, considerando-se algumas variações nos parâmetros fisiológicos, tem recebido pouca atenção. De fato, um levantamento bibliográfico mostrou haver somente um trabalho, em ratas fêmeas, comparando-se a biotransformação do cianeto na fase de estro, gestação e lactação (SOUSA, 2004).

Para a avaliação toxicocinética, na presente pesquisa, foi utilizada a dose de 3,0 mg/kg de KCN, a qual foi administrada por via oral, juntamente com ração comercial, pois pesquisas anteriores com suínos (MANZANO, 2001), caprinos (SOTO-BLANCO; 1999) e ratos, (SOUSA, 2000 e 2004), mostraram que esta dose administrada, mesmo de uma só vez, não promoveu letalidade nem qualquer sinal típico verificado na intoxicação aguda por cianeto. Além disto, o estudo cinético, conduzido, por Sousa et al., 2003, revelou que a dose de 3,0 mg/kg gerou concentrações de tiocianato detectáveis no sangue em ratos, caprinos e suínos.

A administração pela via oral foi a escolhida, uma vez que é uma das principais fontes de exposição ao cianeto, tanto em humanos como em animais (WAY, 1984). Além disto, esta via de administração tem sido amplamente utilizada em estudos de toxicologia, devido à conveniência, baixo custo e mínimo estresse do animal (YUAN, 1992). De fato, sabe-se que qualquer tipo de estresse promove reação em suínos que pode ser visualizada, do ponto de vista, fisiológico, pelas alterações na temperatura corporal, nos movimentos respiratórios e cardíacos, na redução do consumo voluntário de ração, na perda de peso e mobilização da gordura corporal, prolongamento do intervalo de desmame, diminuição da taxa de concepção, abortamentos e da queda do número e do peso de leitões nascidos, entre outros indicadores zootécnicos do bem estar do animal (PERDOMO, 1997). Ressalte-se que a forma pela qual o cianeto foi administrado, isto é, misturado à pouca quantidade de ração a qual sempre foi ofertada depois de um período prolongado de fastio, fez com que todas as fêmeas ingerissem rápida e avidamente o alimento associado ao agente tóxico. Portanto, este procedimento permitiu que não houvesse variações no tempo para o consumo de ração entre os animais e, consequentemente, na absorção do cianeto.

Uma comparação interessante sobre a cinética de biotransformação do cianeto é aquela entre os dados obtidos neste mesmo laboratório, relativos à dosagem de tiocianato, em suínos machos, nestes diferentes tempos e submetidos à mesma dose de KCN que a aqui utilizada - 3,0 mg/kg - (MANZANO, 2001) e os obtidos no presente estudo em fêmeas, gestantes ou não, e lactantes. Assim, na pesquisa com machos verificou-se que, embora o pico máximo de concentração sangüínea de tiocianato ocorresse na 12^a hora após a administração de KCN, como o verificado nas fêmeas adultas aqui neste estudo, os valores deste metabólito em machos

foram três ou quatro vezes menores que aqueles níveis máximos de tiocianato encontrados em fêmeas não-gestantes, bem como naquelas gestantes e lactantes. Assim sendo, verifica-se uma significativa diferença entre sexos no que se refere à biotransformação do cianeto, tendo as fêmeas, aparentemente, melhor eficiência neste processo.

Estudos mostram que o organismo pode ser geralmente representado por compartimentos, os quais podem ser descritos matematicamente; tais modelos podem ser de um, dois, ou mais compartimentos. O primeiro destes consiste em um compartimento central, representando o plasma e os tecidos que rapidamente, entram em equilíbrio com o agente tóxico ou metabólito, como coração, pulmão, fígado e rins. Os modelos de dois ou mais compartimentos, estão conectados a um ou mais compartimentos periféricos, que representam os tecidos os quais entram em equilíbrio mais vagorosamente como, por exemplo, o tecido adiposo (MEDINSKY; VALENTINE, 2001). Para a avaliação dos parâmetros toxicocinéticos de fêmeas, em diferentes fases de vida (creche, terminação, gestação e lactação), realizada neste estudo, adotou-se o modelo monocompartimental.

A comparação entre os dados dos níveis séricos de tiocianato permitiu verificar que, apesar do comportamento da curva relativa à concentração de tiocianato ao longo do tempo ter sido semelhante entre os distintos grupos (creche, terminação, gestação e lactação), o período de tempo no qual se iniciou o aumento significativo dos níveis séricos deste metabólito foi mais precoce nas fêmeas em fase de creche, cujo aumento significativo foi observado 30 minutos após a exposição ao KCN e mais tardio nas porcas lactantes, na 6ª hora após a ingestão do mesmo. Tal fato pode ser explicado pela relação do pKa do cianeto e o pH do ambiente gastrointestinal, uma vez que o cianeto é um ácido fraco, com pKa de 9,22 (CALIAMANIS; MCCORMIK;

CARPENTER, 2000); poderia-se supor que há diferenças no pH do estômago destes animais, já que a alimentação destes é diferenciada para cada estágio de vida. Portanto, seguindo-se este raciocínio, seria possível inferir que o compartimento gástrico de fêmeas, em fase de creche, teriam o pH mais ácido que o das outras fêmeas em diferentes estágios de vida e/ou fisiológicos, o que permitiria gerar maior quantidade de moléculas não-ionizadas, acarretando em maior eficácia na absorção do cianeto, e o contrário ocorreria com as fêmeas lactantes. É possível ainda que este fato esteja relacionado à velocidade de formação do tiocianato devido a diferentes níveis enzimáticos de rodanase (ou acetilsulfotransferase) existentes em diferentes condições fisiológicas, o que acarretaria em maior ou menor eficiência na formação do tiocianato.

A análise dos dados relativos aos níveis séricos de tiocianato mostrou, ainda, que os animais gestantes tiveram, de maneira geral, níveis superiores quando comparados aos valores das fêmeas não prenhes e lactantes. Uma possível explicação para este fato poderia estar associada à transformação do cianeto em tiocianato pela placenta, já que, este órgão possui quantidades elevadas da enzima rodanase (TEWE; MANER; GOMEZ, 1977). Desta maneira, a placenta seria um local adicional para a formação do metabólito do cianeto. Corrobora com esta suposição os dados relativos ao C_{max} , e T_{max} , parâmetros que indicam o pico da concentração sérica de qualquer substância, e o tempo em que isto ocorre, neste caso o tiocianato, portanto, quanto maior o valor da C_{max} , e mais precoce ocorrer o T_{max} , maior será a taxa de transformação do cianeto em tiocianato, cujos valores mais altos foram encontrados no grupo de fêmeas gestantes. Ainda, quanto maior o valor da ASC e o menor *clearance*, maior é a exposição à substância (VRIES, 1996), correlação esta também encontrada nessas fêmeas gestantes; portanto, pode-se

sugerir aqui que este grupo de fêmeas gestantes possui melhor eficiência de biotransformação e menor eficiência de eliminação e, conseqüentemente, ficam mais expostas ao tiocianato, quando comparado àquelas fêmeas que estão em outros diferentes estágios de vida e/ou fisiológicos.

Ainda, levando-se em conta a comparação desses níveis séricos de tiocianato, nas diferentes fases estudadas (creche, terminação, gestação e lactação), a observação de picos séricos de tiocianato, diferenciado para cada fase, ou seja, 12º hora para fêmeas, jovens, com 60 dias de idade e para fêmeas com 95 dias de idade (creche e terminação respectivamente), 6º hora para o grupo de mães com 80 dias de gestação e 15º hora para as mães com 21 dias de lactação, permitem inferir que a condição fisiológica (prenhe, não prenhe e lactante), influencia sobremaneira a cinética de transformação do cianeto em tiocianato.

Por outro lado, seria esperado que o aumento significativo nos níveis de tiocianato nas mães gestantes fosse também o mais precoce que de outras fêmeas nos diferentes estados fisiológicos e não nas fêmeas na fase de creche. Contudo, deve-se considerar que há redistribuição do tiocianato nos órgãos ou líquidos corporais destas fêmeas, bem como a passagem do cianeto para o feto, pois, substâncias aniônicas, tais como ácidos fracos, podem se acumular no embrião (DENCKER; DANIELSSON, 1987), possivelmente devido ao gradiente de pH entre o plasma materno, que é mais ácido em relação ao pH do plasma fetal, tornando este composto na forma ionizável no embrião. Portanto, supõe-se que embora havendo aumento na capacidade de biotransformação do cianeto por fêmeas gestantes, num primeiro momento pode ter havido um “aprisionamento” do cianeto no feto, o que levaria ao retardo este processo. Além disso, deve-se considerar que parte do tiocianato pode ficar retido no líquido amniótico; de fato, concentrações elevadas de

tiocianato nesse meio foram encontradas em um estudo conduzido em ratas gestantes tratadas com o KCN (SOUSA, 2004).

Ainda, avaliando-se a redistribuição do tiocianato nos diferentes compartimentos e líquidos corporais, deve-se considerar, em especial, a passagem deste metabólito para o leite. Assim, estudos recentes mostram que na glândula mamária existe uma proteína denominada de Na^+I^- *symporter* (NIS), que desempenha a mesma função apresentada na tireóide, ou seja, o transporte de iodeto para o leite (SPITZWEG et al, 1998), já que esta substância seria uma fonte supridora de iodeto para o neonato. Portanto, analogamente ao que ocorre na tireóide, o tiocianato estaria competindo com o iodeto, sendo, então excretado em grande quantidade para o leite. De fato, neste estudo, os níveis de tiocianato no leite das porcas mostraram-se elevados a partir da 6ª hora após a administração, por via oral, do cianeto, junto com ração comercial, na dose única de 3,0 mg/kg. Ainda, esta suposição é confirmada pelos os estudos realizados neste laboratório, os quais mostraram que ratas lactantes intoxicadas com KCN apresentaram níveis elevados de tiocianato no leite (SOUSA, 2004), e pelos parâmetros toxicocinéticos, que revelaram maior valor de constante de eliminação (k_{el}), menor área sobre a curva (ASC), e menor meia-vida de eliminação ($T_{1/2\beta}$).

Considerando-se o volume aparente de distribuição (V_d), verificou-se que, as fêmeas em fase de terminação, apresentaram os maiores valores quando comparados aos valores das fêmeas dos outros grupos experimentais. Este parâmetro não se refere ao volume biológico real, mas representa a extensão da distribuição da substância fora do plasma e dentro de outros tecidos, portanto, um valor de V_d pequeno pode significar que a substância permanece em maior extensão no plasma e um valor grande pode representar maior penetração nos

tecidos (SHARGEL; YU, 1987; VRIES, 1996). Desta maneira, pode-se inferir que o tiocianato apresentou maior penetração nos tecidos destas fêmeas do que nas outras, dos diferentes grupos estudados.

