ALTAMIR BENEDITO DE SOUSA

**Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e
do tiocianato no período perinatal. Estudo
em ratos**

São Paulo
2004

ALTAMIR BENEDITO DE SOUSA

**Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianato no
período perinatal. Estudo em ratos**

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 Górnaiak

São Paulo
2004

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.1365
FMVZ

Sousa, Altamir Benedito de

Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianato no período perinatal. Estudo em ratos / Altamir Benedito de Sousa. - São Paulo : A. B. Sousa, 2004.
224 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2004.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak.

1. Intoxicação. 2. Ratos. 3. Leite. 4. Toxicologia reprodutiva. 5. Sangue. 6. Líquido amniótico. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da exposição prolongada ao cianeto em ratos. Estudos de teratogenicidade", Protocolo nº 21/2001, sob a responsabilidade da Profª Drª Silvana Lima Górnaiak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 30/01/2002.

(We certify that the Research "Evaluation of the prolonged exposition of cyanide in rats. Teratogenicity studies" protocol number 21/2001, under the responsibility of Profª Drª Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 01/30/2002 meeting.)

São Paulo, 30 de janeiro de 2002

Profª Drª Júlia Maria Mátia
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: SOUSA, Altamir Benedito de

Título: Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianato no período perinatal.
Estudo em ratos

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: ____/____/2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Assinatura _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Assinatura _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Assinatura _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Assinatura _____

Instituição _____

Julgamento _____

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Esta contribuição a ciência só pode ser concretizada devido
ao grande estímulo, apoio e confiança que recebi de minha
orientadora e amiga, Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade oferecida.

Aos funcionários do CEPTOX, em especial a Leonila Estér Raspantini pelo grande auxílio na realização dos experimentos.

Ao prof. Dr. Gerson Gonçalves da Silva, pelo grande auxílio na revisão gramatical deste trabalho.

Ao prof. Dr. Paulo César Maiorka, pelo auxílio na análise histopatológica dos órgãos estudados.

Aos técnicos do laboratório pelo apoio técnico prestado: Magali, Ricardo e Priscila.

Às secretárias da pós-graduação; Sandra, Cláudia, Deise e a secretária de pós-graduação do VPT, Sílvia.

Aos funcionários do biotério pela colaboração com a manutenção dos animais.

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Florio pelo auxílio na estatística.

À Dr.a Cristina Massoco pelo auxílio na metodologia (ELISA).

Ao Dr. Ricardo Lazarini pelo auxílio na confecção do aparato para a retirada das amostras de leite de ratas.

À pós-graduanda Domênica Palomaris, pelo grande auxílio na revisão desta tese.

Às bibliotecárias Maria Alice Rebello, Roseli Barboza Campos Mariani e Lucimar da Silva Prado (HU/USP).

Às bibliotecárias Pedra Margarete de S. Guidil Pires e Rosa Maria F. Zani (FMVZ/USP).

Aos colegas da pós-graduação que de algum modo contribuíram com este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa.

DEDICO

À minha sobrinha Celeste pelos momentos de felicidade proporcionados com o seu nascimento, e, agora, com seu crescimento.

À memória de minha mãe, Celeste, e meu pai, José, que apesar de não terem tido oportunidade de estudar, sempre estimularam seus filhos nesta tarefa prazerosa.

Aos meus familiares: minha irmã, Flávia, meu cunhado Carlos e ao meu irmão Sidnei, que me apoiaram em momentos difíceis.

À Dra Leila Peron e à Dra Viviane pela atenção e carinho durante todos estes anos.

Aos meus amigos farmacêuticos: Carlos, Cris, Eleni, Eliane, Emília, Fátima, Gustavo, Misae, Mônica, Patrícia, profa. Sílvia, Sandra e Tina.

Aos meus irmãos cientistas: Benito, Breno, Domênica, Helena, Isis e Marcos.

Aos animais de laboratório que utilizei em meus experimentos; espero que suas vidas tenham valido para o bem da humanidade.

Às mães que cederam seu precioso leite materno para a realização de outro estudo, paralelo a esta tese.

À minha "irmã" de convivência, Domênica.

À Deus e à ciência, sem os quais eu não estaria aqui.

**The aim of toxicology studies is
not to make the world a safer
place for rats!**

Paul Barrow

RESUMO

SOUSA, A. B. Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianato no período perinatal. Estudo em ratos. [Evaluation of toxic effects of cyanide and thiocyanate during perinatal period. Study in rats]. 2004. 224 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O objetivo do presente estudo foi o de determinar os efeitos da exposição prolongada ao KCN e ao KSCN em ratos, no período perinatal. Inicialmente, realizou-se o estudo toxicocinético do tiocianato em ratas, em três estados fisiológicos diferentes: fase estrogênica, gestacional e de lactação. Para tal, estes animais receberam, por via oral, na água de bebida ou gavagem, a dose única de 3 mg/kg de KCN. Os resultados obtidos mostraram aumento significativo nos níveis séricos, lácteos e no líquido amniótico, de tiocianato, após a administração do KCN. A partir destes dados, foram calculados os parâmetros toxicocinéticos. Na segunda etapa, foram utilizadas ratas, as quais foram divididas em 3 grupos controles e 18 experimentais, que receberam as diferentes doses de KCN (1; 3 e 30 mg/kg) ou KSCN (0,8; 2,4 e 24 mg/kg), na água de bebida, do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 20º dia da gestação ou no 22º dia pós-parto; e do 1º ao 19º dia da lactação, e submetidas à eutanásia no 19º dia deste período. Ao final de cada experimento, os animais foram submetidos à eutanásia, no período apropriado, bem como os fetos e filhotes, coletando-se soro para análise dos níveis de tiocianato, glicose, colesterol, uréia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, bem como foram retirados fragmentos do sistema nervoso central, do rim, do pâncreas, da tireóide, do fígado, do pulmão e do baço para estudo histopatológico. Ainda, realizou-se a dosagem de tiocianato no líquido amniótico e no leite, bem como a análise óssea e visceral dos fetos. Dos parâmetros bioquímicos analisados, em relação às mães, verificou-se que os níveis séricos de tiocianato estiveram aumentados, significativamente, em diversos grupos experimentais, no entanto, poucas foram as alterações nas enzimas e outras substâncias avaliadas. O estudo histológico revelou, tanto naquelas gestantes quanto nas lactantes, nefrose, hemorragia e hemossiderose renal; congestão, neuronofagia e gliose no SNC; congestão, vacuolização e proliferação dos ductos biliares e aumento no número de vacúolos de reabsorção no colóide dos folículos tireoidianos, de forma dose-dependente, nos diferentes grupos experimentais. Ratas gestantes, submetidas à eutanásia no 20º dia da gestação apresentaram, ainda, depleção de células das ilhotas de Langerhans. Em relação aos filhotes, tanto aqueles provenientes de fêmeas tratadas durante a gestação quanto da lactação, verificou-se que, embora a avaliação bioquímica tenha revelado alteração apenas no tiocianato sérico de filhotes de mães provenientes dos grupos experimentais, o estudo histológico, nestas proles, mostrou várias lesões, a saber: congestão, neuronofagia e gliose no SNC, congestão renal e hepática, vacuolização e proliferação dos ductos biliares. Por outro lado, não foram detectadas alterações na *performance* reprodutiva bem como na análise visceral e óssea dos fetos. Portanto, pode-se sugerir que o cianeto e/ou seu metabólito promovam efeito tóxico diretamente sobre o feto, no entanto estas alterações são passíveis de detecção apenas na fase pós-natal. Além disto, verificou-se, que o cianeto e/ou o tiocianato são carregados para o leite, podendo comprometer, também, a saúde do neonato.

Palavras-chave: Intoxicação. Ratos. Leite. Toxicologia reprodutiva. Sangue. Líquido amniótico.

ABSTRACT

SOUSA, A. B. Evaluation of toxic effects of cyanide and thiocyanate during perinatal period. Study in rats. [Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianato no período perinatal. Estudo em ratos]. 2004. 224 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The aim of the present study was to determinate the toxic effects of long-term exposure to KCN and KSCN in rats, during perinatal period. Initially, it was achieved the toxicokinetics study of the thiocyanate in female rats, in three different physiological states: estrogenic, gestation and lactation. These animals received, *per os*, in the drinking water or by gavage, the unique dose of 3.0 mg KCN/kg. The results showed significantly increased in the thiocyanate levels in the serum, milk and amniotic fluid, after the administration of the KCN. The toxicokinetics parameters were calculated based on these data. In a second part, female rats were distributed in 18 experimental and 3 control groups. The experimental groups were dosed with 1, 3 and 30 mg KCN/kg or 0.8; 2.4 and 24 mg KSCN/kg, daily, in the drinking water, from days 6 to 20 of gestation and euthanized on day 20 of gestation or on day 22 postpartum; or received from days 1 to 19 of lactation and euthanized on day 19 of lactation. At the end of each experiment, the animals were euthanized, in the appropriated period, as well as the fetuses and pups. The serum samples were obtained in order to determine the thiocyanate, glucose, cholesterol, urea, creatinine, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase levels as well as samples of the following organs for the histopathological study: central nervous system, kidney, pancreas, thyroid, liver, lung and spleen. Yet, the levels of thiocyanate were evaluated in the amniotic fluid and milk, from the mothers, as well as the skeletal and visceral analysis of the fetuses. From the biochemical parameters, in relation to the dams, it was verified that the thiocyanate levels were significantly increased, in several experimental groups; otherwise, too few alterations were observed in the enzymes and others substances analyzed. The histopathological study revealed, in the pregnant and lactating rats, nephrosis, hemorrhage and hemosiderosis in the kidneys; congestion, neuronophagia and gliosis in the CNS; vacuolization and proliferation of the biliar ducts in the liver and increase in the number of reabsorption vacuoles in follicular colloid, in a dose-dependent manner, in some experimental groups. At the pregnant rats that were euthanized on day 20 of gestation, it was verified depletion of cells from the islets of Langerhans. In relation to the pups, from mothers exposed during the gestation and lactation, it was verified alteration in the thiocyanate levels from experimental groups and the histopathological study revealed: congestion, neuronophagia and gliosis in the CNS, renal and hepatic congestion, vacuolization and proliferation of biliar ducts. On the other hand, it was verified no alterations in the reproductive performance nor skeletal and visceral analysis of the fetuses. Thus, it was suggested that the cyanide and/or its metabolite promoted toxic effect straight to the fetuses; however, these alterations are susceptible of detection only at postnatal phase. Furthermore, the cyanide and/or thiocyanate are transferred to the breast milk of rats and can also compromise the health of the offspring.

Key words: Intoxication. Rats. Milk. Reproductive toxicology. Blood. Amniotic fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Curva de calibração de solução aquosa de tiocianato de potássio (KSCN) nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 200 e 300 mcmol/L.....	80
Figura 2 -	Consumo médio de cianeto de potássio (KCN), em mg, de ratas, em diferentes fases fisiológicas: estrogênica (A), gestacional (B) e lactacional (C). As avaliações foram realizadas 0,5; 3; 6; 12 e 24 horas após a suspensão da dieta hídrica, contendo 3 mg/kg de KCN.....	84
Figura 3 -	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, na fase estrogênica, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN).....	87
Figura 4 -	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN).....	91
Figura 5 -	Níveis de tiocianato (mcmol/L) no líquido amniótico de ratas, no 14º dia de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN).....	91
Figura 6 -	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia da lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN).....	95
Figura 7 -	Níveis lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia da lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN).....	95

Figura 8 -	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L), de ratas, em diferentes fases fisiológicas: estrogênica, gestacional e lactacional, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavagem, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). As avaliações foram realizadas 0,5; 3; 6; 12 e 24 horas após a suspensão da dieta hídrica, contendo 3 mg/kg de KCN.....	100
Figura 9 -	Consumo médio de cianeto de potássio (KCN), em mg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de KCN: 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); do 6º ao 20º dia de gestação.....	113
Figura 10 -	Consumo médio de tiocianato de potássio (KSCN) (mg) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de KSCN: 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação.....	113
Figura 11 -	Níveis séricos de glicose (mg/dL) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação.....	116
Figura 12 -	Atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação.....	116
Figura 13 -	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação.....	118
Figuras 14A e B -	Fotomicrografia de corte histológico do rim de rata, que recebeu 24 mg/kg/dia de KSCN, na água de bebida, do 6º ao 20º dia da gestação, mostrando congestão (C), hemorragia (H) e nefrose (N) (HE, 20 X).....	123