Portanto, os estudos toxicocinéticos evidenciaram claramente que há grandes diferenças no perfil toxicocinético do cianeto, quando se considera o sexo e as distintas fases de vida e/ou fisiológicas da fêmea. Além disto, os dados aqui obtidos permitem sugerir serem as fêmeas gestantes as mais sensíveis, aos efeitos tóxicos produzidos pela exposição crônica ao cianeto, do que as fêmeas em outros estágios fisiológicos.

Sabe-se que, a implantação embrionária na espécie suína ocorre entre o 11º ao 18º dia de gestação e o período do desenvolvimento fetal a partir do 20º dia (POND; MANER, 1984), bem como, que durante a implantação, a interferência de um determinado xenobiótico, pode levar, na maioria das vezes, à embriofetalidade. Desta maneira, como este estudo não tinha por objetivo avaliar as alterações na pré-implantação, escolheu-se administrar o KCN na ração a partir da 3ª semana de gestação (21º dia de prenhez);. além disto, a avaliação ultra-sonográfica destas fêmeas, a partir desta semana, permitiria confirmar a prenhez, a partir da visualização das vesículas embrionárias.

Partindo dos resultados obtidos na Dissertação de Mestrado, foram escolhidas três doses de KCN, a saber: 2,0, 4,0 e 6,0 mg/kg, que equivaleriam, respectivamente, à menor, à intermediária e à maior dose deste xenobiótico, como preconizadas no protocolo de várias agências oficiais de regulamentação (WHO, 1967; OECD, 1997; USEPA, 2000).

Sabe-se que diversos sistemas do organismo são afetados quando da intoxicação crônica por cianeto, motivo pelo qual deve-se escolher corretamente determinados

parâmetros para a correta avaliação destes efeitos (SPENCER, 1999) e que o monitoramento de seu principal metabólito, o tiocianato, é de extrema importância para a confirmação desta exposição crônica. De fato, o aumento dos valores séricos de tiocianato, no presente estudo, foi condizente com a exposição cianídrica das mães, revelando que a administração fracionada das diferentes doses de KCN, junto com a ração comercial, foi satisfatória e mimetizou as condições naturais de exposição a este agente.

Dentre os parâmetros utilizados para a correta avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto estão o peso e o ganho de peso. Desta maneira, o peso corpóreo, principal parâmetro para a avaliação toxicológica, pode apresentar para o pesquisador um aviso, muitas vezes precoce, do aparecimento dos efeitos tóxicos de uma determinada substância nos animais (STEVENS; GALLO, 1989). De fato, inúmeros estudos, encontrados na literatura, relacionam queda do ganho de peso com a ingestão crônica do cianeto em humanos (BLANC et al., 1985), bem como nas diferentes espécies animais, como hamsters (DOHERTY, 1982), suínos (TEWE et al., 1984), frangos de corte (PANIGRAHI et al., 1992), cães (IBEBUNJO; KAMALU; IHEMELANDU, 1992), ratos (GUZMÁN; OCHOA; GIL, 1977 e SOUSA, 2000, 2004), ovinos (ONWUKA et al., 1992) e caprinos (SOTO-BLANCO, 1999, 2003). Por outro lado, os dados obtidos aqui relevaram flutuações nestes parâmetros em alguns períodos. Entretanto, ao contrário do que se esperava, aquelas fêmeas tratadas com as diferentes doses de KCN, não apresentaram queda no ganho de peso, portanto, neste momento não seria possível levantar uma hipótese sobre este parâmetro.

Um importante efeito produzido pela exposição ao cianeto, é aquele referente ao Sistema Nervoso Central (SNC). Neste sentido, foi também objetivo na presente

pesquisa, verificar os efeitos da administração prolongada de cianeto em mães, da espécie suína, sobre este sistema.

Sabe-se que, o comportamento é uma das funções do SNC que pode refletir alguns distúrbios deste sistema, de fato, estudos revelam que seqüelas da intoxicação pelo cianeto em humanos estão associadas à alterações clínico-comportamentais, dentre elas, os sintomas de parkinsonismo, psicose e alterações na personalidade (EL GHAWABI et al, 1975; FINELLI, 1981; UTTI et al, 1985;). Em roedores, as alterações das funções motoras, cognitivas e de memória parecem estar relacionadas à exposição crônica ao cianeto (D'MELLO, 1987; MATHANGI e NAMASIVAYAMA, 2000). Desta maneira, a alteração do comportamento (agressividade), evidenciado, na condução do exame ultra-sonográfico de mães expostas às maiores doses de KCN (4,0 e 6,0 mg/kg), pode estar relacionado à exposição cianídrica. De fato, a hipótese de que o cianeto promove alteração comportamental, é corroborada pelos achados de Soto-Blanco (2003), que ao conduzir o estudo sobre os efeitos do cianeto em cabras gestantes, observou alterações comportamentais, como perda de dominância em detrimento da agressividade de outra cabra exposta ao cianeto de potássio.

Diversas patologias que envolvem o SNC em humanos mostram uma estreita relação com exposição cianídrica; dentre elas, a neuropatia atáxica tropical (TAN), o *Konzo*, a ambliopia por tabaco, a neurite retrobulbar e a atrofia óptica de Lebber (MAKENE; WILSON, 1972; OSUNTOKUN, 1973; TYLLESKÄR, et al., 1995). Desta maneira, o estudo histopatológico do SNC, revelou diminuição da camada granular do cerebelo, degeneração de células de purkinje, bem como acidofilia e vacuolização das mesmas, naqueles animais que receberam a maior dose de KCN, ainda, nesses animais, a análise de córtex cerebral, sugeriu aumento de celularidade

e neuroniofagia. Achado semelhante foi encontrado em uma pesquisa anterior, conduzida neste laboratório, no qual se administrou, prolongadamente, a suínos machos, em fase de crescimento, por 70 dias, o KCN, nas mesmas doses que aqui utilizadas, ou seja, 2,0; 4,0 e 6,0 mg/Kg (MANANO, 2001). Estudos conduzidos em outras espécies animais, tais como ratos (SOUSA, 2004), caprinos (SOTO-BLANCO, 2003) e ovinos (BRADLEY et al., 1995), evidenciaram, além destas alterações, lesão degenerativa no hipocampo, com presença de gliose (aumento de celularidade) e necrose.

São diversas as teorias que procuram explicar quais os mecanismos que levariam a neurotoxicidade produzida pelo cianeto; desta maneira, alguns autores postulam que os efeitos tóxicos do cianeto estariam ligados à produção de radicais livres (espécies reativas do oxigênio) pelas células neuronais, o que levaria a peroxidação lipídica e alteração neuronal (JOHNSON et al., 1987; KANTHASAMY et al., 1997; YAMAMOTO; TANG, 1998). Da mesma forma, Kamalu (1995) sugere que a produção destes radicais livres seria pelos ciclos de hipóxia/normóxia, causados pela liberação do cianeto proveniente da linamarina, atuando sinergicamente, com a deficiência de zinco junto à dieta de mandioca, o que afetaria a síntese de superóxido desmutase. Ainda, Yamamoto e Tang (1998) sugerem que o cianeto promoveria ativação de receptores de N-metil-D aspartato (NMDA), gerando influxo de cálcio, sendo este o responsável pela liberação de glutamato e formação de radicais livres, ainda outros pesquisadores consideram que a toxicidade do KCN ao nível do SNC estaria associada à liberação excessiva de neurotransmissores, metabólitos de noradrenalina e dopamina que, por sua vez, podem gerar, quinonas, hidroquinonas, peróxido de hidrogênio, e oxigênio reativo, os quais mediam ou acentuam a injúria celular; assim, a excessiva liberação, bem como o catabolismo de

neurotransmissores, possivelmente envolvem a oxidação de catecolaminas, o que contribuiria para a peroxidação nas membranas neuronais produzidas pelo cianeto (KANTASAMY et al., 1997). Um outro fator, que também estaria relacionado ao efeito neurotóxico do cianeto, seria a promoção de alterações na composição fosfolipídica de membranas por ativação da enzima fosfolipase A₂ (YANG et al., 1994).

Pelo exposto, sugere-se que a produção de radicais livres seria o principal fator para a ocorrência de lesões neurológicas, por outro lado, Isom e Borowitz (1995) propõem que estes efeitos no SNC sejam seqüelas, decorrentes do *deficit* prolongado de energia, que conduziria a alterações na homeostase celular do íon cálcio, resultando em injúria celular com necrose e apoptose, e que o metabólito do cianeto, ou seja, o tiocianato poderia ser um coadjuvante neste efeito tóxico.

Neste sentido, é plausível inferir também que na gênese deste processo neurotóxico, os fatores coadjuvantes, como os metabólitos, 2-iminotiazolidina-4-carboxílico (metabólito do cianeto por conjugação com cisteína) e o tiocianato, (principal metabólito), estejam envolvidos, uma vez que Bitner et al.(1995, 1997) observaram que o metabólito do cianeto por conjugação com cisteína, apresenta propriedades excitotóxicas, promovendo perda seletiva de neurônios piramidais CA-1 do hipocampo, e que o tiocianato modula a função dos receptores dl-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato (AMPA), uma sub classe de receptores glutaminérgicos, no tecido do SNC (SPENCER, 1999). De fato, Sousa (2004) sugere que tiocianato seja o produtor desta lesão, uma vez que em ratas expostas a esta substância claramente mostraram lesões ao nível do SNC, semelhantes às aquelas verificadas quando da administração de KCN, e sabendo-se que, não há conversão

de tiocianato para cianeto, é possível supor que esse metabólito, tenha participação na neurotoxicidade produzida pela exposição contínua de KCN.

Entre as principais manifestações do organismo frente à exposição cianídrica, está o bócio. De fato, vários trabalhos, associam os elevados níveis sanguíneos de tiocianato com a insuficiência tiroideana em diferentes espécies animais, como em ratos (EKPECHI; DIMITRIADO; FRASER, 1966, SOUSA, 2000, 2004; TEWE, MANER; GOMES, 1977), suínos (MANZANO, 2001; OKE, 1984, ONG, 1989; TEWE, 1992), cães (KAMALU; ANGHRANYA 1991), caprinos (BAHRI, 1987, SOTO BLANCO, 1999, 2003) e ovelhas (GUTZWILLER, 1993). Atualmente, este efeito tireotóxico do tiocianato é bem conhecido. Assim, sabe-se que a mesma bomba ativa que carrega os íons iodetos para dentro da glândula tireóide, também carrega o tiocianato, que tem elevada afinidade pela proteína carreadora do iodeto (NIS Na^+I^- *sympoter*). Desta forma, elevados níveis deste causam inibição competitiva do transporte de iodeto para dentro da célula, isto é, inibe o aprisionamento do iodeto circulante. A disponibilidade diminuída do iodeto nas células foliculares não impede a formação de tireoglobulina, entretanto, não permite que esta se torne iodetada, impedindo, conseqüentemente, a formação dos hormônios tiroideanos (KANEKO, 1997). A deficiência dos hormônios tiroideanos, por sua vez, leva à secreção aumentada do hormônio estimulante da tireóide (TSH) pela glândula hipófise anterior, o que causa a hipertrofia da glândula tireóide, apesar de formar quantidades adequadas de hormônios tiroideanos (HANES; MURAD, 1987). Desta maneira, o tiocianato, ao bloquear a secreção da tireóide pode levar ao aumento desta glândula, o qual é denominado bócio (KANEKO, 1997).

Segundo Kaneko (1997), há dois tipos de bócio, aquele não tóxico, que é ainda subdividido em bócio simples e hipotireoidismo, e o tóxico. No bócio simples, os níveis

dos hormônios tiroideanos estão na faixa de normalidade, que decorre do aumento compensatório da massa glandular da tireóide, maximizando a captura de iodeto e secretando quantidades normais dos hormônios tiroideanos. Caso o estímulo prossiga, o bócio simples pode evoluir para o hipotireoidismo, no qual os níveis dos hormônios tiroideanos estão diminuídos, evidenciando desta forma, sinais clínicos como a obesidade, o mixedema, a pele seca, perdas de pêlos e cabelos e, na forma mais grave, o aparecimento do cretinismo.

Parcos são os dados existentes na literatura, relativos ao comportamento dos hormônios tiroideanos durante a prenhez na espécie suína; no entanto, em um destes raros estudos, Durdevic, et al., 1988 propuseram que há um comportamento diferenciado dos níveis de T3 e T4, nas diferentes faixas etárias desta espécie, e que em porcas gestantes há uma flutuação nestes níveis, entre o 5º e o 19º dia de gestação. Assim, talvez, a avaliação destes hormônios tiroideanos, realizada somente no 110º dia de prenhez, não tenha sido suficiente para estimar os efeitos produzidos pelo cianeto, na glândula tireóide de suínos, fêmeas, durante a gestação. Por outro lado, na histopatologia, esta glândula mostrou-se alterada naquelas fêmeas pertencentes aos grupos experimentais, o que sugere que o tiocianato tenha promovido alterações na fisiologia da tireóide. De fato, estudos semelhantes, realizados com cabras (SOTO-BLANCO et al, 2001) e ratas (SOUSA, 2004), bem como em suínos machos (MANZANO, 2001) associaram as lesões de tireóide, como por exemplo, o aumento dos vacúolos de reabsorção, à exposição cianidrica; no entanto, da mesma maneira que aqui, não encontraram alterações hormonais.

A avaliação do efeito tireotóxico de uma substância pode também ser feita, de maneira indireta, por meio da análise dos níveis sanguíneos de colesterol, pois se sabe que os hormônios tiroideanos, promovem diminuição nos níveis do colesterol

sanguíneo (KANEKO,1997); portanto, a concentração sanguínea desta substância é inversamente proporcional àquela dos hormônios da tireóide. Neste sentido, no hipotireoidismo, os níveis séricos de colesterol apresentam-se elevados, em qualquer espécie animal estudada.

Os dados relativos à dosagem de colesterol nas fêmeas gestantes revelaram flutuações discretas nos níveis desta substância, entre os grupos experimentais, nos diferentes dias avaliados, o que permite inferir que a exposição cianídrica não promoveu alterações significantes no metabolismo do colesterol em fêmeas gestantes. De fato, embora a análise estatística tenha revelado aumento ou diminuição significativa nos valores sanguíneos desta substância em alguns dos dias da gestação avaliados, deve-se considerar que, de maneira geral, em qualquer dosagem sanguínea de substâncias e enzimas, há tabelas de referência com valores mínimos e máximos; portanto, embora o teste estatístico possa detectar alterações, estas podem estar dentro dos limites da normalidade (KANEKO, 1997).

Foram Okolie e Osagie (1999), os primeiros a descreverem que a intoxicação prolongada por cianeto poderia causar também comprometimento hepático em coelhos. Em uma pesquisa subsequente, realizada neste laboratório, Manzano (2001) também verificou tal alteração quando da administração prolongada de cianeto em porcos machos. Posteriormente, um outro trabalho, desenvolvido em ratos, revelou a mesma alteração, quando da mesma exposição (SOUSA, 2004). Os estudos aqui realizados, em porcas gestantes, revelaram que, embora a avaliação bioquímica (dosagens de AST, ALT e GGT), não tenha apontado alterações significantes entre os diferentes grupos, a histopatologia revelou intensa degeneração vacuolar de hepatócitos. Portanto, este achado corrobora com os

trabalhos antecessores, mostrando que, de fato, o cianeto e/ou o tiocianato, possui (em) efeito hepatotóxico.

Uma outra patologia que vem sendo associada à exposição prolongada ao cianeto é a nefrotoxicidade (KAMALU, 1993; OKOLIE E OSAGIE, 1999; MANZANO, 2001; SOUSA et al., 2002). Os achados na presente pesquisa, ratificam estes achados, verificando-se degeneração vacuolar no epitélio tubular em todos os animais, dos diferentes grupos experimentais; além disto, verificou-se que, embora não tenham sido detectadas alterações significantes nos níveis séricos de creatinina, a uréia sangüínea mostrou-se aumentada naqueles animais tratados com as diferentes doses de cianeto, particularmente naquelas fêmeas pertencentes ao grupo tratado com a maior dose de KCN, já a partir do 50º dia de gestação.

São duas as hipóteses que permitiriam explicar o efeito nefrotóxico aqui verificado. O primeiro seria de que a enzima rodanase, também presente nos rins, quando da exposição prolongada ao cianeto, teria comprometida a sua função e, conseqüentemente, permitiria a formação de radicais livres, promovendo a subsequente peroxidação das membranas de células renais (ALETOR, 1993). Uma outra possível explicação seria de que o tiocianato, por ser vasodilatador, poderia promover nefrose, quando encontrado em concentrações elevadas ao nível renal. De fato, o tiocianato já foi amplamente utilizado, na clínica de humanos, como medicamento anti-hipertensivo, devido à sua potente atividade vasodilatadora (CARRASCO, 1993). Como em um estudo anterior, realizado em ratos, no qual se administrou prolongadamente, o cianeto ou somente o tiocianato, verificou-se o desenvolvimento da lesão renal nos animais de ambos os grupos (SOUSA, 2004), pode-se sugerir que, a segunda conjectura seja aquela mais provável de ocorrer para explicar a gênese do desenvolvimento da nefrotoxicidade.

Alguns trabalhos na literatura, sejam eles levantamentos epidemiológicos em humanos (MCMILLAN; GEEVARGHESE, 1979), quanto aquele experimental, conduzido em cães (KAMALU, 1991), vêm associando a ingestão prolongada de cianeto com o desenvolvimento de diabetes pancreática (“diabetes do tipo J”).

Os resultados relativos à avaliação dos níveis sanguíneos de glicose, na presente pesquisa, mostraram não haver aumento dos níveis desta substância; por outro lado, os achados histopatológicos do pâncreas, revelaram desorganização do parênquima pancreático em todas as mães experimentais, bem como desorganização dos ácinos e diminuição dos grânulos de zimogênio; sendo que estas alterações ocorreram de maneira dose-dependente. Uma provável hipótese seria de que a condição fisiológica - gestação - tenha influenciado para o surgimento dessas lesões. De fato, está bem estabelecido que a diabetes *de per se* possui efeito diabetogênico (WHITE, 1974); neste sentido, sabe-se que, uma das principais causas da diabetes gestacional se deve a uma demanda de insulina, devido ao decréscimo da sensibilidade dos tecidos maternos a este hormônio (NIEUWENHUIZEN et al., 1997); Portanto, parece que a prenhez aumenta a sensibilidade a agentes químicos que promovem alterações no metabolismo de ilhotas pancreáticas. Corrobora com esta suposição quando se realiza a comparação entre os dados obtidos, neste laboratório, quando se administrou, prolongadamente o cianeto em suínos machos, por 70 dias, o qual mostrou não haver nenhuma alteração, tanto na avaliação bioquímica quanto na histopatológica, que sugerisse qualquer indício de efeitos tóxicos ao nível pancreático (MANZANO, 2001). Em adição, um estudo realizado por Sousa (2000), revelou que a administração de cianeto em ratos machos, por duas semanas, não produziu qualquer alteração nos níveis séricos de glicose, bem como na morfologia do pâncreas; no entanto, quando fêmeas gestantes foram expostas,

pelo mesmo período de tempo e mesma dose de KCN, estas apresentaram tanto aumento nos níveis séricos de glicose, como depleção de células das ilhotas de Langerhans (SOUSA, 2004).

Outro achado interessante na presente pesquisa foi aquele relacionado ao estudo histopatológico dos pulmões, que evidenciou espessamento dos septos alveolares, caracterizando pneumonia intersticial. O comprometimento do tecido pulmonar, foi recentemente, descrito por Okolie e Osagie (2000), em coelhos alimentados com dieta contendo cianeto (702ppm), nesse estudo, esses pesquisadores, observaram edema e necrose do parênquima pulmonar, bem como diminuição nos valores de fosfatase alcalina. O mecanismo proposto por eles, para a promoção de dano histotóxico do tecido pulmonar, seria através do dano à hipóxia celular, que promoveria aumento à permeabilidade da membrana celular e, conseqüentemente, extravasamento da fosfatase alcalina do tecido injuriado pelo cianeto. Outra hipótese seria que a lesão pulmonar poderia ter origem cardiotônica, resultado do efeito direto do cianeto sobre o miocárdio, levando a falência ventricular esquerda e aumento da pressão capilar pulmonar (GRAHAM, et al, 1995). Contudo, da mesma maneira que Okolie e Osagie (2000), na presente pesquisa, não foi observado lesão ao nível cardíaco, portanto, esta última hipótese seria a menos provável para explicar a gênese do efeito pneumotóxico promovido pela exposição prolongada ao cianeto.

Assim, a hipótese mais provável, no presente momento, para o comprometimento pulmonar, pode ter sido aquela decorrente do acúmulo do cianeto e/ou tiocianato no epitélio alveolar e do endotélio capilar, pois sabe-se que esta substância é rapidamente absorvida pelos tecidos, e em particular pelos pulmões (MONTGOMERY, 1980). Desta maneira, como existem poucos relatos ligando a intoxicação crônica por cianeto à injúria pulmonar, e como as fontes de exposição ao

cianeto são inúmeras, pode-se presumir que há grande possibilidade de ocorrências deste tipo de lesão, tanto no ser humano como em animais, portanto, por este motivo, estudos futuros devem ser realizados, procurando-se também verificar as possíveis causas destes efeitos pneumotóxicos encontrados.

A toxicologia do desenvolvimento, nos dias de hoje, não se limita apenas ao estudo das mal formações anatômicas macroscópicas, mas abrange o estudo da cinética, do mecanismo de ação tóxica, da patogênese e das conseqüências da exposição aos agentes tóxicos ou condições que levam ao desenvolvimento anormal do animal, tais como, retardo do crescimento e distúrbios bioquímicos. (ROGERS; KAVLOK; 2001). Segundo Wilson (1977), a teratologia pode ser definida como “a ciência interessada em determinar as causas, os mecanismos e as manifestações dos erros no desenvolvimento, sejam eles estruturais ou funcionais e podem ser iniciados em qualquer período entre a fertilização e a maturação pós-natal”.