Figura 15 -	Fotomicrografia de corte histológico do rim de rata, que recebeu 30 mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando hemorragia e hemossiderose (seta) (HE, 20 X).....	124
Figura 16 -	Fotomicrografia de corte histológico do fígado de rata, que recebeu 24 mg/kg/dia de KSCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando vacuolização de hepatócitos e proliferação de ductos biliares (seta) (HE, 20 X).....	125
Figura 17 -	Fotomicrografia de corte histológico do fígado de rata, que recebeu 30 mg mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando vacuolização de hepatócitos e congestão (HE, 10 X).....	125
Figura 18 A -	Fotomicrografia de corte histológico do sistema nervoso central de rata, que recebeu 30 mg mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando necrose neuronal (setas) (HE, 20 X).....	126
Figura 18 B -	Fotomicrografia de corte histológico do sistema nervoso central de rata, que recebeu 30 mg mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando congestão, focos hemorrágicos (seta) e gliose difusa (HE, 10 X).....	126
Figura 18 C -	Fotomicrografia de corte histológico do sistema nervoso central de rata, que recebeu 30 mg mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando gliose nodular focal e neuronofagia (seta) (HE, 20 X).....	127
Figura 19 -	Fotomicrografia de corte histológico do sistema nervoso central de rata, que recebeu 24 mg/kg/dia de KSCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando vacuolização discreta em substância branca do cerebelo e congestão (seta) (HE, 10 X).....	127
Figura 20 -	Fotomicrografia de corte histológico da tireóide de rata, que recebeu 30 mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando aumento no número de vacúolos de reabsorção no colóide dos folículos tireoideanos (HE, 10 X).....	128

Figura 21 -	Fotomicrografia de corte histológico do pâncreas de rata, que recebeu 30 mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6º ao 20º dia da gestação, mostrando depleção de células nas ilhotas de Langerhans (Ξ) (HE, 20 X).....	129
Figura 22 -	Fotomicrografia de corte histológico do pâncreas de rata do grupo controle (HE, 20 X).....	129
Figura 23 -	Média de consumo de cianeto de potássio (KCN), em mg, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN: 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto.....	140
Figura 24 -	Média de consumo de tiocianato de potássio (KSCN), em mg, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KSCN: 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto.....	140
Figura 25 -	Níveis séricos de colesterol (A) e uréia (B) (mg/dL) e atividade da enzima ALT (C) (U/L) de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto..	146
Figura 26 -	Níveis séricos de tiocianato de ratas, e respectivos filhotes machos e fêmeas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto.....	150
Figura 27 -	Consumo médio de cianeto de potássio (KCN), em mg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN: 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação.....	163
Figura 28 -	Consumo médio de tiocianato de potássio (KSCN), em	

mg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KSCN: 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação..... 163

Figura 29 - Produção média de leite (g/10 horas), no 14º dia de lactação de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. Os dados apresentados foram obtidos considerando-se a diferença de peso materno após e antes a mamada (PM), ou considerando-se a diferença de peso dos filhotes após e antes a mamada (PF). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados os pesos corpóreos de 10 animais, lactantes, e a média do peso de 10 ninhadas, em cada grupo..... 170

Figura 30 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação..... 172

Figura 31 - Níveis lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação..... 172

Figura 32 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de filhotes machos, no 18º dia de vida, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação..... 173

Figura 33 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de filhotes fêmeas,

no 18º dia de vida, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação..... 173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Coeficiente de variação (CV), expresso em porcentagem, intra e inter dias obtido pela análise dos níveis de tiocianato de amostras do padrão de 100 mcmol/L em água e em um <i>pool</i> de amostras de soro, leite e líquido amniótico. A recuperação (REC) do método, expressa em porcentagem, foi determinada por meio da relação obtida entre as absorbâncias de amostras de soluções padrão de tiocianato de potássio (KSCN) e de amostras de soro, leite e líquido amniótico de ratas do grupo controle adicionadas das soluções padrão de KCN nas concentrações de 25 e 300 mcmol/L.....	81
Tabela 2 -	Consumo médio de cianeto de potássio (KCN), em mg/kg, de ratas, em diferentes fases fisiológicas: estrogênica, gestacional e lactacional. As avaliações foram realizadas 0,5; 3; 6; 12 e 24 horas após a suspensão da dieta hídrica, contendo 3 mg/kg de KCN. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais em cada tempo avaliado.....	83
Tabela 3 -	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, na fase estrogênica, que receberam, por via oral, na água de bebida ou por gavagem, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado.....	86
Tabela 4 -	Níveis séricos e no líquido amniótico de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavagem, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado.....	90
Tabela 5 -	Níveis séricos e lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia da lactação, que receberam, por via oral, na	

	água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado.....	94
Tabela 6 -	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L), de ratas, em diferentes fases fisiológicas: estrogênica, gestacional e lactacional, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). As avaliações foram realizadas 0,5; 3; 6; 12 e 24 horas após a suspensão da dieta hídrica, contendo 3 mg/kg de KCN. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado.....	99
Tabela 7 -	Dados dos estudos toxicocinéticos do tiocianato em ratos, nas diferentes fases fisiológicas: estrogênica, gestacional e lactacional, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN) (Cmax: concentração máxima; tmax: tempo para atingir a Cmax; ASC: área sob a curva; Kel: constante de eliminação; Cl: <i>clearance</i> ; t1/2β: meia-vida de eliminação; Vd: volume aparente de distribuição). Foram utilizados 6 animais por grupo.....	101
Tabela 8 -	Peso médio corpóreo (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	108
Tabela 9 -	Ganho médio de peso corpóreo (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	109
Tabela 10 -	Média de consumo de ração (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4	

(FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 110

Tabela 11 - Consumo médio diário de água (mL) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 111

Tabela 12 - Consumo médio de cianeto de potássio (KCN) ou tiocianato de potássio (KSCN), em mg/kg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 112

Tabela 13 - Desempenho reprodutivo médio de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 114

Tabela 14 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L): alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 115

Tabela 15 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de

gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 117

Tabela 16 - Incidência de anomalias e malformações ósseas em fetos de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as frequências de ocorrência..... 119

Tabela 17 - Número de centros de ossificação da prole de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram analisados 40 fetos por grupo..... 120

Tabela 18 - Incidência de anomalias e/ou malformações viscerais na prole de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as frequências de ocorrência..... 121

Tabela 19 - Intensidade das lesões histológicas observadas em ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram avaliados 3 fetos por grupo..... 122

Tabela 20 - Peso médio corpóreo (g) de ratas, no período de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 135

Tabela 21 -	Ganho médio de peso corpóreo (g) de ratas, no período de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	136
Tabela 22 -	Consumo médio de ração (g) de ratas, no período de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	137
Tabela 23 -	Consumo médio de água (mL/dia) de ratas, no período de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	138
Tabela 24 -	Consumo médio de cianato de potássio (KCN) ou tiocianato de potássio (KSCN), em mg, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN: 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou KSCN: 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	139
Tabela 25 -	Avaliação reprodutiva de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	141

Tabela 26 -	Peso médio (g) das ninhadas de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	142
Tabela 27 -	Ganho médio de peso (g) das ninhadas de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	143
Tabela 28 -	Peso médio (g) do cérebro e cerebelo de filhotes de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 20 animais, machos e fêmeas, por grupo.....	144
Tabela 29 -	Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST) de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo.....	145
Tabela 30 -	Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), obtidos por meio de <i>pool</i> sanguíneo de filhotes machos, no 22º dia de vida, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida,	

diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 amostras por grupo..... 147

Tabela 31 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), obtidos por meio de *pool* sangüíneo de filhotes fêmeas, no 22º dia de vida, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 amostras por grupo..... 148

Tabela 32 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas avaliadas no 22º dia pós-parto, e de suas respectivas proles, e que receberam durante a gestação, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianato de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram analisadas 10 amostras de cada grupo..... 149

Tabela 33 - Intensidade das lesões histológicas observadas em ratas, que receberam durante a gestação, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas Foram avaliados 3 animais por grupo..... 151

Tabela 34 - Intensidade das lesões histológicas observadas em filhotes, no 22º dia de vida, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24

mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram analisados 3 animais por grupo. 152

Tabela 35 - Peso médio corpóreo de ratas (g) que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 158

Tabela 36 - Ganho de peso médio corpóreo (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 159

Tabela 37 - Consumo médio de ração (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 160

Tabela 38 - Consumo médio de água (mL) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 161

Tabela 39 - Consumo médio de cianeto de potássio (KCN) ou tiocianato de potássio (KSCN), em mg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes

doses de KCN: 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou KSCN: 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 162

Tabela 40- Peso médio das ninhadas (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram avaliadas 10 ninhadas por grupo..... 164

Tabela 41 - Ganho de peso (g) médio das ninhadas de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram avaliadas 10 ninhadas por grupo..... 165

Tabela 42 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo..... 166

Tabela 43 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), obtidos, no 18º dia de vida, por meio de *pool* sanguíneo, de filhotes machos de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à

eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizadas 10 amostras por grupo..... 167

Tabela 44 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), obtidos, no 18º dia de vida, por meio de *pool* sangüíneo, de filhotes fêmeas de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizadas 10 amostras por grupo..... 168

Tabela 45 - Produção média de leite (g/10 horas), no 14º dia de lactação de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. Os dados apresentados foram obtidos considerando-se a diferença de peso materno após e antes a mamada (PM), ou considerando-se a diferença de peso dos filhotes após e antes a mamada (PF). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados os pesos corpóreos de 10 animais, lactantes, e a média do peso de 10 ninhadas, em cada grupo..... 169

Tabela 46 - Níveis séricos e lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas e suas proles, avaliados no 19º e 18º dia da lactação, respectivamente. As mães receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizadas 10 amostras por grupo..... 171

Tabela 47 - Intensidade das lesões histológicas observadas em ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes

doses de cianato de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3) do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram avaliados 3 animais em cada grupo..... 174

Tabela 48 - Intensidade das lesões histológicas observadas em filhotes, no 18º dia de vida, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianato de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3) do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram avaliados 3 animais em cada grupo..... 175

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT.....	Aminotransferase
As ₂ O ₃	Trióxido de arsênio
AST.....	Aspartato aminotransferase
ASC.....	Área sob a curva
CL.....	Número de corpos lúteos
Cl.....	<i>Clearance</i>
Cmax.....	Concentração máxima
CV.....	Coeficiente de variação ou imprecisão
EUA.....	Estados Unidos da América
FA.....	Fosfatase alcalina
FV.....	Número de fetos vivos
g.....	Gramma
grau PA.....	Grau para análise
h.....	Hora
HCl.....	Ácido clorídrico
HE.....	Hematoxilina-eosina
IM.....	Número de implantações
KCN.....	Cianeto e potássio
Kel.....	Constante de eliminação
kg.....	Quilograma
KOH.....	Hidróxido de potássio
KSCN.....	Tiocianato de potássio
L.....	Litro
mcmol.....	Micromol
mg.....	Miligrama
mL.....	Mililitro
NaCl.....	Cloreto de sódio
NaOH.....	Hidróxido de sódio

p-FDA	p-fenilenodiamino
r^2	Coeficiente de determinação
rpm.....	Rotação por minuto
SNC.....	Sistema nervoso central
$t_{1/2\beta}$	Meia-vida de eliminação
T_3	Triiodotironina
T_4	Tiroxina
TCA.....	Ácido tricloroacético
t_{max}	Tempo para alcançar a C_{max}
UI.....	Unidade internacional
V_d	Volume aparente de distribuição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
1.1	A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO TOXICOCINÉTICO	39
1.2	SOBRE A TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO.....	44
2	OBJETIVOS	47
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	ANIMAIS.....	51
3.2	MATERIAL	52
3.2.1	Reagentes e Soluções	52
3.2.2	“Kits” Comerciais para Dosagem Bioquímica	56
3.2.3	Aparelhos	56
3.2.4	Ração	56
3.3	PROCEDIMENTOS.....	57
3.3.1	Alimentação dos Animais	57
3.3.2	Confirmação da Prenhez	57
3.3.3	Administração de Cianeto ou Tiocianato de Potássio aos Animais	58
3.3.3.1	Administração de Cianeto ou Tiocianato de Potássio pela Água de Bebida.	58
3.3.3.2	Administração por Gavage	59
3.3.4	Avaliação do Ganho de Peso	59
3.3.5	Quantificação da Produção de Leite de Ratas	60
3.3.6	Coleta de Leite para a Quantificação de Tiocianato	60
3.3.7	Cesariana	61
3.3.8	Coleta de Sangue	62