Atualmente, existem muitas informações disponíveis sobre a origem das desordens do desenvolvimento, resultante da exposição perinatal. No entanto, há uma grande preocupação dos pesquisadores, relativa a acurácia dos protocolos existentes, para aferir adequadamente os potenciais riscos da exposição às diversas substâncias químicas, durante o desenvolvimento. Neste sentido, embora existam pequenas variações nos protocolos de avaliação de risco de toxicologia pré natal, entre as agências de regulamentação, de maneira geral, estas requerem, para o teste, um grupo de animais controle, e no mínimo, outros três, nos quais os animais receberão as diferentes doses da substância química a ser avaliada. Em geral, a escolha destas doses são baseadas nos seguintes critérios: uma que produza efeitos tóxicos, uma outra em que os animais não manifestem qualquer alteração de

toxicidade, e outra intermediária entre elas. (WHO, 1967; USEPA, 1991; OECD 1996).

O maior problema envolvido na avaliação de segurança de agentes químicos e seus potenciais efeitos teratogênicos para humanos é a possibilidade de serem cometidos equívocos na extrapolação dos dados obtidos em animais de laboratório, como; ratos, camundongos e coelhos, para o homem. De fato, a resposta de uma substância química para um particular modelo animal é quase tão variável quanto ao número de substâncias testadas (SCHARDEIN, SCHWETZ; KENEL, 1985). Além disso, os tipos de efeitos no desenvolvimento observados em animais não necessariamente são os mesmos que possam ser provocados em humanos, neste sentido, pode-se exemplificar tal situação pelo caso clássico ocorrido com a talidomida, que é teratogênica para o homem, mas não para ratos. Portanto, a extrapolação dos dados obtidos em uma única espécie animal para a exposição humana sempre permanece incerta, principalmente devido a diferença entre as espécies (NAU, 1986). Neste sentido, Claudio et al., 1999 creditam, como um dos maiores limitantes nos protocolos de avaliação, o fato de que nestes haja a indicação de uso de duas espécies animais, sendo uma roedora (normalmente o rato) e uma outra não roedora (normalmente o coelho); no entanto, como o homem é uma das espécies mais sensíveis aos teratógenos (SCHARDEIN, KELLER, 1989), é necessário que se incentivem pesquisas, buscando outras espécies animais que melhor afirmem a potencial teratogenicidade de uma determinada substância.

Portanto, foram duas as propostas nesta parte da presente pesquisa: a de avaliar os possíveis efeitos teratogênicos produzidos pelo cianeto e também de inserir o suíno como modelo experimental para os testes de teratogenicidade e/ou toxicologia do desenvolvimento; uma vez que, esta espécie animal é aquela que melhor

representa a condição humana, no que diz respeito a similaridades anatômicas e fisiológicas (TUMBLESON, 1986). De fato, uma busca na literatura mostra que o suíno possui o mesmo padrão alimentar bem como fisiologia digestiva, hábitos dietéticos, estrutura e funções do rim, estrutura vascular do pulmão, distribuição da artéria coronária, propensão a obesidade e comportamento social, semelhante ao humano, e além disto é também onívoro. Tais semelhanças vêm credenciando o uso desta espécie animal para a avaliação de uma série de substâncias tóxicas, bem como medicamentos. Esta espécie animal também tem sido empregada como modelo para o estudo de transplante de órgão, hemorragia e choque séptico (TUMBLESON, 1986).

Em contraposição à farta literatura, apontando a espécie suína como um excelente modelo animal, em diversos setores da ciência médica, quando se refere à toxicologia do desenvolvimento, muito pouco tem sido explorado. Neste sentido, os dados relacionando esta espécie animal à malformações se limitam aos achados de campo (CROWE; PIKE, 1973; SHARMA et al, 1978) e aos raros estudos experimentais (WEDIG et al., 1977; ZOMBORSKY-KOVÁCS, 2000) mas, não se baseiam nos principais parâmetros propostos pelas agências de regulamentação de protocolos de teratogenicidade (isto é, tempo de administração e/ou a utilização das três doses da substância a ser avaliada).

No presente estudo, as três doses de cianeto, administradas em marrãs, durante a prenhez, foram escolhidas à partir dos resultados obtidos, com suínos machos, na Dissertação de Mestrado (MANZANO, 2001). Ainda, considerando-se que, as principais agências normativas preconizam que a administração da substância química, a ser testada, deva abranger desde a implantação (ou acasalamento) até

toda a organogênese ou parto, no presente estudo, a administração, ocorreu a partir do 21º dia de gestação (pós-implantação) até o dia do parto.

As imagens de ultra-som têm sido consideradas importantes ferramentas para o estudo de fetotoxicidade e teratogenicidade em algumas espécies animais; assim, alterações em alguns parâmetros fetais, tais como: movimentos fetais, comprimento crânio-caudal, diâmetro biparietal e diâmetro do tórax, podem servir de indicadores precoces de anomalias do conceito (PANTER et al., 1988). De fato, um estudo realizado neste laboratório, acompanhando-se, por meio de ultra-som, a gestação de cabras expostas a uma planta tóxica, a *Ipomoea carnea*, evidenciou o efeito teratogênico produzido por esta planta ainda *in utero* (SHUMAHHER-HENRIQUE, 2005). Uma outra vantagem do uso da ultra-sonografia, nesta pesquisa, foi a de que este exame possibilitou diagnosticar precocemente a gestação; neste sentido, Viana e colaboradores (2006), verificaram 97,5% de acurácia no diagnóstico de gestação, utilizando-se de transdutor com frequência de 5MHz, idêntico ao aqui utilizado. Portanto, a realização do diagnóstico de prenhez precoce possibilitou que se administrasse o cianeto imediatamente após a implantação, permitindo, assim, que os animais recebessem o agente tóxico em todo o período organogenético e de desenvolvimento fetal.

A ultra-sonografia revelou abortos e/ou reabsorções em algumas mães que receberam as doses de 2,0 e 6,0 mg/kg de KCN, já nos primeiros dias de administração do cianeto. Provavelmente, se não houvesse esta avaliação não seria possível excluir a possibilidade de erro no diagnóstico da gestação. Portanto, o exame ultra-sonográfico propiciou identificar o efeito embriotóxico produzido pelo cianeto. Neste aspecto, deve-se considerar que o abortamento é um efeito drástico altamente importante em toxicologia reprodutiva e que algumas plantas

cianogênicas, tais como *Sorghum* e *Cynodon aethiopicus* vêm sendo associadas ao abortamento em éguas e ovelhas (BRADLEY, *et al*, 1995 e RODEL, 1972). Além disto, uma pesquisa conduzida neste laboratório, administrando-se diferentes doses de KCN à cabras gestantes, também revelou haver abortamentos em algumas fêmeas tratadas com a maior dose do cianeto (SOTO-BLANCO; GÓRNIK, 2004).

Embora o exame ultra-sonográfico tenha permitido verificar a embriofetividade produzida pelo cianeto, não foi observada nenhuma outra alteração naqueles fetos, provenientes de marrãs, pertencentes aos grupos submetidos à administração de diferentes doses de KCN, nos diferentes parâmetros avaliados. No entanto, cabe ressaltar que, a gestação de suínos é normalmente múltipla, com um número de fetos ao redor de 10; desta maneira, não seria possível afirmar que um feto avaliado, por exemplo, no 45º dia de gestação seria o mesmo no qual se realizou as mensurações em outros dias (55º e 65º dia de prenhez). Assim, é objetivo de futuras pesquisas procurar diferenciar *in útero*, um ou dois fetos, e realizar todas as medidas de desenvolvimento fetal, sempre neste(s) mesmo(s) conceito(s).

Uma das maiores limitações nos protocolos para avaliação de teratogenicidade se refere à ausência de exame nos filhotes, em qualquer fase pós-natal, o que, na maioria das vezes, poderá levar a erros no julgamento sobre o efeito teratogênico da substância testada. Como exemplo, cita-se o heptacloro, que produz aumento de mortalidade pós-natal, somente após o 6º dia de vida; esta mesma substância pode produzir catarata, cuja manifestação ocorre 21 dias após o nascimento (NAROTSKY; KAVLOCK, 1995). Portanto, neste estudo, procurou-se também avaliar os possíveis efeitos pós-natais em filhotes de marrãs tratadas com as diferentes doses de KCN.

De fato, a avaliação daqueles filhotes ao nascer, provenientes de mães expostas ou não ao cianeto, não revelou qualquer alteração morfológica; por outro lado,

embora as alterações bioquímicas durante o desenvolvimento pós-natal não permitissem concluir sobre possíveis disfunções, a avaliação histológica dos filhotes de mães tratadas com as diferentes doses de KCN no abate (120 dias de vida), mostraram evidentes alterações na glândula tireóide, bem como em pulmão, o que permite supor que estes efeitos teratogênicos manifestaram-se num período muito depois do nascimento. Contudo, deve-se considerar que pode ter havido também a exposição das proles ao tiocianato nos primeiros dias pós-natal, já que elevados níveis deste metabólito foram encontrados no colostro das mães experimentais; assim, futuramente será necessário realizar estudos que monitorem os níveis lácteos de tiocianato logo após a retirada do KCN (ou seja, após o parto).

Além das alterações histológicas, a avaliação pós-natal mostrou que as proles provenientes de mães dos diferentes grupos experimentais, apresentaram menores índices de peso ao nascer e, de maneira geral, obtiveram desempenho menor quando comparado às proles provenientes do grupo controle. Ainda, quando se avaliou a natimortalidade, verificou-se que os maiores índices foram aqueles encontrados nos grupos experimentais. Também, em relação aos outros parâmetros pós-natais aferidos: mortalidade do parto ao desmame, de creche e do crescimento à terminação; do desempenho, estimado através do ganho de peso médio diário, nas diferentes fases de vida, bem como do peso e ganho de peso avaliados durante o período de 120 dias após nascimento, verificou-se que os leitões pertencentes às fêmeas, tratadas com as diferentes doses de cianeto, durante a gestação, apresentaram os piores zootécnicos. Este achado corrobora com um estudo anterior, realizado neste laboratório, no qual se verificou, em ratos, que os efeitos tóxicos da administração prolongada durante a gestação, promoveu significantes alterações no conceito; entretanto, estas foram evidenciadas somente alguns dias pós-natal e não

na incidência de malformações e anomalias, esqueléticas e viscerais fetais (SOUSA, 2004).

É bem conhecido que a toxicidade materna pode levar a efeitos tóxicos no feto (KHERA, 1984); portanto, pode se supor que as alterações verificadas nos leitões provenientes de mães, expostas às diferentes doses de KCN, poderiam ser decorrentes desta intoxicação. No entanto, esta possibilidade é improvável, pois o padrão de lesão encontrado nestes filhotes foi similar àquele verificada em caprinos (SOTO-BLANCO et al, 2002), ratos (SOUSA et al., 2001) e suínos (MANZANO, 2001) expostos prolongadamente ao cianeto, bem como aquelas aqui verificadas, em suas próprias mães.

Concluindo, a realização da presente pesquisa permitiu substancial melhoria na técnica para dosagem do tiocianato em diferentes fluidos biológicos (soro, líquido amniótico, colostro e leite). O aperfeiçoamento desta técnica possibilitou a realização do biomonitoramento da exposição ao cianeto na espécie suína, em diferentes fases de vida e/ou fisiológica, mostrando que o grau de exposição a este agente varia substancialmente, considerando-se cada uma destas fases. Além disto, o estudo aqui realizado permite sugerir ser a espécie suína um excelente modelo para a avaliação da teratogenicidade.

6 CONCLUSÕES

- A metodologia, para a dosagem de tiocianato nos diferentes líquidos biológicos, foi eficaz e confiável para o monitoramento da intoxicação prolongada por cianeto na espécie suína.
- A administração de cianeto de potássio, junto a ração comercial, mimetizou as condições naturais de exposição cianídrica.
- Os estudos de transformação do cianeto, utilizando o tiocianato como biomarcador, possibilitaram verificar que os diversos parâmetros toxicocinéticos avaliados, diferem na espécie suína, quando considerado: o sexo, a faixa etária e o estado fisiológico. Ainda, esta avaliação permitiu inferir que as mães gestantes ficam mais expostas ao tiocianato e as mães lactantes menos e que, há transferência de tiocianato materno para a prole por meio do leite.
- O exame ultra-sonográfico propiciou identificar o efeito embriotóxico produzido pelo cianeto, sendo portanto uma boa ferramenta para avaliação da toxicidade reprodutiva.
- A toxicidade do cianeto é dependente do sexo e do estado fisiológico na espécie suína.

- O estudo histopatológico mostrou alterações evidentes em SNC, tireóide, fígado, rim, pulmão e pâncreas, de mães expostas as diferentes doses de KCN.
- Elevados níveis de tiocianato foram encontrados no líquido amniótico e no colostro de mães expostas às diferentes doses de KCN e no soro dos seus leitões, portanto fornecem indícios que, haja transferência e/ou formação desse metabólito por via placentária, e transferência por via glândula mamária.
- O estudo histopatológico mostrou alterações evidentes em tireóide e pulmões de suínos, provenientes de mães expostas às diferentes doses de KCN, durante a gestação, no abate, ou seja aos 120 dias após o nascimento.
- A exposição prolongada do cianeto de potássio, na espécie suína, foi capaz de gerar toxicidade materna bem como toxicidade do desenvolvimento de sua prole.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, L. G.; DOLLAHITE, J. W.; ROMANE, W. M.; BULLARD, T. L.; BRIDGES, C. H. Cystitis and ataxia associated with *Sorghum* ingestion by horses. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 155, n. 3, p. 518-524, 1969.

ARAUJO, M. C. K.; SILVA, M. H. B.; DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. A tireóide no feto e no recém-nascido: peculiaridades funcionais e principais doenças tiroideanas. **Pediatria**, São Paulo, v. 25, n. 1/2, p. 51-60, 2003.

AKANJI, A. O.; FAMUYIWA, O. O. The effects of chronic cassava consumption; cyanide intoxication and protein malnutrition on glucose tolerance in growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 69, n. 1, p. 269-276, 1993.

ALETOR, V.A. Cyanide in gari.2. Assessement of some aspects of the nutrition, biochemistry and hematology of the rats fed gari contain varying residual cyanide levels. **Interntional Journal of food Sciences and Nutrition**, v.44, n.4, p.289-295, 1993.

AMINLARI, M.; VASEGUHI, T.; ALI KARGAR, M. The Cyanide-Metabolizing Enzyme Rhodanese in Different Parts of Respiratory Sytems of Sheep and Dog. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 124, n. 1, p. 67-71, 1994.

ANSELL, M.; LEWIS, A. S. A Review of Cyanide Concentrations Found in Human Organs. **Journal of Forensic Medicine**, v. 17, n. 14, p. 148-152, 1970.

ASTDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES E DISEASE REGISTRY. Cyanide toxicity. **American Family Physician**, v. 48, n. 1, p. 107-114, 1993.

ASTDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES E DISEASE REGISTRY. Public Heath Statement: Cyanide. Disponível em:< <http://www.astdr.cdc/ToxProfiles/phs8812.html>> Acesso em: 26 abr. 2001.

BAHRI, S. Chronic Effect of Leaves on Plasma Thiocyanate and on Performace of the goat thyroid Gland. **Peniakit Hewan**, v. 19, n. 34, p. 88-90, 1987.

BALLENTYNE, B. Toxicology and hazrd evaluation of cyanide fumigation powders, **Clinical Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 325-335, 1988.

BASKIN, S. I.; BREWER, T. G. Chaper 10: Cyanide Poisoning. In: SIDELL. R. F.; TAJAFUJI, E.; T e FRANZ, D. R. (Ed.). **Texbook of Military Medicine**: Published by the office The SURGEON GENERAL at TMM Publications, Borden Institute, Water Reed Army Medical Center, Washington. Medical Aspectes of Chemical an Biological Warfare:, 1997, p. 271-286.

BASKIN S. I.; WILKERSON, G.; ALEXANDER, K.; BLISTEIN, A. G. Cardiac effects of cyanide in: BALLANTYNE, B.; MARRS, T. C. (Ed). **Clinical and experimental toxicology of cyanides**. Bristol, England: Wright, 1987, p. 138-155.

BEASLY, D. M. G.; GLASS, W. I. Cyanide Poisoning: **Patophysiology and Treatment Recommendations, Occupational Medicine**, v. 48, n. 3, p. 427-443, 1998.

BELFORD, P.; ORLANDO, O. **Medicina Perinatal**. São Paulo: Manole, 1993. p. 39-35.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNADINI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 691-699.

BITNER, R. S.; KANTHASMY, A.; ISOM, G. E.; YIN, G. K. W. Seizures and selective CA-1 hippocampal lesions induced by excitotoxic cyanide metabolite, 2-iminothiazolidine-4-carboxylic acid. **Neurotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 115-122, 1995.

BITNER, R. S.; YIM, G. K. W.; ISOM, G. E. 2-iminothiazolidine-4-carboxylic acid produces hippocampal CA1 lesions independent of seizure excitation and glutamate receptor activation. **Neurotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 191-200, 1997.

BLANC, P.; HOGAN, M.; MALLIN, K.; HRYHORCZUK, D.; HESSL, S.; BERANARD, B. Cyanide intoxication among silver-reclaiming workers. **Journal of the American Association**, v. 253, n. 3, p. 367-371, 1985.

BRADLEY, G. A.; METCALF, H. C.; REGGIARDO, C.; NOON, T. H.; BICKNELL, E. J.; LOZANO-ALARCON, F.; FREED, R. E.; RIGGS, N. W. Neuroaxonal degeneration in sheep grazing *Shorghum* pastures. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 2, p. 229-236, 1995.

- BRUCE, R. B.; HAWARD, J. W.; HANZAL, R. L. Determination of cyanide, thiocyanate, and alpha-hydroxynitriles in plasma or serum. **Analytical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1346-1347, 1955.
- BUZALEH, A. M.; VASQUEZ, E. S.; ALCIRA, M.; BATLLE, C. Cyanide Intoxication - I, An Oral Chronic Animal Model. **Gen. Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 323-327, 1989.
- CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. Glicosídeos cianogênicos da cassava: biossíntese, distribuição, destoxicação e métodos de dosagem. In: Cereda. M. P. (Coord.) Agricultura: **Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002, v. 2, cap. 5, p. 83-99.
- CALIAMANIS, A.; MCCORMIK, M. J.; CARPENTER, P. D. Enhanced conductometric detector of cyanide in suppressed ion chromatography. **Journal Chromatography**, A, v. 884, n. 1, p. 75-80, 2000.
- CAMPANA, S. G.; CHAVEZ, J. H.; HAAS, P. Diagnostico laboratorial do líquido amniótico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 3, p. 215-218, 2003.
- CARRASCO, N. Iodide transport in the thyroid gland. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1154, n. 1, p. 65-82, 1993.
- CARVALHO, V. D.; CARVALHO, J. G. Princípios tóxicos da Mandioca. In: **Informativo Agropecuário**, Belo Horizonte , v. 5, n. 59/60, p. 82-88, 1979.

CHANDRA, H.; GUPTA, B. N.; BHARGAVA, S. H.; CLERK E MAHENDRA, P. N.

Chronic Cyanide Exposure - A Biochemical and Industrial Hygiene Study. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 161-165, 1980.

CHASIN, A. A. M.; SALVADORI, M. C. Validação de Métodos Cromatográficos em Análises Toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994.

CHEEK, P. R.; SHULL, L. R. Glycosides. In: **Natural toxicants in Feeds and poisonous Plants**, Westport: Avi, 1985, p. 173-234.

CHEN, S. H.; WU, S. M.; KOU, H. S.; WU, H. L. Elettron- Capture gas Chromatographic determination of cyanide, iodine, nitrile, sulfide, and thiocyanate anions by phase-transfer catalyzed derivation with pentafluorbenzyl bromide. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 81-85, 1994.

CHEN, S. H.; YANG, Z. Y.; KOU, H. S.; WU, H. L.; LIN, S. J. Determinaton of thiocyanate anion by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 38-42, 1996.

CHIN, R. G.; CALDERON, Y. Acute Cyanide Poisoning: A Case Report. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 4, p. 441-445, 2000.

CLAUDIO, L.; BEARER, C.F.; WALLINGA, D. Assessment of the U.S. environmental protection agency methods for identification of hazards to developing organism, part

II: the developing toxicity testing guideline. **American Journal of Industrial Medicine**, v.35, n.6, p. 554-563, 1999.

CONN, E. E. Cyanogenesis, the production of hydrogen cyanide, by plants. In: KEELER, R. F.; VAN KAMPEN, K. R.; JAMES, L. F. **Effects of poisonous plants on livestock**. New York: Academic Press, 1978, p. 301-10.

CROWE, W. M.; PIKE, H. T. Congenital Arthrogryposis Associated with Ingestion of Tobacco Stalks by Pregnant Sows. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 162, n. 6, p. 453-455, 1973.

COCK, J. H. Cassava: A basic Energy source in the tropics. **Science**, v. 218, n. 4574, p. 755-762, 1982.

D'MELLO, G. D. Neuropathological and behavioural sequelae of acute cyanide toxicosis in animal species. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T. C. **Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides**. Bristol: Wright, 1987, p. 156-183.