3.3.9	Coleta de Líquido Amniótico	62
3.3.10	Dosagem.	63
3.3.10.1	Dosagem Bioquímica.	63
3.3.10.2	Dosagem de Tiocianato no Soro, Líquido Amniótico e Leite Materno de Ratas.	63
3.3.11	Análise dos Fetos no 20º Dia de Gestação: Avaliação de Malformações Viscerais e Ósseas.	64
3.3.12	Exame Anátomo – Histológico.	65
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	66
3.4.1	Experimento 1: Validação da Metodologia para a Determinação de Tiocianato, por Espectrofotometria, em Soro, Leite e Líquido Amniótico de Ratos	66
3.4.2	Experimento 2: Estudo Cinético da Transformação do Cianeto em Tiocianato em Ratas	68
3.4.2.1	Avaliação em Ratas Fêmeas Virgens na Fase Estrogênica	68
3.4.2.2	Avaliação na Gestação.....	69
3.4.2.3	Avaliação na Lactação	70
3.4.3	Experimento 3: Efeitos da Administração, em Ratas, de KCN ou KSCN, Durante o Período de Gestação	73
3.4.4	Experimento 4: Efeitos da Administração, em Ratas, de KCN ou KSCN, Durante o Período de Gestação. Avaliação Pós-Natal.	72
3.4.5	Experimento 5: Efeitos da Administração, em Ratas, de KCN ou KSCN, Durante a Lactação	74
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
4	RESULTADOS	78
4.1	EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE TIOCIANATO, POR ESPECTROFOTOMETRIA, EM SORO, LEITE E LÍQUIDO AMNIÓTICO DE RATOS	79
4.2	EXPERIMENTO 2: ESTUDO CINÉTICO DA TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO EM RATAS	82

4.2.1	Avaliação em Ratas Fêmeas Virgens na Fase Estrogênica	85
4.2.2	Avaliação na Gestação	88
4.2.3	Avaliação na Lactação	92
4.3	EXPERIMENTO 3: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO, EM RATAS, DE KCN OU KSCN, DURANTE O PERÍODO DE GESTAÇÃO	102
4.4	EXPERIMENTO 4: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO, EM RATAS, DE KCN OU KSCN, DURANTE O PERÍODO DE GESTAÇÃO. AVALIAÇÃO PÓS-NATAL.....	130
4.5	EXPERIMENTO 5: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO, EM RATAS, DE KCN OU KSCN, DURANTE A LACTAÇÃO.....	153
5	DISCUSSÃO	176
6	CONCLUSÕES	206
	REFERÊNCIAS	209

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Desde a antigüidade, sabia-se que o consumo em excesso de mandioca, amêndoas amargas e folhas de cereja silvestre poderia promover um quadro de intoxicação. Entretanto, somente no século XVIII reconheceu-se que o agente tóxico comum, presente nestas plantas, era o cianeto. Wepfer, em 1679, e Maddern, em 1731, descreveram o efeito letal causado pela administração de extrato de amêndoas amargas e água de cereja silvestre, respectivamente. Mas foi Scheele (1782), quem primeiro isolou o ácido cianídrico (HCN) e por ironia também experimentou a toxicidade letal, acidentalmente em seu laboratório. A síntese do HCN ocorreu em 1815, por Gay-Lussac, que o denominou de ácido cianídrico. Em 1817, Magendie sugeriu que o HCN, em doses apropriadas, poderia ser utilizado terapeuticamente no controle da tosse e em doenças pulmonares. Esta suposição também foi aceita por um médico inglês, Granville, e, até 1948, a água de cereja silvestre fazia parte do arsenal terapêutico da Farmacopéia Britânica (BALLANTYNE, 1987; SYKES, 1981).

O cianeto é uma substância ubíqua no meio ambiente e tanto humanos quanto animais podem estar expostos às diversas fontes: a água; o produto de combustão, principalmente de material plástico e acrílico; a fumaça do cigarro; alguns fumigantes; as soluções fotográficas; alguns medicamentos como o nitroprussiato de sódio e as plantas cianogênicas. Este ânion pode intoxicar o homem e os animais por meio de inalação, absorção através da mucosa ou da pele,

ou ainda por ingestão (SALKOWSKI; PENNEY, 1994).

Uma fonte importante de exposição ao cianeto são os vegetais. Este íon é encontrado principalmente na forma de glicosídeos cianogênicos, os quais são derivados de aminoácidos. São conhecidos mais de vinte e cinco glicosídeos cianogênicos em 2050 espécies de plantas superiores, distribuídas em 110 famílias diferentes, destacando-se a *Rosaceaea*, a *Leguminosae*, a *Gramineae*, a *Aracea*, a *Compositaea*, a *Euphorbiaceae* e a *Passifloracea* com 150, 125, 100, 50, 50, 50 e 30 espécies, respectivamente (POULTON, 1983).

Dos glicosídeos cianogênicos que são reconhecidamente tóxicos para os humanos e animais, destacam-se a linamarina e a lotaustralina presentes na *Manihot sp.* (mandioca); a amidalina e a prunasina, as quais são encontradas nas sementes de damasco, nas folhas de cereja selvagem, no mogno da montanha e nas amêndoas amargas; a sambunigrina, encontrada na *Sambucus nigra* e na *Acacia cunninghamii*; a durrina, encontrada no sorgo; a taxifilina, no bambú, no *Trifolium repens* (trevo branco), no *Linum sp* (linho), no *Lotus sp* e no *Phaseolus lunatus* (sementes de lima) e a triglochinina no *Triglochin sp.* (CONN, 1978). De maneira geral, os glicosídeos cianogênicos estão inseridos nos vacúolos das células dos vegetais (CONN, 1978). Sua liberação ocorre por processos físicos, tais como mastigação, congelação e secagem. Estes processos permitem o contato dos vacúolos, contendo o glicosídeo, com uma enzima, encontrada no citossol, denominada β -glicosidase, que proporciona seu desdobramento em açúcar e aglicona, sendo que este último composto sofrerá ainda a ação de mais uma enzima denominada hidroxinitrila-liase, que por sua vez formará o íon cianeto e um composto aldeído ou cetônico (CONN, 1978; OKE, 1980).

Após a absorção, o cianeto, por apresentar alta afinidade pela forma

heme férrica da enzima citocromo oxidase, se liga a esta enzima, inibindo a etapa citocromo-a-citocromo-a₃; assim, não há a transferência do elétron do citocromo a₃ para o oxigênio molecular e, conseqüentemente, a cadeia respiratória é paralisada. Neste processo, forma-se um complexo relativamente estável, portanto, verifica-se anóxia histotóxica; como a oxihemoglobina não pode liberar o oxigênio para o transporte de elétrons, o sangue venoso torna-se arteriolizado (ONG, 1989; PANIGRAHI et al., 1992; POULTON, 1983).

A morte pode ocorrer com a ingestão de pequenas quantidades dos sais de sódio ou potássio em questão de minutos ou horas, dependendo da dose, via e tempo de exposição. Entretanto, não seria correto referir-se às “concentrações letais no sangue” e sim às “concentrações de cianeto que são compatíveis com a morte pela intoxicação aguda”, pois pode-se encontrar concentrações sangüíneas superiores de cianeto em indivíduos, que receberam antídotos e não vieram a óbito, com aqueles achados nos quais se verificou a morte, em concentrações mais baixas, em indivíduos que não receberam antídotos (TROUP; BALLANTYNE, 1987).

Em geral, o íon cianeto difunde-se livremente entre o plasma, o líquido intersticial e intracelular. Entretanto, os eritrócitos possuem alta afinidade pelo cianeto, seqüestrando-o da circulação sangüínea, e sendo esta forma também uma maneira de proteção do organismo contra os efeitos tóxicos do cianeto. Contudo, nestas células não ocorre nenhuma transformação do cianeto em um composto menos tóxico (BALLANTYNE, 1987).

Os mamíferos possuem um eficiente mecanismo de detoxificação do cianeto, o qual é realizado, principalmente, por uma enzima denominada rodanase ou acetilsulfotransferase. Esta enzima, presente principalmente em mitocôndrias de células hepáticas e renais, catalisa a transferência de um átomo de enxofre de um

doador, por exemplo, o tiosulfato, para o cianeto, formando, principalmente, o tiocianato, reação considerada irreversível. O tiocianato, principal metabólito do cianeto, não tem a capacidade de se ligar a citocromo oxidase, sendo eliminado por meio da urina (BALLANTYNE, 1987; UNITED STATES ARMY, 1999).

Ainda, o cianeto pode ser eliminado, através dos pulmões, na forma de ácido cianídrico (HCN); reagindo com a cisteína e eliminado pela urina ou reagindo com a hidroxicobalamina, formando a cianocobalamina, que também é excretada na urina e bile (BALLANTYNE, 1987). Portanto, a intoxicação aguda pelo cianeto ocorrerá somente quando as reações de detoxificação forem excedidas (BALLANTYNE, 1987; GUZMÁN; OCHOA; GIL, 1977; ONG, 1989; PARKINSON, 1996; WAY, 1984).

Por outro lado, há trabalhos na literatura relatando que a exposição prolongada ao cianeto, em baixas concentrações, pode ocasionar um quadro de toxicidade crônica. De fato, diversos estudos relacionam neuropatias, como por exemplo, a neuropatia atáxica tropical - NAT (OSUNTOKUN, 1981) e a paraparesia espástica ou “konzo” (TYLLESKÄR et al., 1995), ao alto consumo de mandioca, um alimento que pode conter altos níveis de cianeto, na forma de glicosídeo cianogênico, a linamarina, presente tanto nas raízes, como em suas folhas (POULTON, 1983). A exposição prolongada ao cianeto tem sido correlacionada, também, em decorrência do alto consumo de mandioca e cigarro, às doenças oculares como a ambliopia por tabaco – álcool (PETTIGREW; FELL, 1972; POTTS, 1973; SOLBERG; ROSNER; BELKIN, 1998); neuropatia retrobulbar da anemia perniciosa (FREEMAN, 1988); neuropatia óptica hereditária de Leber (SYME et al., 1983; TSAO et al., 1999); ambliopia do oeste indiano (CREWS, 1963; MACKENZIE; PHILLIPS, 1968); neuropatia óptica jamaicense (CARROLL, 1971); ambliopia

tropical (OSUNTOKUN; OSUNTOKUN, 1971); neuropatia óptica cubana (THE CUBAN OPTIC NEUROPATHY FIELD INVESTIGATION TEAM, 1995; TUCKER; HEDGES, 1993).

Vários trabalhos correlacionam a ingestão de plantas cianogênicas à alteração da função tireoideana, tanto em humanos (GAITAN et al., 1994) como em diferentes espécies de animais (GUTZWILLER, 1993; RATNAKUMAR; RAJAN, 1992; TEWE et al., 1984). Assim, sabe-se que o tiocianato, principal metabólito do cianeto, compete com a captação do iodo na tireóide, e, conseqüentemente, inibe a produção dos hormônios tireoidianos, triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4). Portanto, as baixas concentrações destes hormônios, causam os sintomas característicos do hipotireoidismo. Além disto, haverá, devido ao mecanismo de *feed back* negativo, o aumento da produção do hormônio tireotrófico, o qual, por sua vez, produz aumento da tireóide, resultando em uma doença denominada de bócio. Sabe-se que os hormônios tireoidianos agem no metabolismo energético e celular, no crescimento e na diferenciação celular; desta maneira, é de se supor que todas estas funções estejam comprometidas neste tipo de intoxicação (DOHAN; DE LA VIEJA; CARRASCO, 2000; OKE, 1980; ONG, 1989; TEWE et al., 1984).

Ainda, tem-se correlacionado a diabetes pancreática e a diabetes tropical em humanos à ingestão prolongada de plantas cianogênicas, em especial à mandioca (ASSAN et al., 1988; KAMALU, 1995; MCMILLAN; GEEVARGHESE, 1979; PITCHUMONI et al., 1988). McMillan e Geevarghese (1979) sugeriram que esta doença seria causada por meio da liberação do cianeto pela mandioca, afetando a porção endócrina do pâncreas. Entretanto, não há modelos experimentais, utilizando o cianeto, que reproduzam este quadro de diabetes.

1.1 A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO TOXICOCINÉTICO

O estudo da cinética das substâncias químicas foi inicialmente realizada com os fármacos e, conseqüentemente, denominou-se farmacocinética. A seguir, avaliações desta natureza foram realizadas também para os xenobióticos, sendo este estudo denominado, então, de toxicocinético que se refere à descrição matemática, de modelagem e do curso do tempo na disposição dos agentes tóxicos e/ou seus metabólitos, em um organismo, que envolve a absorção, a distribuição, a biotransformação e a excreção (MEDINSKY; VALENTINE, 2001).