DENCKER, L.; DANIELSSON, B. R. G. Transfer of drugs to the embryo and fetus after placentation. In: NAU, H.; SCOTT, W. J. (Ed.). **Pharmacokinetics in teratogenesis**, Florida: CRC Press. 1987. p. 56-67.

DIPIRO, J. T.; BLOUIN, R. A.; PRUEMER, J. M.; SPRUILL, W. J. **Concepts in clinical pharmacokinetics**. Bethesda: ASPHA, 1996, p. 200.

DOHERTY, A. P.; VERGIL. H. F.; SMITH, P. R. Congenital malformations induced by infusion of sodium cyanide in golden hamster. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 456-464; 1982.

DURDEVIC, N. P.; STANKOVIC, M.; ZARKOVIC, A. Relationship between corpus luteum and thyroid gland functions in sows. **Veterinarshi Glasnik**, Belgrade, v. 42, n. 11/12, p. 709 - 714, 1988.

EKPECHI, O. L.; DIMITRIADO, A.; FRASER, R. Goitrogenic activity of cassava: Staple Nigerian Food. **Nature**, v. 210, n. 5041, p. 1137-1138, 1996.

EKPECHI, O. L.; DIMITRIADO, A.; FRASER, R. Goitrogenic effect of cassava in broiler rabbit. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 62, n. 7, p. 670-676, 1992.

EL GAHAWABI, S. H.; ELSAHART, A. A.; AHME, S. H.; MALAS, K. K.; FARES, R. Chronic Cyanide Exposure: A Clinical Radioisotope and Laboratory Study. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 32, n. 3, p. 215-219, 1975.

FAMUYIWA, O. O. The effects of chronic cassava consumption; cyanide intoxication and protein malnutrition on glucose tolerance in growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 69, n. 1, p. 269-276, 1993.

FAO/IFAD. **The World Cassava Economy: Facts Trends and Outlook**, 2000. p. 1-46.

FINELLI, P. F. Changes in the basal ganglia following cyanide poisoning. **Journal of Computational Assistance and Tomography**, v. 5, n. 7, p. 755-756, 1981.

FREEMAN, A. G. Optic neuropathy and chronic cyanide intoxication: a review **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 81, n. 1, p. 103-106, 1988.

FREEMAN, A. G.; HEATON, J. M. The aetiology of retrobulbar neuritis in addisonian pernicious anaemia. **Lancet**, v. 1, n. 9, p. 908/911, 1961.

FRIEDERICH; J. A; BUTTERWORTH, J. F. IV. Sodium nitroprusside. Twenty years and counting. **Anesthesia e Analgesia**, v. 81, n. 1, p. 152-162, 1995.

GAMEIRO, A. H. **Mandioca**: de alimento básico à matéria prima industrial. CEPEA Centro de estudos avançados em economia aplicada-ESALQ/USP. Piracicaba, 28 de Janeiro de 2002 . Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br> Acesso em: 24 dez. de 2006

GOMES, G. G.; NACHIN, D.; NYVOLD, S. Roots, tubers plantais and bananas in animal Feeding. Animal production and Health paper, **FAO-FOOD and Agriculture Organization of United Nations Rome**, v. 95, p. 157-167, 1992.

GRAHAM, D. L.; LAMAN. D.; THEODORE, J.; ROBIN, E. D. Acute cyanide poisoning complicated by lactic acidosis and pulmonary edema. **Archives of Internal Medicine**, v. 137, n. 10, p. 1050-1055, 1995.

GRAPHPAD PRISM - **Graphpad softwer**. Verson 3. 00. San Diego, 1999.

Disponível em: <http://www.graphpad.com>. Acesso em: 23 mar. 2004.

GUTZWILLER, A. The effect of diet containing cyanogenic glycosides on the selenium status and the thyroid function of sheep. **Animal Production**, v. 57, n. 3, p. 415-419, 1993.

GUZMÁN, V.; OCHOA, R .; GIL, A. Intoxication cronica por acido cianhidrico en ratas y su interation con la proteiny el tioissulfato de sódio e la dieta. **Revista ICA**, v. 12, n. 3, p. 241-255,1977.

HANES, R. C.; MURAD, F. Tireóide e drogas antitiroidéias. GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas e terapêuticas**, Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAM, 1987, p. 911-925.

HASUIKE, Y.; NAKANISHI, T.; MORIGUCHI, R.; OTAKI, Y.; NANAMI, M.; HAMA, Y.; NAKA, M.; MIYAGAWA, K.; IZUMI, M.; TAKAMITSU, Y. Accumulation of cyanide and thiocyanate in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplation**, v. 19, n. 6, p. 1474-1479, 2004.

HEATON, J. M.; McCORMICK, A. J. A.; FREEMAN, G. Tobacco anblyopia: a clinical manifestation of vitamin B12 deficiency. **Lancet**, v. 2, n. 2, p. 286-90,1958.

HENRY, G.; CORREA, C. Economics of cassava product use in animal feeding. In: MACHIN, D.; NYVOLD, S. Root, tuber, plantains and bananas in animal feeding.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome - FAO. v. 95, p. 196-183, 1992.

HIRANO, A.; LEVINE, S.; ZIMMERMAN, N. Experimental cyanide encephalopathy: Electron Microscopic Observations of Early Lesions in White Matter, **Journal of Neuropathology and Experimental neurology**, v. 26, n. 2, p. 200-213, 1967.

HOENE, F. C. **Agricultura no Brasil no século XVI.** São Paulo: Nacional, 1937 p. 410.

HOLZBECHER, M. ; ELLENBERGER, H.A. An Evaluation and Modificatin of a Microdiffusion Method for the Emergency Determination of Blood Cyanide, **Journal of Analytical Toxicology**, v. 9, n. 6, p. 251-253, 1985.

IBEBUNJO, C.; KAMALU, B. P.; IHEMELANDU, E. C. Comparison of effects of cassava (*Manihot esculent Crantz*), organic cyanide and inorganic cyanide on muscle and bone development in Nigerian breed of dog. **British Journal of Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 483-491, 1992.

INABA, T.; NAKAZIMA, Y.; MATSUI, N.; IMORI. Early pregnancy diagnosis in sows by ultrasonic linear eletronic scanner. **Theriogenology**, v. 20, n. 1, p. 97-101, 1983.

IMANARI, T.; TANABE, S.; TOIDA, T. Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate by high performace liquid chromatography. **Chemistry and Pharmacology Bulletin**, v. 30, n. 10, p. 3800-3802, 1982.

ISOM, G. E.; BOROWITZ, J. L. Modification of cyanide toxicodynamics: mechanistic based antidote development. **Toxicology Letters**, v. 82-83, n.1, p. 795-799, 1995.

ITO, S.; ALCORN, J. Xenobiotics transporter expression and function in the human mammary gland. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 5, p. 653-665, 2003.

JACKSON, G. H. Pregnancy diagnosis in the sow using real time ultrasonic scanning. **Veterinary record**, v. 119, n. 1, p. 90-91, 1986.

JAMES, L. F.; PANTER, K. E.; STEGELMEIER, B. L.; MOLYNEUX, R. J. Effect of natural toxins on reproduction. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n. 3, p. 587-603, 1994.

JOHNSON, J. D.; MEISENHEIMER, T. L.; ISOM, G. E. Cyanide-Induced Neurotoxicology: Role of neuronal Calcium. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 464-469, 1986.

JONES, D. A. Why are so many foods cyanogenic. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 155-162, 1998.

KAGE, S.; NAGATA, T.; KUDO, K. Determination of cyanide and thiocyanate in blood by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B. Biomedical Applications**, v. 675, n. 1, p. 27-32, 1996.

KAMALU, B. P. The Adverse effects of long-term cassava (*Manihot esculenta Crants*) consumption. **International journal of food Sciences and Nutrition**, v. 46, n. 1, p. 65-93, 1995.

KAMALU, B. P.; AGHRANYA, J. C. The effect of a nutritionally balanced cassava (*Manihot esculenta Crants*) diet on endocrine function using dog as model. 2- thyroid. **British Journal of Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 373-379, 1991.

KANEKO, J. J. New concepts of test selection and utilization in veterinary clinical biochemistry. In: BLACKMORE, D. J. (Ed.). **Animal clinical biochemistry - the future**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 105-112.

KANEKO, J. J. Thyroid funcyion. In: KANEKO, J. J. (Ed.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4. ed. Academic Press, San Diego, 1997, p. 491-512. .

KANTHASAMY, A. G.; ARDELT, B.; MALAVE, A.; MILLS, E. M.; POWLEY, T. L.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. Reactive oxygen species generated by cyanide Toxicity in rat phelchromonocytoma cells. **Toxicology Letters**, v. 93, n. 1, p. 47-54, 1997.

KHERA, K. S. Maternal Toxicity- a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, v. 29, n. 1, p. 114-118, 1984.

KING, G. J.; MACPHERSON, J. W. A comparison of two methods for boar sêmen collection. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 36, n. 4, p. 563-565, 1973.

KOESTNER, A.; JONES, T.C. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Veterinary Patology . 6 Ed, Lippincott Wiliaws &Wilkins, A wolters Kluwer Company, Philadelphia, p.1392, 1996.

KRAECHENBUHL, J. P.;NEUTRA, M. R. Molecular and cellular bases of immune protection of mucosal surfaces. **Physiological Reviews**, v. 72, p. 855-879, 1992.

LAUWERYS, R. R. Occupational toxicology. In: Cassarret e Doull`s **Toxicology the basic science of poisons**, 5. ed. New York: In: MacGraw Hill, p. 1004, 1996.

LIANGCHENG, DU; MPOKO, B.; BIRGER, L. M.; BARABARA, A. H. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in roots of cassava. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 323-326, 1995.

MA, J.; PRISTOS, C. A. Tissue-specific bioenergetic effects and increased enzymatic actives following acute sublethal peroral exposure to cyanide in mallard duck. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 297-302, 1997.

MAINIER, J. R.; in: **CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO**, 2000, Niteroi: Universidade Federal fluminense – Centro Tecnológico – Escola de Engenharia – LATEC, 2002, p.2.

MAKENE, W. J.; WILSON, J. Biochemical studies in Tanzanians patients with ataxic tropical neuropathy. **Journal of Neurologic Neurossing Psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 31-33, 1972.

MANDSFELDT, T.; BIERNATH, H. Determination on total cyanide in soils by micro-distillation. **Anaytica Chimica Acta**, v. 406, n. 2, p. 283-288, 2000.

MANER, J. H.; GOMEZ, G. Influence of cassava diets on placental thiocyanate transfer, tissue rhodanase activity and performance of rats during gestation. **Journal Science Food Agriculture**, v. 28, n 7, p. 750-756, 1977.

MANZANO, H. **Avaliação da toxicidade do cianeto em suínos durante a fase de crescimento à terminação**: aspectos bioquímicos e anátomo patológicos. 2001. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MANZANO, H.; MARUO, V. M; GÓRNIK, S. L. Avaliação ultrassonográfica da gestação de suínos tratados com cianeto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n.1, p. 39, 2004.

MARIATH, M. M. R.; MARIATH, J. G. R.; BORA, P. S. Avaliação biológica da toxidez de uma espécie de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), após secagem. **Arquivos de Biologia y Tecnologia**, v. 31, n. 3, p. 4461-4468, 1988.

MATHANGI, D. C; NAMASIVAYAM, A. Effect of chronic cyanide intoxication on memory in albino rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 38, n. 1, p. 51-55, 2000.

MCKENZIE, R. A.; MCMICKING, L. I. Ataxia and urinary incontinence in cattle grazing sorghum. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, n. 10, p. 496-497, 1977.

McMILLAN, D. E.; GEEVARGHESE, P. J. Dietary cyanide and tropical malnutrition diabetes. **Diabetes Care**, v. 2, n. 2, p. 202-208, 1979.

MEDINSKY, M. A.; VALENTINE, J. L. Toxicokinetics. In KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Cassarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons**. 6 ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 225-237.

MILLER, K. W.; ANDERSON, J. L.; STOEWSAND, G. S. Amygdalin metabolism and effect on reproduction of rats fed apricot kernels. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 7, n. 4, p. 457-456, 1981.

MONEKOSSO, G. L.; WILSON, J. Plasma Thiocyanate and vitamin B12 in Nigerian patients with degenerative neurological disease. **Lancet I**, v. 5, n. 10, p. 1062-1604, 1966.

MONEKOSSO, G. L.; ANNAN, W. G. T. Clinical epidemiological observations on ataxic syndrome in Western Nigeria. **Tropical Geografic Medicine**, v. 4, n. 3, p. 316, 1964.

MONTGOMERY, R. D. Cyanogens. In: IRVINE, E.; LIENER, I.E. **Toxic Constituents of Plant Foodstuffs**, 2. ed. Academics Press, NY , 1980, p. 143-157.

NAU, H. Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 70, n. 1, p. 113-129, 1986.

NIEUWENHUIZEN, A.G.; SCUILING, G.A.; MOES, H.; KOITER, T.R. Role of increased insulin demand in the adaptation of the endocrine pancreas to pregnancy.

Acta Physiologica Scandinavica, v.159, n.1.; p.303-312, 1997.

OECD- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for testing of chemical. **OECD**, n.415, p.1-7, 1996.

OKE, O. L. The use of cassava as pig feed. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v. 54, n. 7, p. 301-14, 1984.

OKE, O. L. Toxicity of cyanogenic glycosides. **Food Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 97-109, 1980.

OKOLIE, N. P.; OSAGE, A. U. Differential Effects of Chronic Cyanide Intoxication on Heart, Lung and Pancreatic Tissues; **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 5, p. 543-548, 2000.

OKOLIE, N. P.; OSAGE, A. U.; Liver and Kidney Lesions and Associated Enzyme changes induced in rabbits by chronic cyanide exposure; **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 745-750, 1999.

ONG, H. K. Cyanogenic and goitrogenic factors in pig nutrition. **Pig News and Information**, v. 10, n. 1, p. 19-23, 1989.

ONWUKA, C. F. I. Hydrogenic acid contents of tropical browse and their influence on performance goats. **Food Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 5-10, 1992.

OSUNTOKUM, B. O. Cassava diet, chronic cyanide intoxication and neuropathy in the Nigerian Africans. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 36, n. 1, p. 141-173, 1981.

OSUNTOKUM, B. O. Chronic cyanide intoxication of dietary origin and A Degenerative Neuropathy in Nigerian. **Acta Horticulturae**, v, 38, n. 375, p. 311-321, 1994.

OSUNTOKUM, B. O.; MONEKOSSO, G. L.; WILSON, J. Relationship of a degenerative tropical neuropathy to diet report of a field survey. **British Medical Journal**, v. 50, n. 5643, p. 547-50, 1969.

OSWEILER, G. D.; CARSON, T. L.; BUCK, W. B.; VAN GELDEER; G. A. Cyanide. and cyanogenic plants. In:_____. **Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology**. 3. ed. Dudenque: Kendall/Hunt, 1985, p. 455-459.

PANIGRAHI, S.; RICHARD, J.; O'BRIEN, G. M.; GAY, C. Effects of different rates of drying cassava root on its toxicity to broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 33, n. 5, p. 1025-1042, 1992.

PANTER, K.E.; BUNCH, T.D.; KEELER, R.F. Maternal and fetal toxicity of poison hemlock (*Conium maculatum*) in sheep. **American Journal Veterinary Research**, v.49, n.1, 1988.

PENTEADO, M. D. V. C. P.; FLORES, C. I. O. Folhas da mandioca como fonte de nutrientes: In: Cereda. M. P. (Coord.) Agricultura: **Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. v. 4, cap. 3, p. 49-67.

PANTER, K. E.; STEGELMEIER, B. L. Reproduction toxicoses of food animals. **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 16, n. 3, p. 531-544, 2000.

PERDOMO, C. C. Conforto Ambiental e produtividade de suínos. In: OLIVEIRA, C. C. **Instalações e manejos para suinocultura**, São paulo, SP. Icone Editora, 1997, p. 49-59.

PETTIGREW, A. R.; FELL, G. S. Simplified colorimetric determination of thiocyanate in biological fluids and its application to investigation of the toxic amblyopias. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 996-1000, 1972.

POND, W. G.; MANER, J. H.; In: _____. **Animal Science Texbook Series** – Swine Production and Nutrition, Connecticut, AVI Publishing Company, INC Wesport, 1984, p. 89.

POTTER, J.; SMITH, R. L.; API, A. M. Urinary thiocyanate levels as a biomarker for the generation of inorganic cyanide from benzyl cyanide in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 141-146, 2001.

POULTON, J. E. Cyanogenic compounds in plants and their toxic effects. In: KEELER, R. F.; TU A. T. (Ed.). **Handbooks of natural toxins**. New York: Marcel Deker, v. 1, 1983, p. 117-157.

PUTMAN, M. R. Toxicology problems in food animals affecting reproduction. **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 5, n. 3, p. 325, 1989.

PRAWAT, H.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; PRAWAT, U.; TUNTIWACHWUT - TIKUL, P.; TOOPTAKONG, U.; TAYLOR, W. C.; PAKAWATCHAI, C.; SKELTON, B. W.; WHITE, A. H. Cyanogenic na non-cyanogenic glycosides from Manihot Esculenta. **Phytochemistry**. v. 40, n. 4, p. 1167-1173, 1995.

RATNAKUMAR, J. N.; RAJAN, A. Goitrogenic effect of cassava in broiler rabbits. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 62, n. 1. , p. 670-676, 1992.

RICKERT, W. S.; ROBINSON, J. C.; YONG, J. C. Estimating the hazards of "less hazardous" cigarettes. I: Tar, nicotine, carbon monoxide, acrolin, hydrogen cyanide, and total aldehyde deliveries of Canadian cigarettes. **Journal Toxicology Environmental Health**, v. 6, n. 1, p. 351-365, 1980.

ROBINSON, J. P. The problem of chemical and biological warfare. In: ROBSON, J. P., ed. **The Rise of CB Weapons: A study of the Historical, Technical, Military, Legal and Political Aspects of CBW, and Possible Disarmament Measures**, New York, NY: Humanities Press, 1971, p. 155-156.

RODEL, M. G. W. Effects of different grasses on the incidence of neonatal goitre and skeletal deformities in autumn born lambs. **Rhodesia Agricultura Journal**, v. 69, n. 1, p. 59-60, 1972.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, J. Developmental toxicology. In: CURTIS, D.K.(Ed). **Cassarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. New York: McGraw-Hill, Inc: 2001, p. 301-331..

ROMÁN, C. G. Na Epidemic in cuba of optic neuropathy, sensorineural deafness peripheral sensory neuropathy and dorsolateral myeloneuropathy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 11-28, 1994.

ROSLING, H. Measuring effects in humans of dietary cyanide exposure from cassava. **Acta Horticulture**, v. 375; n. 1, p. 271-283, 1994.

SAAD, A. D.; CAMARGO, V. A. Intoxicação cianídrica em animais domésticos. **O Biológico**, v. 33, n. 10, p. 55-68, 1967.

SALGADO, P. E. T.; LARINI, L. Gases tóxicos. In: LARINI, L. Toxicologia. 2. ed. São Paulo: Malone, 1993, p. 55-68.

SALKOWSKI, A. A.; PENNEY, D. G. Cyanide poisoning in animals and humans. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 455-466, 1994.

SANTORO, K. R.; BARBOSA, S. B. P.; HOLANDA, M. C. R. Modelos para predição da natimortalidade em suínos, **Revista Brasileira de Zootecni**, v. 32, n. 5, p. 1131-1140, 2003.

SAUNDERS, J.; CONN, E. E. Subcellular localization of the cyanogenic glucoside of Sorghum by autoradiografy. **Plant Physiology**. v. 59, n. 3, p. 647-652, 1977.

SAUNDERS, L. Z.; SHONE, D. K.; PHILIP, J. R.; BIRKHEAD, H. A. The effects of menthyl-5(6)-butyl-2-benzimidazole carbamate (parbendazole) on reproduction in sheep and other animals. I. Malformations in newborn lambs. **Cornell Veterinary**, v. 64, 1974, p. 7-40, supplemet 4.

SCHARDEIN, J. L.; SCHWETZ, B. A.; KENEL, M. F. Species sensitivities and prediction of teratogenic potential, **Enviromental Healyh Perspectives**, v. 61, n. 1, p. 55-67, 1985.

SHARMA, R. P.; WILLHITE, C. C.; WU, T. M.; SALUNKHE, K. D. Teratogenic Potential of Blighted Potato Concentrate in Rabbits, Hamsters, and Miniature Swine. **Teratology**, v. 18, n. 1, p. 55-62, 1978.

SHUMAHHER-HENRIQUE, B. **Efeitos tóxicos da ipomoea carnea em caprinos**. II- Estudos de teratogenicidade. 2005. 392 f. Dissertação (Doutor em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SEIGLER, D. S. Isolation and Characterization of Naturally occurring Cyanogenic compounds. **Phytochemistry**, v. 14, n. 9, p. 9-29, 1975.

SEIGLER, D. S. In: ROSENTHAL, G. A. , BERENBAUM, M. R (Ed). Their interactions with Secondary Plant Metabolites, **Herbivores**, Academic Press, San Diego, 1991. p 285

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. **Applied biopharmaceuticals and pharmacokinetics**; 3. ed., New York: Prentice-Hall, 1993; p. 768.

SHULZ, V. Clinical pharmacokinetics of nitroprusside, cyanide, thiosulphate and thiocyanate. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 9. , n. 3, p. 239-251, 1984.

SHUZ, V.; BONN, R.; KINDLER, J. Kinetics of elimination of thiocyanate in 7 health subjects and 8 subjects with renal failure. **Klinsche Wochenschrift**, v. 57, n. 1, p. 243-247, 1979.