A toxicologia em Medicina Veterinária difere da humana, pois a primeira envolve diferentes espécies animais com características próprias. Neste sentido, embora o mecanismo de ação de um dado xenobiótico, alvo de estudo da toxicodinâmica, ser, geralmente, o mesmo nas diferentes espécies animais, sabe-se que a intensidade e duração dos efeitos deletérios normalmente variam, e podem, em parte, ser atribuídas às oscilações, de maneira geral, no comportamento toxicocinético (BAGGOT, 1992). Desta forma, a extrapolação de uma determinada dose de exposição de uma espécie para outra, pode resultar em conseqüências catastróficas (GÓRNIK; SPINOSA, 2003).

A relação entre a dose de um agente tóxico e os efeitos observados podem ser complexos, pois esta relação depende do comportamento toxicocinético e da informação da atividade da toxicodinâmica. Os modelos toxicodinâmicos e toxicocinéticos compartilham a concentração do xenobiótico como característica em

comum. O conhecimento da toxicocinética é a maneira mais segura e eficaz, com a menor relação custo *versus* benefício, para responder a respeito da margem de segurança de exposição a um determinado agente tóxico (GREGUS; KLAASSEN, 2001).

O efeito tóxico está relacionado à concentração do xenobiótico em seu sítio de ação, assim, é de grande valia monitorar esta concentração. Entretanto, os sítios de ação são, geralmente, inacessíveis ou são amplamente distribuídos pelo organismo em estudo, desta forma a mensuração deste parâmetro, nestes sítios, é quase impossível de se realizar. O método menos invasivo para a detecção do agente tóxico ou de um metabólito seria a coleta de amostras de líquidos orgânicos, como o sangue, durante um determinado intervalo de tempo. Assumindo que a concentração de qualquer agente tóxico ou de um metabólito, no sangue, está em equilíbrio com os tecidos, então mudanças na concentração sangüínea refletirão mudanças na concentração destas substâncias nos tecidos (MEDINSKY; VALENTINE, 2001).

Estudos mostram que o organismo pode ser geralmente representado por compartimentos, os quais podem ser descritos matematicamente. Os modelos matemáticos 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 rins, fígado, pulmões e coração. Os modelos de dois ou mais compartimentos, por sua vez, estão conectados a um ou mais compartimentos periféricos, que representam os tecidos os quais entram em equilíbrio mais vagarosamente, por exemplo, o tecido adiposo (MEDINSKY; VALENTINE, 2001; RENWICH, 2000).

A absorção e o *clearance* das substâncias podem ser medidos

diretamente, com metodologia analítica apropriada, e são classificados como parâmetros independentes de modelagem. A absorção, em toxicologia, refere-se ao transporte do xenobiótico de seu local de exposição até a circulação sanguínea envolvendo a difusão deste agente tóxico através de membranas para o sangue (VRIES, 1996).

A eliminação de uma determinada substância de um organismo inclui a biotransformação, a exalação e a excreção. A eliminação é de primeira ordem quando a velocidade da eliminação é proporcional a quantidade de substrato presente. Por outro lado, na cinética de ordem zero a eliminação é constante e independe da concentração do agente no organismo.

O *clearance* (Cl) ou depuração descreve a velocidade que uma substância é eliminada do organismo, ou seja, o volume do líquido biológico contendo a substância que foi depurado por unidade de tempo (volume/tempo). O *clearance* pode ser estimado utilizando-se a seguinte relação (VRIES, 1996):

$$Cl = \text{velocidade de eliminação/concentração plasmática} = \text{dose/ASC} = V_d \times K_{el} \text{ (mono) ou } V_d \times \beta \text{ (dois compartimentos)}$$

As substâncias que se comportam como no modelo mono compartimental equilibram-se rapidamente entre o sangue e os tecidos e em conjunto com o processo de eliminação. Não significa que a concentração seja igual em todo o organismo, mas assume que mudanças que ocorram na concentração plasmática reflitam mudanças proporcionais aos dos tecidos. No modelo mono compartimental a eliminação ocorre por meio do processo de 1ª ordem, isto é, a velocidade de eliminação em qualquer tempo é proporcional à concentração da substância no organismo (SHARGEL; YU, 1993; VRIES, 1996).

A equação matemática que exprime esta condição pode ser simplificada

em:

$$C = C_0 \cdot e^{-K_{el} \cdot t}$$

Onde:

C = concentração do agente tóxico no sangue, em um determinado tempo

(t)

C_0 = concentração inicial do agente tóxico no sangue no tempo zero

K_{el} = constante de eliminação

Em contrapartida, no modelo de dois compartimentos, o agente tóxico necessita de um tempo maior para que a concentração nos tecidos alcance o equilíbrio com os níveis plasmáticos. A equação matemática que caracteriza esta condição é dada por (SHARGEL; YU, 1993; VRIES, 1996):

$$C = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

Onde:

A e B = constantes

α = constante de distribuição

β = constante de eliminação

A partir da caracterização do modelo, pode-se avaliar os diversos parâmetros toxicocinéticos, descritos a seguir. A partir da curva de concentração do xenobiótico *versus* o tempo, podemos calcular a área sob a curva (ASC) pelo método dos trapezóides lineares. A concentração máxima (C_{max}) e seu respectivo tempo (t_{max}) podem ser obtidos diretamente do gráfico, sem interpolação dos dados (SHARGEL; YU, 1993; VRIES, 1996).

A K_{el} representa a fração da substância removida por unidade de tempo (t^{-1}), e pode ser obtida por meio do cálculo do *slope* da curva acima descrita (SHARGEL; YU, 1993; VRIES, 1996).

O volume aparente de distribuição (V_d) é uma constante de proporcionalidade que relaciona a quantidade total da substância no organismo à concentração no plasma. O V_d é um espaço aparente no qual a concentração de uma determinada substância está distribuída no organismo e que resulta em uma dada concentração plasmática. O V_d 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 de V_d grande pode representar maior penetração nos tecidos. O V_d pode ser calculado utilizando-se a fórmula (SHARGEL; YU, 1993; VRIES, 1996):

$$V_d = Cl/Kel$$

A meia vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) é o tempo necessário para que a concentração sangüínea do agente em estudo caia pela metade (SHARGEL; YU, 1993; VRIES, 1996), e pode ser calculada pela equação:

$$t_{1/2\beta} = 0.693 / Kel$$

1.2 SOBRE A TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

A toxicologia do desenvolvimento abrange o estudo da cinética, mecanismo de ação tóxica, patogênese e as conseqüências da exposição aos agentes tóxicos ou condições que levam ao desenvolvimento anormal do animal (ROGERS; KAVLOCK, 2001). As manifestações da toxicidade no desenvolvimento incluem malformações estruturais, retardo no crescimento, dano no desenvolvimento e a morte do organismo. O termo toxicologia do desenvolvimento é recente e refere-se a uma área do conhecimento relativamente nova, mas tem suas raízes firmemente relacionadas à teratologia que foi antigamente relacionada às alterações apenas de ordem estrutural. Atualmente, a toxicologia do desenvolvimento tem como sinônimo a teratologia. Wilson (1977) definiu a teratologia como “a ciência interessada em determinar as causas, 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”.

O desenvolvimento de mamíferos pode ser dividido em quatro períodos: 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 a embrioletalidade, sendo rara a ocorrência de teratogênese. O 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 embriofetalidade. Finalmente, o fetal e o neonatal, no qual todos os tecidos estão formados, e ocorre o crescimento e maturação fisiológica do animal e humanos (BERNARDI, 2002; ROGERS; KALVLOCK, 2001). No rato, o período de implantação compreende o 5º e 6º dia após a fecundação, a organogênese do 6º ao 15º dia, e o período de desenvolvimento fetal do 16º ao 21º dia (ROGERS; KALVLOCK, 2001; BERNARDI, 2002).

O protocolo para avaliação da toxicidade da reprodução, que é amplamente aceito pelas diversas agências regulamentárias de avaliação de toxicidade, consiste na administração da substância a ser avaliada, para fêmeas gestantes desde a implantação até o final do período gestacional (1 dia antes do dia do parto), quando os fetos são analisados quanto às formações esqueléticas e viscerais antes do nascimento. No entanto, sua grande limitação se refere ao fato de que estes estudos não expõem, nem examinam, os animais experimentais, em nenhum período pós-natal. Deve-se ressaltar que, embora algumas agências, como o *Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines* dos Estados Unidos, inclua outro teste durante o desenvolvimento pós-natal, a avaliação pós-natal não é obrigatória ou não é solicitada, e geralmente não é conduzida pelas indústrias (CLAUDIO; BEARER; WALLINGA, 1999).

Portanto, a presente pesquisa objetiva verificar não só os efeitos do cianeto e do seu principal metabólito, o tiocianato, durante o período perinatal, observando-se o perfil toxicocinético de transformação do cianeto em tiocianato mas também avaliar os efeitos, nas proles, de mães submetidas à exposição ao cianeto de potássio (KCN) e ao tiocianato de potássio (KSCN) durante a gestação e a lactação. E ainda, pretende-se confrontar aqueles protocolos de avaliação de risco,

tradicionalmente utilizados pela indústria para avaliação de agentes químicos e alimentos, com uma nova proposta aqui estabelecida, na qual procura-se verificar os possíveis efeitos do cianeto e do tiocianato nestas proles após o nascimento.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos tóxicos do cianeto e de seu principal metabólito, o tiocianato, em ratas e em suas respectivas proles no período perinatal.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica para a determinação de tiocianato nos meios biológicos: sangue, leite e líquido amniótico, em ratos.

- Estudar a toxicocinética do cianeto administrado na água de bebida e por gavagem, em ratas, na fase de estro, gestação e lactação, utilizando o tiocianato como indicador biológico da exposição ao cianeto.

- Estudar os possíveis efeitos tóxicos promovidos pela exposição ao cianeto e ao seu principal metabólito, o tiocianato, em ratas expostas durante o período de gestação.

- Estudar os possíveis efeitos fetotóxicos promovidos pela exposição ao cianeto e ao seu principal metabólito, o tiocianato, em ratas expostas durante o período de gestação.

- Avaliar o desenvolvimento da prole de ratas expostas ao cianeto e ao seu principal metabólito, o tiocianato, durante o período de gestação.

- Estudar os possíveis efeitos tóxicos promovidos pela exposição ao cianeto e ao seu principal metabólito, o tiocianato, em ratas expostas durante o período de lactação.

- Avaliar o desenvolvimento da prole de ratas expostas ao cianeto e ao seu principal metabólito, o tiocianato, durante o período de lactação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas fêmeas virgens da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus*), pesando cerca de 220 g no início dos experimentos, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e machos da mesma linhagem para o acasalamento.

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno com tampas metálicas de dimensões 40 x 50 x 20 cm, com cama de maravalha e acondicionadas em salas do mesmo biotério, com temperatura controlada entre 22 e 24°C por meio de aparelho de ar condicionado e ciclo de claro e escuro de 12 horas cada. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período de permanência dos animais no biotério.

Para o acasalamento, machos e fêmeas foram colocados nas gaiolas acima descritas, sempre no final da tarde, na proporção de 1:2, respectivamente. Este procedimento foi repetido até que o número desejado de ratas prenhes fosse

alcançado. Constatada a prenhez, as fêmeas foram mantidas individualmente nestas mesmas gaiolas até o final de cada experimento.

3.2 MATERIAL

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

3.2.1 Reagentes e Soluções

- acetona 99,5% (Dinâmica®);
- água de bromo saturada (Haloquímica®);
- álcool benzílico 99,5% (Synth®);
- álcool etílico 96° GL (Dinâmica®);
- glicerina 99,5% (Dinâmica®);
- ocitocina (União Química®) ampola contendo 5UI / 1 mL;
- p-fenilenodiamino (p-FDA) (Sigma®): o pFDA (grau PA) apresenta-se como cristais brancos ou ligeiramente avermelhados, os quais escurecem quando expostos ao ar. Neste caso, é necessário realizar a recristalização que consistiu em: 5 g de pFDA foram dissolvidos em aproximadamente 20 mL de água destilada quente contendo 0,5 g de

carvão ativo e 0,2 g de bissulfito de sódio (Reagen®) e esta solução foi filtrada a quente. O filtrado foi resfriado em banho de gelo e os cristais formados foram filtrados e lavados com 2 mL de água destilada gelada e secados em dessecador, ao abrigo da luz. Para se obter a solução de pFDA na concentração de 2 mg / 1 mL, foram dissolvidos 2 g de pFDA em HCl (0,5 M) e completou-se até 1 L, procedimento este realizado na capela. Filtrou-se e armazenou-se esta solução em frasco âmbar previamente identificado, sob refrigeração (2 - 8°C);

- solução clareadora: foram misturados etanol, álcool benzílico e glicerina nas proporções 2:1:2, em volume, respectivamente, e a solução resultante foi armazenada em frasco previamente identificado;
- solução de ácido tricloroacético (TCA) (Vetec®) 10%: foram dissolvidos 100 g de TCA (grau PA) e completou-se para 1 L com água destilada; a solução resultante foi filtrada e armazenada em frasco previamente identificado;
- solução de alizarina (Synth®): foram dissolvidos 6 g de alizarina e completou-se para 1 L com solução de KOH a 0,8%; a solução resultante de cor roxa foi filtrada e armazenada em frasco previamente identificado;
- solução de cianeto de potássio (KCN) (Merck®) 10 mg/mL: 1,0 g de KCN (grau PA) foi dissolvido com água destilada e completado para 100 mL com este mesmo solvente. A solução resultante foi filtrada e armazenada em frasco previamente identificado. Esta solução foi preparada no momento do uso;
- solução de Harrison: etanol 95%, glicerol, solução de formol 40% e

solução salina 9% foram misturados nas proporções 8:1:2:7,5, em volume, respectivamente, e a solução resultante foi armazenada em frasco previamente identificado;

- solução de HCl 1 M: diluiu-se 84,8 mL de HCl concentrado (Ecibra®) em água destilada e completou-se para 1 L em balão volumétrico. Esta diluição foi preparada em banho de gelo e em capela; filtrou-se e armazenou-se esta solução em frasco âmbar previamente identificado. A solução de HCl 0,5 M foi preparada a partir da diluição da solução de HCl 1 M;
- solução de hidróxido de sódio 1,0 N (NaOH) (Merck®): dissolveu-se 4 g de hidróxido de sódio (grau PA) em água destilada e completou-se para 1 L. A solução resultante foi filtrada e armazenada em frasco plástico previamente identificado. As soluções de NaOH a 0,8 N e 0,1 N foram preparadas a partir da diluição da solução a 1,0 N;
- solução de piridina: misturou-se HCl concentrado, solução de piridina e água destilada na proporção 1:6:4, em volume, respectivamente. Esta solução foi preparada na capela e em banho de gelo; filtrou-se e armazenou-se em frasco âmbar previamente identificado;
- solução de piridina-pFDA (Synth®): misturou-se solução de piridina e solução de pFDA na proporção 3:1, em volume, respectivamente. Esta mistura foi preparada no momento do uso;
- solução de tiocianato de potássio (KSCN) 10 mg/mL: dissolveu-se 1,0 g de KSCN (Farmitália Carlo Erba®) (grau PA) e completou-se para 100 mL com água destilada; em seguida, esta solução foi filtrada e armazenada em frasco previamente identificado. Esta solução foi

preparada no momento do uso;

- solução de tiocianato de potássio na concentração de 300 mcmol/L: dissolveu-se 29,1 mg de KSCN (Farmitália Carlo Erba®) e completou-se até 1L com água destilada; em seguida, esta solução foi filtrada e armazenada em frasco previamente identificado. A partir desta solução foram preparadas as soluções de KSCN nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 200 mcmol/L;
- solução de trióxido de arsênio: dissolveu-se 20 g de trióxido de arsênio (As_2O_3) (Sigma®) (grau PA) em solução aquecida de NaOH 0,1 N e completou-se para 1L. O pH desta solução foi ajustado para o valor 7 com HCl concentrado; em seguida esta solução foi filtrada e armazenada em frasco plástico previamente identificado;
- solução de formol 36,5 % em peso ou 40% em volume (Synth®);
- solução de cloreto de sódio (NaCl) a 9%: dissolveu-se 90 g de NaCl (grau PA) (Synth®) e completou-se para 1 L com água destilada; em seguida, esta solução foi filtrada e armazenada em frasco previamente identificado.
- solução de sulfeto de amônio a 25%: dissolveu-se 25 g de sulfeto de amônio (grau PA) (Synth®) e completou-se para 100 mL com água destilada; em seguida, esta solução foi filtrada e armazenada em frasco previamente identificado. Estes procedimentos foram realizados em capela.

3.2.2 “Kits” Comerciais para Dosagem Bioquímica

Enzimas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) (Celm®);

Uréia, creatinina, glicose e colesterol (Celm®).

3.2.3 Aparelhos

CELM SBA-200 utilizado para as determinações bioquímicas;

Multiskan MCC340 Titertek® utilizado para a dosagem do tiocianato;

Centrifugador Fanem® Excelsa Baby.

3.2.4 Ração

Durante todos os experimentos utilizou-se ração para ratos (Nuvilab® CR1).

3.3 PROCEDIMENTOS

Para a execução dos diversos experimentos foram realizados os seguintes procedimentos.

3.3.1 Alimentação dos Animais

Durante todo o período experimental, os animais receberam ração comercial (Nuvilab® CR1) e água potável *ad libitum*, contendo ou não KCN ou KSCN dependendo do grupo experimental.

3.3.2 Confirmação da Prenhez

Na manhã seguinte ao acasalamento, sempre no horário compreendido entre 7 h e 9 h, procedia-se ao lavado vaginal e, ao se confirmar a presença de espermatozóides neste lavado, por meio de análise microscópica, conforme técnica descrita por Vickery e Bennet (1970), considerava-se, então, o dia zero da gestação.

3.3.3 Administração de Cianeto ou Tiocianato de Potássio aos Animais

Para a execução dos diversos experimentos realizou-se os procedimentos de administração do KCN e do KSCN, conforme descrição abaixo.

3.3.3.1. Administração de Cianeto ou Tiocianato de Potássio pela Água de Bebida

O cálculo da quantidade de KCN ou KSCN a ser adicionada na água do bebedouro foi baseado no peso e no grupo experimental ao qual os animais pertenciam. Primeiramente, pesou-se os animais individualmente. A partir deste dado, calculou-se a quantidade de KCN ou KSCN a ser adicionada no bebedouro de cada animal pertencente aos diversos grupos experimentais, por meio da relação dose de KCN ou KSCN (mg)/peso dos animais (g). Em seguida, a partir de uma solução de concentração de KCN ou KSCN a 10 mg/mL, preparada diariamente, calculou-se o volume desta solução a ser adicionado na água de beber correspondente a dose a ser administrada para cada animal.

Com a finalidade de aumentar a estabilidade do KCN em água, adicionou-se 0,05 mL de KOH 1 N em todos os bebedouros. Um estudo conduzido por este laboratório mostrou que esta solução de KCN é estável por até 24 horas após seu preparo (SOUSA et al., 2002). O consumo de água foi verificado diariamente e a

partir da estimativa da quantidade de água a ser ingerida por estes animais, oferecia-se sempre o dobro deste volume, para evitar a privação de água, caso ocorresse, por algum motivo, o aumento do consumo hídrico.

A pesagem dos animais foi realizada em diferentes dias, de acordo com o delineamento experimental, para a correção da quantidade de KCN ou KSCN a ser adicionada na água de bebida.

3.3.3.2 Administração por Gavage

Nos estudos de cinética de transformação do cianeto em tiocianato, conforme descrito no item 3.4.2, utilizou-se o método de gavage que consistiu na administração da solução de KCN, para os grupos experimentais, ou somente água destilada, para os grupos controles, através de uma cânula, que foi introduzida até o estômago do animal, administrando-se o líquido em um volume nunca superior a 1 ml.

3.3.4 Avaliação do Ganho de Peso

Os animais dos grupos experimentais e controle foram pesados em balança semi analítica, em horários e frequências estabelecidas de acordo com o delineamento experimental.

3.3.5 Quantificação da Produção de Leite de Ratas

A quantificação da produção de leite de ratas baseou-se nas técnicas propostas por Otha (2002) e Pavelka et al. (2002), com algumas modificações, como descrita a seguir: no 13º dia da lactação (21:00 h), as mães foram separadas de suas ninhadas por 10 h. Após este período, no 14º dia da lactação, as mães e os filhotes foram pesados. Em seguida, colocou-se as ninhadas com suas respectivas mães, permitindo-se que os filhotes mamassem por 60 minutos. Imediatamente, as mães e suas respectivas ninhadas foram pesadas. A diferença de peso das mães e das ninhadas, antes e após a mamada, permitiu calcular a quantidade de leite, em gramas, produzida no período de 10 h.

3.3.6 Coleta de Leite para a Quantificação de Tiocianato

A coleta de leite de ratas baseou-se na técnica proposta por Benes et al. (2002), com algumas modificações, como descrita a seguir: no período da manhã, os filhotes das mães dos grupos experimentais e controle foram separados de suas progenitoras por 6 horas. Decorrido este tempo, as lactantes receberam, por via intraperitoneal, 2 UI de ocitocina. Após 20 minutos desta administração, retirou-se o leite adaptando o teto em um tubo cônico de plástico que por sua vez foi conectado

em uma bomba a vácuo. As amostras de leite foram acondicionadas em tubos plásticos, previamente identificados, e congeladas a -20°C até o processamento para a quantificação de tiocianato, o qual foi realizado dentro de um período nunca superior a 15 dias.

3.3.7 Cesariana

De acordo com o delineamento experimental realizou-se a técnica cirúrgica cesariana, após 8 h de jejum. As ratas prenhes foram anestesiadas por inalação com éter etílico e, em seguida, procedeu-se a laparotomia exploratória, com exposição dos cornos uterinos, para a contagem de pontos de implantações, de reabsorção e de fetos vivos e mortos. Os ovários foram retirados e, com o auxílio de uma lupa (16/12 x 1,25), foram contados o número de corpos lúteos para avaliação da quantidade de óvulos eliminados. Para melhor visualização dos pontos de implantação, mergulhou-se o útero em solução de sulfeto de amônio a 25% por 10 minutos e em seguida, lavou-se o útero em água corrente, tendo os pontos de implantação corados de preto.

As perdas embrionárias, no período de pré-implantação e no período de pós-implantação, foram calculadas por meio da seguinte proporção:

$$\% \text{ perda pré-implantação} = (CL - IM) \times 100 / CL$$

$$\% \text{ perda pós-implantação} = (IM - FV) \times 100 / IM$$

onde:

CL = número de corpos lúteos;

IM = número de implantações;

FV = número de fetos vivos.

3.3.8 Coleta de Sangue

Para a coleta de sangue, os ratos foram anestesiados em cuba com éter, fixados em decúbito dorsal em uma prancha de parafina e realizou-se um corte longitudinal, desde a região pélvica até a cartilagem xifóide, coletando-se em seguida o sangue da veia hepática em seringas descartáveis não heparinizadas. Após este procedimento, este material biológico foi centrifugado por 15 minutos a 5.000 rpm em centrífugadora refrigerada e o sobrenadante, o soro, acondicionado individualmente em tubos plásticos devidamente identificados e estocados em *freezer* a -20 °C até o processamento.

3.3.9 Coleta de Líquido Amniótico

Para a coleta de líquido amniótico, as ratas prenhes foram anestesiadas em cuba com éter, fixadas em decúbito dorsal em uma prancha de parafina e realizou-se um corte longitudinal, desde a região pélvica até a cartilagem xifóide, coletando-se em seguida o líquido amniótico de vários sacos embrionários até obter 3 mL deste meio biológico. Após este procedimento, o líquido amniótico foi

acondicionado individualmente em tubos plásticos devidamente identificados e estocados em *freezer* a -20 °C até o processamento.

3.3.10 Dosagem

Para a execução dos diversos experimentos realizou-se os procedimentos de dosagem das diversas substâncias, conforme descrição abaixo.

3.3.10.1 Dosagem Bioquímica

As atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e os níveis séricos da uréia, creatinina, glicose e colesterol dos animais experimentais e controle foram dosados por meio de sistema automatizado, utilizando o aparelho CELM SBA-200.

3.3.10.2 Dosagem de Tiocianato no Soro, Líquido Amniótico e Leite Materno de Ratas

Em um tubo de ensaio, pipetou-se 0,2 mL de soro, líquido amniótico ou

leite materno e 1,8 mL de solução de ácido tricloroacético a 10%. Logo após a homogeneização, este material foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. Posteriormente, pipetou-se 0,5 mL do sobrenadante em outro tubo de ensaio e adicionou-se, com agitação mecânica: 0,25 mL de HCl 1 M; 0,05 mL de água de bromo saturada; 0,10 mL de solução de trióxido de arsênio e por último 0,90 mL da mistura de piridina-pFDA. Após 15 minutos, 0,20 mL da solução obtida foi transferida para placas de fundo chato (Corning-Costar®) com 96 poços e realizou-se a leitura no aparelho Multiskan MCC340 (Titertek®) com filtro de 540 nm contra o branco de reativo.