SINGH, J. D. The teratogenics effects of dietary cassava on pregnancT albino rat: a preliminaray report. **Teratology**, v. 3, n. 3, p. 289-291, 1981

SIQUEIRA, M. E. P. B.; BARROS,J. M.; OLIVEIRA, A. A. Valores de referência de tiocianato plasmático e urinário. **Revista de Farmácia e Bioquímica da USP**, v. 32, n. 1, p. 21-27, 1996.

SMITH, D. A.; CLARK, B. Pharmacokinetics and toxicology testing basic principles and piffas. In: NAU, H.; SCOTT, W. J. (Ed.). **Pharmacocnetics in teratogenesis**. Flórida: CRD Press, 1987, p. 108-121.

SMITHELLS, R. W. The challenges of teratology. **TeRatology**, v. 22, n. 1, p. 7785, 1980.

SNEDCOR, G. W. **Statistical methods**, 4. ed. Ames, College Press, 1946, 324 p.

SOLBERG, Y.; ROSNER, M.; BELKIN, M. The Association between cigarette smoking and Ocular Diseases. **Survey of Ophtalmology**, v. 42, n. 6, p. 353-547, 1998.

SOLDÁN, P.; BOUCEK, J.; KOKES, J. Baia mare accident- brief ecotoxicological reposrt of Czech experts. **Ecotoxicologycal and environmental safety**, v. 49, n. 3, p. 255-261, 2001.

SOTO-BLANCO, B. **Avaliação da toxicidade do cianeto, em caprinos, durante a fase de crescimento**: alterações bioquímicas, clínicas e patológicas. 1999. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SOTO-BLANCO, B. **Toxicidade sub aguda, prolongada, pré-natal e pós natal do cianeto, em caprinos**. 2003. 168 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SOTO-BLANCO, B.; GÓRNIAK, S. L. Prenatal toxicity of cyanide in goats - a model for teratological studies in ruminants – **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1012-26, 2004.

SOTO-BLANCO, B.; GÓRNIAK, S. L.; KIMURA, E. T. Physiopatological effects of chronic cyanide administration to growing goats – a model for cyanogenic plants ingestion. **Veterinary Research Communications**, v. 25, n. 5, p. 379-389, 2001.

SOUSA, A. B. **Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianato no período perinatal**. Estudo em Ratos. 2004. 224 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SOUSA, A. B.; MANZANO, H.; SOTO-BLANCO, B.; GÓRNIAK, S. L. Toxicocinetics of cyanide in rats, pigs and goats after oral dosing with potassium cyanide. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 6, p. 330-334, 2003.

SOUSA, A. B. **Avaliação da exposição prolongada ao cianeto em ratos**. 2000. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SETO, Y.; KATAOKA, M.; TSUGE, K. Cyanide and Thiocyanate Levels in blood and Saliva of Health Adult Volunteers. **Journal of Health Science**, v. 46, n. 5, p. 343-350, 2000.

SPENCER, P. S. Food toxins, ampa receptors, and motor neuron diseases. **Drug Metabolism Reviews**, v. 31, n. 3, p. 561-587, 1999.

SPIEGEL, M. R. **Statisties**. New York: Schaum Publ, 1972, p. 41

SPIEGEL, M. R. **Estatística**, 2. ed, São Paulo: McGraw-Hill, 1985, p. 233-248.

SPITZWEG, C.; JOBA, W.; SCHRIEVER, K.; GOELLNER, J. R.; MORRIS, J. C.; HEUFELDER, A. E. Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in Human Exocrine Glands. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 11, p. 4178-4184, 1998.

STEVENS, M. R.; GALLO, M. Pratical considerations in conduct chronic toxicity studies. In: HAYES, A. W. (Ed.) **Principles and methods of Toxicology**. New York: Raven Press, 1989, p. 237-250.

SUCHARD, J. R.; WALLACE, K. L.; GERKIN R. D. Acute cyanide caused by apricot kernel ingestion. **Annals of emergency medicine**, v. 323, n. 6, p. 742-744, 1998.

SWINDLE, M. M , in:_____. **Basic surgical exercises using swine**. New Work: Green Wood Press, 1983. p. 237.

SWINDDDLE, M. M.; MOODY, D. C.; PHILIPS L. D. **Swine as models in biomedical research**. Ames, Iowa: low a State University Press; 1992, p. 312.

SYKES, A. H. Early studies on the toxicology of cyanide. In: VENNESLAND, B.; KNOWLES, C. J.; CONN, E. E.; WESTLEY, J.; WISSING, F. B. H. (Ed). **Cyanide in biology**. London: Academic Press, 1981. p. 1-9.

TEWE, O. O. Detoxification of cassava products and effects of residual toxins on consuming animals. **FAO-Animal production and health paper**, v. 95, n. 8, p. 81-98, 1992.

TEWE, O. O.; AFOLABI, A. O.; GRISSON, F.; LITTLETON, G. K.; OKE, O. L. Effect of varying dietary cyanide levels on serum thyroxin and protein metabolites in pigs. **Nutrition Reports International**, v. 30, n 05, p. 1249-1253, 1984.

TEWE, O. O.; MANER, J. H.; GOMEZ, G. Influence of cassava diets on placental thiocyanate transfer, tissue rhodanase activity and performance of rats during gestation. **Journal Science Food. Agriculture**, v. 28, n. 8, p. 750-756, 1977.

THORNE, P. S. Occupational toxicology. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Cassarett and Doull's toxicology: the basis science of poisons**. 6 ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 1123-1140.

TOIDA, T.; TOGAWA, T.; TANABE, S.; INAMARI, T. Determination of cyanide and thiocyanate in blood plasma and red cells by high performace liquid chromatography with fluerimetric detection. **Journal of Chromatography**, v. 308, n. 8, p. 133-141, 1984.

TOMINAGA, Y. M.; MIDIO, F. Determination of thiocyanate in urina by ion-exchange chromatography and spectrophotometry. **Revista Farmácia e Bioquímica Universidade de São Paulo**, v. 26, n. 1, p. 73-74, 1990.

TOMINAGA, Y. M.; MIDIO, F. Modified method of determination thiocyanate in urine by ion exchange chromatography and spectrophotometry. **Revista Farmácia e Bioquímica Universidade de São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 100-1005, 1991.

TUMBLESON, M. E. **Swine in biomedical research**. New York: Plenum Press, v. 1-3, 1986, p. 1988.

TYLLESKÄR, T.; BANE, M.; BIKANGI, N.; NAHIMANA, G.; PRESSON, L. A.; ROSLING, H. Dietary determinants of a non-progressive spastic paraparesis (KONZO): a cases-recent study in a high incidence area of Zaire, **International Journal of Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 949-956, 1995.

UITTI, R. J.; RAJPUT, A. H.; ASHENHURST, E. M.; ROZDILSKY, B. Cyanide induced parkinsonism: a clinicopathologic report. **Neurology**, v. 35 n. 5, p. 921-925, 1985.

USEPA-UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - Office of Drinking water Health Advisors. **Reviews of environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, p. 53-64, 1989.

USEPA-UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Risk assessment forum. Guidelines for developmental toxicity risk assessment. **Federal Register**, v.56, n.234, p. 63798-63826, 1991.

VENESLAND, B. CASTRIC, P. A.; CONN, E. E.; SOLOMONSON, L. P.; VOLINI, M.; WESTLEY, J. Cyanide Metabolism. Federation Proceedings, v. 41, n. 10, p. 2639-2648, 1982.

VIANA, C. H. C.; GAMA, R. D.; VIANNA, W. L.; ALVARENGA, M. V. F.; BAMABE, R. C. **Evaluation of Ultrasonography on early gestation diagnosis in sows.** Disponível em: www.esoate-piemedical.com-aplicattion/articles/tringacabral.pdh, acesso em 02 jan. 2006.

VOLGEL, S. N.; SULTAIN, T. R.; TEN EYCK, R.P. Cyanide poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 367-383, 1981.

VRIES, J. Toxicokinetics – quantitative aspects. In: NIESSINK, R. J. M.; VRIES, J.; HOLLINGER, M. A. (Ed). **Toxicology principles and applications**. New York: CRC Press, 1996, p. 137-183.

WATTS, J. Japanese fear over festival cyanide poisoning. **The Lancet**. v. 352, n. 9125, p. 379, 1998.

WAY, J. L. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**; v. 24, n. 2, p. 451-481, 1984.

WEBSTER, W. S. Teratogen update: congenital rubella. **Teratology**, v. 58, n. 1, p. 13-23, 1998.

WESTLEY, J.; ALDER, H.; WESTLEY, J.; NISHIDA, C. The sulfur-transferases. **Fundamental applied toxicology**, v. 3, n. 3, p. 377-382, 1983.

WEDIG, J. H.; KENNEDY, Jr. G.L.; JENKINS, D.H.; KENPLINGER, M.L. Teratologic evaluation of the magnesium sulfate adduct of [2,2'-dithio-bis-(pyridine-1-oxide)] in swine and rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 561-570, 1977.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hidrogen Cyanide and Cyanides**. Disponível em: whglibdoc.who.int/publications/2004/9241530618.pdf. Acesso em: 24 Dez., 2004.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Principles for testing of drugs for teratogenicity**. Geneve, 1967 364p. (Technical Report Series).

WHITE, P. Diabetes mellitus in pregnancy. **Clinical Perinatology**, v.1, n.1, p.331-347, 1974.

WILSON, J. C. Methods of administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: WILSON, J. G.; WARKANY, J. (Ed.) **Teratology: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1965, p. 262-327.

YAMAMOTO, H. A.; TANG, H. W. Effects of 2- amino -7 phosphonoheptanoic acid, melation or NG-nitro-L-arginine on cyanide or *N*-methyl-D- aspartate- induced neurotoxicology in rat cortical cell. **Toxicology Letters**, v. 94, n. 1. p. 13-18, 1998

YUAN, J. H. Modeling blood/plasma concentrations in dosed feed and dosed drinking water toxicology studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 119, n. 2, p. 131-141, 1992.

YUAN, J. H.; GOEHL, T. J.; ABDO, K.; CLARK, J.; ESPINOSA, O.; BUGGE, C. Effects of gavage versus dosed feed administration on the toxikocnetics of benzyl acetate in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33; n. 2; p. 151-158, 1995.

YUEN, T. G.; RUSSEL, P. S. Hiperplasia of type 2 pneumotcytes and nitrogen dioxide (10ppm) exposure, **Archives of environmental Health**, v. 22, n. 1, p. 178-188, 1971.

ZOMBORSZKY- KOVÁCS, M.; VETÉSI, F.; KOVÁCS, F.; BATA. A.;TÓH, A.; TORNYOS, G. Preliminary Communication: Examination of the Harmful Effect to Fetuses of Fumonisin B1, in Pregnant Sows. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 20, n. 1, p. 293-299, 2000.