3.3.11 Análise dos Fetos no 20º Dia de Gestação: Avaliação de Malformações Viscerais e Ósseas

Após a cesariana, os fetos foram contados no útero e, marcadas suas posições. Em seguida, o útero foi extraído inteiro e pesado. Posteriormente, os filhotes foram retirados do útero e examinados. Logo após, os fetos e suas respectivas placentas, após secagem em papel toalha, foram pesados individualmente e os filhotes diferenciados quanto ao sexo. Ainda, foram medidos em cm, desde o crânio até o início da cauda.

Após o procedimento acima descrito, realizou-se a análise visceral sendo que 4 fetos, 2 machos e 2 fêmeas, de cada ninhada foram colocados em 220 mL da solução de Harrison para fixação das estruturas viscerais e descalcificação dos ossos por um período de 4 dias. Os frascos foram tampados e identificados. Em

seguida, os fetos foram colocados em álcool 80° por 2 dias e, posteriormente, em álcool 90° por no mínimo 4 dias até a leitura. Empregou-se o método de seções seriadas de Wilson (1965) para análise de malformações e anomalias internas.

Para a análise óssea, 4 filhotes de cada ninhada, foram colocados em acetona, permanecendo nesta solução por uma noite. No dia seguinte o palato de cada animal foi examinado e procedeu-se a evisceração. Em seguida, foi realizado o procedimento de diafanização que consistiu em colocar os fetos em uma solução de KOH 0,8%, preparada diariamente com água destilada e alizarina, conforme o método proposto por Staples e Schenell (1964), e trocou-se diariamente esta solução por 4 dias. Posteriormente, os fetos foram conservados em solução clareadora até o dia da análise esquelética, segundo Taylor (1986). O restante dos fetos foram submetidos à eutanásia, colocando-os em cuba com éter por tempo prolongado.

3.3.12 Exame Anátomo – Histológico

Após a retirada do sangue, 3 animais de cada grupo, foram submetidos à eutanásia, colocando estes animais em tempo prolongado em cuba com éter e, em seguida, foi realizada a necropsia. Após a inspeção macroscópica, foram retirados fragmentos representativos de fígado, pâncreas, baço, rins, tireóides, pulmões e sistema nervoso central. Em seguida, os fragmentos foram conservados em formol a 10%, até o momento do processamento. Depois deste procedimento, todos os fragmentos foram incluídos em parafina, realizando-se cortes histológicos de 5 mcm

de espessura e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE), para análise de possíveis lesões microscópicas.

No final do Experimento 3.4.4, também foram coletados e pesados o encéfalo e o cerebelo de 4 filhotes: 2 machos e 2 fêmeas de cada ninhada.

A intensidade das lesões observadas pelo estudo histopatológico dos diversos experimentos, foi caracterizada por meio de escores, a saber: (-) sem lesão; (+) lesões leves, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas.

3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização dos diversos experimentos, estes foram delineados conforme descrição abaixo.

3.4.1 Experimento 1: Validação da Metodologia para a Determinação de Tiocianato, por Espectrofotometria, em Soro, Leite e Líquido Amniótico de Ratos

A determinação dos níveis de tiocianato no soro, leite e líquido amniótico de ratos foi realizada de acordo com o método de Pettigrew e Fell (1972), modificado por este laboratório. A 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. Para isto, foram preparadas seis soluções de KSCN de concentrações: 25, 50, 75, 100, 200 e 300 mcmol/L, conforme descrito no item 3.2.1. Estas foram processadas 10 vezes cada, conforme descrito no item 3.3.10.2. Em seguida calculou-se a média e o erro-padrão das absorbâncias de cada concentração em estudo. As correlações entre as concentrações de tiocianato nas soluções padrão e os valores das absorbâncias obtidos foram utilizados para a construção da curva de calibração.

Para a determinação da precisão da metodologia intra laboratorial, realizou-se a análise dos níveis de tiocianato, conforme descrito no item 3.3.10.2, da solução padrão de 100 mcmol/L de tiocianato e de um *pool* de amostras de soro, leite e líquido amniótico, por seis vezes cada, em um mesmo dia; e em seguida, em três dias diferentes. Calculou-se o coeficiente de variação ou imprecisão pela fórmula:

$$CV = S \cdot 100 / X$$

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 6 amostras das soluções padrão de 25 e 300 mcmol/L de KSCN e as médias das

absorbâncias de 6 amostras de soro, leite ou líquido amniótico de ratas do grupo controle, contendo as soluções padrão de 25 e 300 $\mu\text{mol/L}$ de KSCN. Estas amostras foram submetidas ao processo analítico, conforme descrito no item 3.3.10.2, contra o branco dos reativos e das amostras dos meios biológicos descritos. Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula:

$$R = X \cdot 100 / Y$$

Onde:

R: porcentagem de recuperação;

X: média da concentração da solução padrão;

Y: média da concentração do meio biológico estudado adicionado do analito.

3.4.2 Experimento 2: Estudo Cinético de Transformação do Cianeto em Tiocianato em Ratas

O estudo cinético de transformação do cianeto em tiocianato, compreendeu os experimentos abaixo descritos.

3.4.2.1 Avaliação em Ratas Fêmeas Virgens na Fase Estrogênica

Para a determinação da cinética de transformação do cianeto em

tiocianato em ratas fêmeas virgens e na fase de estro, foram utilizadas 72 ratas, pesando cerca de 200 g, divididas em 2 grupos iguais: um grupo recebeu o KCN na água de bebida e outro por gavagem. Os animais do estudo na água de bebida receberam, conforme descrito no item 3.3.3.1, 3 mg/kg de KCN, das 20 h até às 8 h do dia seguinte. A partir deste horário, coletou-se sangue destes animais, para a obtenção de soro, conforme descrito no item 3.3.8, nos seguintes tempos: 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN.

Para o estudo por gavagem, ratas fêmeas virgens e na fase de estro receberam, conforme descrito no item 3.3.3.2, 3 mg/kg de KCN, às 8 h, por esta via. Então, coletou-se sangue destes animais, para a obtenção de soro, conforme descrito no item 3.3.8, nos seguintes tempos: 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN.

Os grupos controles receberam somente água potável (tempo = zero). Para cada tempo estudado, na água de bebida e por gavagem, foram utilizadas 6 ratas cujas amostras de sangue foram processadas para a dosagem de tiocianato, conforme descrito no item 3.3.10.2. Todos os animais, experimentais e controle, permaneceram em jejum de 12 h, no estudo por gavagem, ou durante todo o tempo da ingestão hídrica, contendo ou não o KCN, no estudo pela água de bebida.

3.4.2.2 Avaliação na Gestação

Para a determinação da cinética de transformação do cianeto em tiocianato em ratas no 14º dia de gestação, foram utilizadas 72 ratas prenhes,

divididas em 2 grupos iguais: um grupo recebeu o KCN na água de bebida e outro por gavage. Para o estudo na água de bebida, ratas no 13º dia de gestação receberam, conforme descrito no item 3.3.3.1, 3 mg/kg de KCN das 20 h até às 8 h do dia seguinte. A partir deste horário, coletou-se sangue, para a obtenção de soro, e líquido amniótico, conforme descrito nos itens 3.3.8 e 3.3.9, respectivamente, nos seguintes tempos: 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN.

Para o estudo por gavage, ratas no 14º dia de gestação receberam, conforme descrito no item 3.3.3.2, 3 mg/kg de KCN, às 8 h, por esta via. Coletou-se sangue destes animais, para a obtenção de soro, e líquido amniótico, conforme descrito nos itens 3.3.8 e 3.3.9, respectivamente, nos seguintes tempos: 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN.

Os grupos controles receberam somente água potável (tempo = zero). Para cada tempo estudado, na água de bebida e por gavage, foram utilizadas 6 ratas cujas amostras de sangue e líquido amniótico foram processadas para a dosagem de tiocianato, conforme descrito no item 3.3.10.2. Todos os animais, experimentais e controle, permaneceram em jejum de 12 h, no estudo por gavage, ou durante todo o tempo da ingestão hídrica, contendo ou não o KCN, no estudo pela água de bebida.

3.4.2.3 Avaliação na Lactação

Para a determinação da cinética de transformação do cianeto em tiocianato em ratas no 14º dia de lactação, foram utilizadas 72 ratas lactantes,

divididas em 2 grupos iguais: um grupo recebeu o KCN na água de bebida e outro por gavagem. Para o estudo na água de bebida, ratas no 13º dia de lactação foram separadas de seus filhotes no período noturno e receberam, conforme descrito no item 3.3.3.1, 3 mg/kg de KCN das 20 h até às 8 h do dia seguinte. A partir deste horário, coletou-se sangue, para a obtenção de soro, e leite, conforme descrito no itens 3.3.8 e 3.3.6, respectivamente, nos seguintes tempos: 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN.

Para o estudo por gavagem, ratas no 13º dia de lactação foram separadas de seus filhotes no período noturno e receberam no 14º dia de lactação, conforme descrito no item 3.3.3.2, 3 mg/kg de KCN, às 8 h, por esta forma de administração. Coletou-se sangue destes animais, para a obtenção de soro, e leite, conforme descrito nos itens 3.3.8 e 3.3.6, respectivamente, nos seguintes tempos: 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN.

Os grupos controles receberam somente água potável (tempo = zero). Para cada tempo estudado, na água de bebida e por gavagem, foram utilizadas 6 ratas cujas amostras de sangue e leite foram processadas para a dosagem de tiocianato, conforme descrito no item 3.3.10.2. Todos os animais, experimentais e controle, permaneceram em jejum de 12 h, no estudo por gavagem, ou durante todo o tempo da ingestão hídrica, contendo ou não o KCN, no estudo pela água de bebida.

3.4.3 Experimento 3: Efeitos da Administração, em Ratas, de KCN ou KSCN, Durante o Período de Gestação

Para a verificação dos efeitos da administração de KCN ou KSCN em ratas durante o período de prenhez, e nos respectivos fetos, foram utilizadas 70 ratas prenhes divididas em 7 grupos, com 10 animais cada, sendo 6 grupos experimentais que receberam diariamente, do 6º ao 20º dia da prenhez, na água do bebedouro, conforme descrito no item 3.3.3.1, KCN nas doses de 1,0 (FEC1); 3,0 (FEC2) e 30,0 mg/kg/dia (FEC3) ou KSCN nas doses de 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24,0 mg/kg (FES3) e um grupo controle (FC) que recebeu somente água potável.

Durante este período, verificou-se o estado geral dos animais e a ocorrência de abortos. O peso das mães foi verificado nos dias 0, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e o consumo de ração foi verificado nos períodos, em dias, de 6-9, 9-12, 12-15, 15-18 da gestação. Durante o período de gestação, verificou-se o consumo de água das gestantes diariamente.

No 19º dia de prenhez, a ração foi retirada no período noturno, e no 20º dia, pela manhã, as mães foram anestesiadas, realizando-se a cesariana, conforme descrito no item 3.3.7, e a coleta de sangue conforme descrito no item 3.3.8. O sangue foi processado para a realização das dosagens bioquímicas e de tiocianato, conforme descrito nos itens 3.3.10.1 e 3.3.10.2, respectivamente. A seguir, estas ratas foram submetidas à eutanásia para a coleta de material para o estudo histopatológico, conforme descrito no item 3.3.12.

A avaliação fetal de malformações e anomalias viscerais e ósseas foi realizada, conforme descrito no item 3.3.11.

3.4.4 Experimento 4: Efeitos da Administração, em Ratas, de KCN ou KSCN, Durante o Período de Gestação. Avaliação Pós-Natal

Para a verificação dos efeitos em filhotes de ratas expostas ao KCN ou KSCN durante a gestação, foram utilizadas 70 ratas prenhes divididas em 7 grupos, com 10 animais cada, sendo 6 grupos experimentais que receberam diariamente, do 6º ao 20º dia da gestação, na água do bebedouro, conforme descrito no item 3.3.3.1, KCN nas doses de 1,0 (DC1); 3,0 (DC2) e 30,0 mg/kg/dia (DC3) ou KSCN nas doses de 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24,0 mg/kg (DS3) e um grupo controle (DC) que recebeu somente água potável.

Durante este período, verificou-se o estado geral dos animais e a ocorrência de abortos. O peso das mães foi verificado nos dias 0, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 da gestação e o consumo de ração foi verificado nos períodos, em dias, de 6-9, 9-12, 12-15, 15-18, 18-20 da gestação. Durante o período de gestação, verificou-se o consumo de água diariamente.

No dia seguinte ao nascimento dos animais, dia 1, foi realizada a padronização de cada ninhada permanecendo 4 machos e 4 fêmeas para cada progenitora e, caso não fosse possível, foi realizado o *cross fostering* para que esta relação fosse mantida. Em seguida, as ninhadas foram pesadas. Os demais filhotes da ninhada foram submetidos à eutanásia. Durante a lactação, o peso das ninhadas

foi verificado nos dias 1, 7, 14 e 21, deste período.

No 22º dia da lactação, coletou-se amostra de sangue dos filhotes, como descrito no item 3.3.8, para a análise bioquímica e dos níveis séricos de tiocianato, conforme descrito nos itens 3.3.10.1 e 3.3.10.2, respectivamente. Contudo, por ser a amostra de sangue de cada filhote insuficiente para as várias análises bioquímicas, optou-se por formar dois *pools* de amostras de soro de cada ninhada, formando-se um para machos e outro para fêmeas. A coleta de órgãos para análise histopatológica seguiu como descrito no item 3.3.12 e ainda foram coletados e pesados o encéfalo e o cerebelo de 2 filhotes, machos e fêmeas, de cada ninhada.

Em relação às progenitoras no 21º dia da lactação, foi retirada a ração no período noturno, e, no 22º dia, estas foram anestesiadas, realizando-se a coleta de sangue, conforme descrito 3.3.8. Este material foi processado para a realização das dosagens bioquímicas e de tiocianato, conforme descrito nos itens 3.3.10.1 e 3.3.10.2, respectivamente. A seguir, estas ratas foram submetidas à eutanásia para a coleta de material para estudo histopatológico, conforme descrito no item 3.3.12.

3.4.5 Experimento 5: Efeitos da Administração, em Ratas, de KCN ou KSCN, Durante a Lactação

Para a verificação dos efeitos da administração de KCN ou KSCN em ratas e suas respectivas proles, durante o período de lactação, foram utilizadas 70 ratas prenhes, divididas em 7 grupos, com 10 animais cada, sendo 6 grupos experimentais que receberam na água de bebida, do 1º ao 18º dia da lactação,

conforme descrito no item 3.3.3.1, KCN nas doses de 1,0 (FCL1); 3,0 (FCL2) e 30,0 mg/kg/dia (FCL3) ou KSCN nas doses de 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24,0 mg/kg (FSL3) e um grupo controle (LC) que recebeu somente água potável. Durante o período de gestação, verificou-se o estado geral dos animais e a ocorrência de aborto.

No dia seguinte do nascimento, pesou-se as mães, os filhotes foram contados e verificado o sexo, as ninhadas foram pesadas e, em seguida, as mesmas foram homogeneizadas permanecendo 4 filhotes machos e 4 fêmeas para cada mãe e, caso não fosse possível, foi realizado o *cross fostering* para que esta relação fosse mantida. Os demais filhotes da ninhada foram submetidos à eutanásia.

Durante o período de lactação, verificou-se o consumo de água das lactantes diariamente. O consumo de ração das mesmas foi realizado nos dias 4, 8, 12, 16 e 18. O peso das mães e das ninhadas foi verificado nos dias 1, 7, 14 e 18 da lactação.

No 14º dia da lactação, quantificou-se a produção de leite, como descrito no item 3.3.5. No 18º dia da lactação, retirou-se amostras de leite das mães, conforme descrito no item 3.3.6, que foram processadas, conforme descrito no item 3.3.10.2.

No 18º dia de lactação, no período noturno, a ração das mães de todos os grupos foi retirada. No 19º dia de lactação, no período da manhã, estas foram anestesiadas para a coleta de sangue conforme descrito no item 3.3.8. Este material foi processado para a realização das dosagens bioquímicas e de tiocianato, conforme descrito nos itens 3.3.10.1 e 3.3.10.2, respectivamente. A seguir, estas ratas foram submetidas à eutanásia para a coleta de material para estudo histopatológico, conforme descrito no item 3.3.12.

No 18º dia da lactação, coletou-se amostra de sangue dos filhotes, como descrito no item 3.3.8, para a análise bioquímica e dos níveis séricos de tiocianato, como descrito no itens 3.3.10.1 e 3.3.10.2, respectivamente. Contudo, por ser a amostra de sangue de cada filhote insuficiente para as várias análises bioquímicas, optou-se por formar dois *pools* de amostras de soro de cada ninhada, formando-se um para machos e outro para fêmeas. A coleta de órgãos para análise histopatológica seguiu como descrito no item 3.3.12.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Em relação aos dados toxicocinéticos, o pico de concentração máxima (Cmax) do tiocianato nos diferentes meios biológicos estudados e o tempo para atingir este pico (tmax) foram obtidos diretamente dos dados experimentais sem interpolação dos mesmos. A área sob a curva (ASC) foi calculada pelo método dos trapezóides lineares. Todos os outros parâmetros toxicocinéticos foram calculados como descrito por Shargel e Yu (1993).

A avaliação da homocedasticidade dos dados, entre os diferentes grupos, foi realizada pelo teste de Bartlett, diferenciando os dados paramétricos daqueles não paramétricos (SPIEGEL, 1985). Para os dados paramétricos, empregou-se a

análise de variância ANOVA, proposta por Snedecor (1946), seguido pelo teste de Dunnett, para comparação entre os diversos grupos experimentais e o grupo controle; para as múltiplas comparações empregou-se o teste de Tukey, ou ainda, o teste t para comparações entre dois grupos. Para a análise de contingência, foi realizado o teste exato de Fisher.

A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferença significativa entre os grupos. Para a análise estatística, empregou-se o programa GraphPad InStat versão 3.00 para Windows 95 (GRAPHPAD INSTAT, 1998). Para a estatística descritiva, são apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão para os dados paramétricos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

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

A linearidade do procedimento analítico foi testada nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 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 0,9947, a inclinação (*slope*) de $6,347 \times 10^{-4}$ e a interceptação do eixo y em $6,17 \times 10^{-5}$ (figura 1).

A precisão intra laboratorial dos resultados obtidos pela metodologia empregada, expressa pelo coeficiente de variação ou imprecisão (CV) intra e inter dias, foi obtida pela análise dos níveis de tiocianato em amostras do padrão de 100 $\mu\text{mol/L}$ em água e em um *pool* de amostras de soro, leite e líquido amniótico, processados seis vezes cada e em três dias diferentes. O CV variou de 1,2 a 3,7 % intra dia e de 2,6 a 7,2 % inter dias (tabela 1). A recuperação do analito, o tiocianato, pela metodologia empregada, conforme descrito no item 3.4.1, expressa em porcentagem, foi de 99,7 e 97,5; 89,7 e 83,4; 98,0 e 82,1 para os meios biológicos soro, leite e líquido amniótico, adicionados de solução padrão de KSCN nas concentrações de 300 e 25 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (tabela 1).

Figura 1 - Curva de calibração de solução aquosa de tiocianato de potássio (KSCN) nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 200 e 300 mcmol/L

Tabela 1 - Coeficientes de variação (CV), expresso em porcentagem, intra e inter dias obtidos pela análise dos níveis de tiocianato de amostras do padrão de 100 mcmol/L em água e em um *pool* de amostras de soro, leite e líquido amniótico. A recuperação (REC) do método, expressa em porcentagem, determinada por meio da relação obtida entre as absorbâncias de amostras de soluções padrão de tiocianato de potássio (KSCN) e de amostras de soro, leite e líquido amniótico de ratas do grupo controle adicionadas das soluções padrão de KSCN nas concentrações de 25 e 300 mcmol/L

	Padrão de 100 mcmol/L de tiocianato	Soro	Leite	Líquido amniótico
CV intra dia	1,2	1,7	2,1	3,7
CV inter dias	2,6	4,8	3,6	7,2
REC (300 mcmol/L)	-	99,7	89,7	98,0
REC (25 mcmol/L)	-	97,5	83,4	82,1

4.2 EXPERIMENTO 2: ESTUDO CINÉTICO DA TRANSFORMAÇÃO DO CIANETO EM TIOCIANATO EM RATAS

Nenhum dos animais apresentou sinais de intoxicação com a dose administrada de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN), em todos os experimentos do estudo toxicocinético.

A tabela 2 mostra e a figura 2 ilustra o consumo médio de KCN por ratas na fase de estro, no 14º dia de gestação e no 14º dia de lactação que receberam, por via oral, na água de bebida, 3 mg/kg de KCN. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$), no consumo de KCN, nos diversos tempos avaliados, em um mesmo grupo experimental, bem como entre a fase de estro, no 14º dia de gestação e no 14º dia de lactação, em um mesmo horário.

Tabela 2 - Consumo médio de cianeto de potássio (KCN), em mg, de ratas, em diferentes fases fisiológicas: estrogênica, gestação e lactação. As avaliações foram realizadas 0,5; 3; 6; 12 e 24 horas após a suspensão da dieta hídrica, contendo 3 mg/kg de KCN. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais em cada tempo avaliado

	Consumo de KCN (mg)		
	Fases		
Tempo da avaliação (h)	Estro	Gestação	Lactação
0,5	3,10 ± 0,22	3,02 ± 0,48	3,73 ± 0,21
3	2,88 ± 0,23	2,98 ± 0,20	2,85 ± 0,37
6	3,33 ± 0,20	3,40 ± 0,42	3,27 ± 0,43
12	3,13 ± 0,24	3,25 ± 0,35	3,04 ± 0,63
24	3,01 ± 0,17	3,08 ± 0,38	3,22 ± 0,74

4.2.1 Avaliação em Ratas Fêmeas Virgens na Fase Estrogênica

A tabela 3 mostra e a figura 3 ilustra os níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas na fase de estro que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, 3 mg/kg de KCN, e cujas amostras de sangue foram coletadas nos tempos zero e 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN. A análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato. A aplicação do teste de Dunnett revelou que os níveis de tiocianato se elevaram ($p < 0,05$) a partir do tempo 3 h e permaneceram elevados até a última dosagem, 24 horas, por gavage ($F = 48,24$; $df = 5/30$) e água de bebida ($F = 39,98$; $df = 5/30$) quando comparados aos níveis antes da administração de KCN. A concentração máxima (C_{max}), por gavage, ($162,05 \pm 7,45$ mcmol/L) e pela água de bebida ($139,55 \pm 8,35$ mcmol/l) foi observada em 3 e 6 horas (t_{max}), respectivamente.

Ainda, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato comparando-se a gavage à água de bebida. A aplicação do teste t revelou aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato no grupo que recebeu por gavage, nos tempos 3 e 24 h ($F=1,63$; $F=1,05$, respectivamente).

Tabela 3 – Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, na fase estrogênica, que receberam, por via oral, na água de bebida ou por gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado

Tempo da avaliação (h)	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L)	
	Gavage	Água de bebida
0	33,93 ± 3,70	33,93 ± 3,70
0,5	42,70 ± 7,51	45,00 ± 4,10
3,0	162,05 ± 7,45 ^{*, #}	130,10 ± 9,50 [*]
6,0	159,35 ± 10,15 [*]	139,55 ± 8,35 [*]
12,0	140,95 ± 9,55 [*]	138,15 ± 8,45 [*]
24,0	125,00 ± 9,70 ^{*, #}	74,95 ± 9,45 [*]

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

p< 0,05 em relação aos valores da água de bebida, no mesmo tempo de avaliação

Figura 3 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, na fase estrogênica, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavagem, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN)

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

4.2.2 Avaliação na Gestação

A tabela 4 mostra e as figuras 4 e 5 ilustram os níveis de tiocianato sérico e no líquido amniótico (mcmol/L), respectivamente, de ratas no 14^o dia de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, 3 mg/kg de KCN, e cujas amostras de sangue e líquido amniótico foram coletadas nos tempos zero e 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN. A análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato. A aplicação do teste de Dunnett revelou que os níveis de tiocianato se elevaram ($p < 0,05$) a partir do tempo 3 h e permaneceram elevados até a penúltima dosagem, 12 horas, pela gavage ($F = 23,16$; $df = 5/30$) e água de bebida ($F = 3,97$; $df = 5/30$) quando comparados aos níveis antes da administração de KCN.

A concentração máxima (C_{max}), por gavage, ($119,87 \pm 4,30$ mcmol/L), e pela água de bebida ($78,45 \pm 10,39$ mcmol/L) foi observada em 3 e 6 horas (t_{max}), respectivamente. Ainda, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato, comparando-se a gavage à água de bebida. A aplicação do teste t revelou aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato no grupo que recebeu por gavage nos tempos 3 e 6 h ($F=3,98$; $F=2,70$, respectivamente).

Em relação ao líquido amniótico, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis de tiocianato neste meio biológico. A aplicação do teste de Dunnett revelou que o nível de tiocianato se elevou ($p < 0,05$)

no tempo 3 h, por gavage ($F = 6,37$; $df = 5/30$). A C_{max} pela gavage ($48,07 \pm 5,31$ $\mu\text{mol/L}$) foi observada 3 horas após a administração do KCN. Ainda, a análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p > 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato pela água de bebida e também comparando-se a gavage à água de bebida.

Tabela 4 – Níveis séricos e no líquido amniótico de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado

	Níveis séricos de tiocianato		Níveis no líquido amniótico de tiocianato	
	(mcmol/L)		(mcmol/L)	
Tempo da avaliação (h)	Gavage	Água de bebida	Gavage	Água de bebida
0	31,97 ± 7,24	31,97 ± 7,24	26,16 ± 1,94	26,16 ± 1,94
0,5	43,18 ± 6,88	36,93 ± 4,39	35,26 ± 3,23	28,61 ± 4,15
3	119,87 ± 4,30* [#]	62,84 ± 8,58*	48,07 ± 5,31*	32,65 ± 4,97
6	111,86 ± 6,32* [#]	78,45 ± 10,39*	27,60 ± 2,00	28,71 ± 3,04
12	70,90 ± 8,16*	66,12 ± 4,60*	27,30 ± 3,26	26,08 ± 2,00
24	50,07 ± 11,28	49,12 ± 11,30	28,27 ± 3,23	27,34 ± 3,96

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

[#] p< 0,05 em relação aos valores da água de bebida, no mesmo tempo e meio biológico avaliado

Figura 4 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN)

*p<0,05 em relação aos dados antes da administração do KCN

4.2.3 Avaliação na Lactação

A tabela 5 mostra e as figuras 6 e 7 ilustram os níveis séricos e lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas lactantes, no 14º dia da lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, 3 mg/kg de KCN, e cujas amostras de sangue e leite foram coletadas nos tempos zero e 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN. A análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato. A aplicação do teste de Dunnett revelou que os níveis de tiocianato se elevaram ($p < 0,05$) a partir do tempo 3 h e permaneceram elevados até a última dosagem, 24 horas, pela gavage ($F = 90,08$; $df = 5/30$) e pela água de bebida ($F = 60,97$; $df = 5/30$) quando comparados aos níveis antes da administração de KCN. A C_{max} pela gavage ($145,41 \pm 6,02$ mcmol), e pela água de bebida ($118,26 \pm 5,23$ mcmol) foi observada 6 e 12 horas após a administração do KCN, respectivamente. Ainda, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato comparando-se a gavage à água de bebida. A aplicação do teste t revelou aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato no grupo que recebeu KCN por gavage, nos tempos 3h e 6 h ($F=3,13$; $F=1,83$, respectivamente).

Em relação aos níveis lácteos, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis de tiocianato neste meio biológico. A aplicação do teste de Dunnett revelou que os níveis de tiocianato se elevaram de forma significativa ($p < 0,05$) a partir do tempo 0,5 h e permaneceram elevados até a

última dosagem, 24 horas, tanto pela água de bebida quanto pela gavagem ($F = 33,68$; $F = 142,57$ respectivamente; $df = 5/30$) quando comparados aos níveis antes da administração de KCN. Ainda, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis lácteos de tiocianato comparando-se a gavagem à água de bebida. A aplicação do teste t revelou aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis lácteos de tiocianato no grupo que recebeu pela água de bebida no tempo de 12 h ($F = 1,27$).

Tabela 5 – Níveis séricos e lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia da lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado

Tempo da avaliação (h)	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L)		Níveis lácteos de tiocianato (mcmol/L)	
	Gavage	Água de bebida	Gavage	Água de bebida
0	31,20 ± 2,21	31,20 ± 2,21	48,20 ± 2,20	48,20 ± 2,20
0,5	45,36 ± 3,25	38,80 ± 3,33	119,63 ± 6,57*	112,80 ± 2,20*
3	119,37 ± 5,27*; [#]	54,00 ± 2,98*	148,98 ± 8,26*	149,30 ± 3,32*
6	145,41 ± 6,02*; [#]	64,00 ± 4,45*	129,57 ± 5,25*	143,00 ± 4,45*
12	121,59 ± 5,98*	118,26 ± 5,23*	130,00 ± 4,78*	148,90 ± 4,25*; [@]
24	64,89 ± 5,58*	63,00 ± 4,57*	118,54 ± 7,08*	115,67 ± 2,03*

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

[#] p< 0,05 em relação aos valores da água de bebida, no mesmo tempo e meio biológico avaliado

[@] p<0,05 em relação aos valores da gavagem, no mesmo tempo e meio biológico avaliado

Figura 6 – Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia da lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavagem, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN)

* $p < 0,05$ em relação aos dados obtidos antes da administração do KCN

Figura 7 – Níveis lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas, no 14º dia da lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavagem, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN)

* $p < 0,05$ em relação aos dados obtidos antes da administração do KCN

A tabela 6 mostra e a figura 8 ilustra os níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas na fase de estro, no 14º dia de gestação e no 14º dia da lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavagem, 3 mg/kg de KCN, e cujas amostras de sangue foram coletadas nos tempos zero e 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN. A análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato. A aplicação do teste de Tukey-Kramer revelou que os níveis de tiocianato, na forma de gavagem, foram superiores ($p < 0,05$) nos tempos 3, 6, 12 e 24 h na fase de estro em relação às gestantes ($F = 17,69$; $F = 9,98$; $F = 20,28$; $F = 20,18$; respectivamente; $df = 2/15$) e em relação às lactentes nos tempos 3 e 24 h ($F = 17,69$; $F = 20,18$; respectivamente; $df = 2/15$). As lactantes apresentaram níveis séricos superiores ($p < 0,05$) em relação às gestantes nos tempos 6 e 12 h ($F = 9,98$; $F = 20,28$; respectivamente; $df = 2/15$).

Em relação ao grupo que recebeu KCN pela água de bebida, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato. A aplicação do teste de Tukey-Kramer revelou que os níveis de tiocianato foram superiores ($p < 0,05$) nos tempos 3, 6 e 12 h, na fase de estro em relação às gestantes ($F = 30,08$; $F = 24,43$; $F = 34,62$; respectivamente; $df = 2/15$) e em relação às lactantes nos tempos 3 e 6 h ($F = 30,08$; $F = 24,43$; respectivamente; $df = 2/15$). As lactantes apresentaram níveis séricos superiores em relação às gestantes ($p < 0,05$) no tempo 12 h ($F = 34,62$; $df = 2/15$).

A tabela 7 mostra os parâmetros toxicocinéticos de ratas, calculados para o tiocianato nos diferentes grupos estudados: na fase de estro, no 14º dia de gestação e no 14º dia da lactação. Estes animais receberam, por via oral, na água

de bebida ou gavagem, 3 mg/kg de KCN, e cujas amostras de sangue foram coletadas nos tempos zero e 30 minutos, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de KCN.

Os valores da C_{max} de tiocianato, em $\mu\text{mol/L}$, foram inferiores pela água de bebida, nos experimentos em que ratas estavam na fase de estro (139,55), na gestação (78,45) e na lactação (118,26) em relação à gavagem: estro (162,05), gestação (119,78) e lactação (145,00).

Os valores do tempo para atingir a C_{max} (t_{max}), em horas, foram superiores, pela água de bebida, nos experimentos em que ratas estavam na fase de estro (6), gestação (6) e lactação (12) em relação à gavagem: estro (3), gestação (3) e lactação (6).

Os valores da área sob a curva (ASC), em $\mu\text{mol.h/L}$, foram inferiores, pela água de bebida, nos experimentos em que ratas estavam na fase de estro (2393,43), gestação (1485,31) e lactação (1944,84) em relação à gavagem: estro (3257,39), gestação (1844,30) e lactação (2540,77).

Os valores da constante de eliminação (K_{el}), em h^{-1} , foram superiores, pela água de bebida, nos experimentos em que ratas estavam na fase de estro (0,030), gestação (0,040) e lactação (0,055) em relação à gavagem: estro (0,010), gestação (0,010) e lactação (0,045).

O valor do *clearance* (Cl), em $\text{L.kg} / \text{h}$, foi superior, pela água de bebida, no experimento em que ratas estavam na fase de estro (0,02) em relação à gavagem (0,01), e iguais nos experimentos da gestação e da lactação (0,01).

Os valores da meia vida de eliminação ($t_{1/2 \beta}$), em horas, foram inferiores, pela água de bebida, nos experimentos em que ratas estavam na fase de estro (23,10), gestação (16,62) e lactação (12,60) em relação à gavagem: estro (49,50), gestação (69,3) e lactação (15,40).

O valor do volume aparente de distribuição (V_d), em L/kg, foi inferior, pela água de bebida, nos experimentos em que ratas estavam na fase de estro (0,64), gestação (0,25) e lactação (0,18) em relação à gavagem: estro e gestação (1,00) e lactação (0,22).

Tabela 6 – Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L), de ratas, em diferentes fases fisiológicas: estrogênica, gestação e lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). As avaliações foram realizadas 0,5; 3; 6; 12 e 24 horas após a suspensão da dieta hídrica, contendo 3 mg/kg de KCN. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 6 animais por tempo avaliado

Tempo da avaliação (h)	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) Estro		Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) Gestação		Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) Lactação	
	Gavage	Água de bebida	Gavage	Água de bebida	Gavage	Água de bebida
0	33,93 ± 3,70	33,93 ± 3,70	31,97 ± 7,24	31,97 ± 7,24	31,20 ± 2,21	31,20 ± 2,21
0,5	42,70 ± 7,51	45,00 ± 4,10	43,18 ± 6,88	36,93 ± 4,39	45,36 ± 3,25	38,80 ± 3,33
3	162,05 ± 7,45*; [#]	130,10 ± 9,50*; [#]	119,87 ± 4,30	62,84 ± 8,58	119,37 ± 5,27	54,00 ± 2,98
6	159,35 ± 10,15*	139,55 ± 8,35*; [#]	111,86 ± 6,32	78,45 ± 10,39	145,41 ± 6,02*	64,00 ± 4,45
12	140,95 ± 9,55*	138,15 ± 8,45*	70,90 ± 8,16	66,12 ± 4,60	121,59 ± 5,98*	118,26 ± 5,23*
24	125,00 ± 9,70*; [#]	74,95 ± 9,45	50,07 ± 11,28	49,12 ± 11,30	64,89 ± 5,58	63,00 ± 4,57

*p< 0,05 em relação ao grupo de ratas gestantes, pela mesma forma de administração

[#]p< 0,05 em relação ao grupo de ratas lactantes, pela mesma forma de administração

Figura 8 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L), de ratas, em diferentes fases fisiológicas: estrogênica, gestação e lactação, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN). As avaliações foram realizadas 0,5; 3; 6; 12 e 24 horas após a suspensão da dieta hídrica, contendo 3 mg/kg de KCN

Tabela 7 – Dados dos estudos toxicocinéticos do tiocianato em ratos, nas diferentes fases fisiológicas: estrogênica, gestacional e lactacional, que receberam, por via oral, na água de bebida ou gavage, a dose de 3 mg/kg de cianeto de potássio (KCN) (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). Foram utilizados 6 animais por grupo

Parâmetros	Fases					
	Estro		Gestação		Lactação	
	Água de bebida	Gavage	Água de bebida	Gavage	Água de bebida	Gavage
Cmax (mcmol/L)	139,55	162,05	78,45	119,87	118,26	145,00
tmax (h)	6	3	6	3	12	6
ASC _{0-24h} (mcmol.h/L)	2393,43	3257,39	1485,31	1844,30	1944,84	2540,77
Kel (h ⁻¹)	0,030	0,010	0,040	0,010	0,055	0,045
Cl (L . kg/h)	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
t1/2β (h)	23,10	49,50	16,62	69,30	12,60	15,40
Vd (L/kg)	0,64	1,00	0,25	1,00	0,18	0,22

4.3 EXPERIMENTO 3: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO, EM RATAS, DE KCN OU KSCN, DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

As tabelas 8 e 9 mostram o peso médio e o ganho médio de peso (g) corpóreo, respectivamente, de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 10 mostra o consumo médio de ração (g), nos diversos períodos avaliados, de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 11 mostra o consumo médio diário de água (mL) de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 12 mostra e as figuras 9 e 10 ilustram o consumo médio de KCN

ou KSCN (mg) de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) no consumo das substâncias estudadas nos diversos dias analisados, em um mesmo grupo experimental.

A tabela 13 mostra o desempenho reprodutivo de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle em relação aos seguintes parâmetros: peso médio materno no 20º dia de gestação, peso médio do útero gravídico, peso materno sem o útero, peso médio das placentas, peso dos fetos e das ninhadas, número de fetos vivos e mortos, sexo, comprimento dos fetos, número de corpos lúteos, número de implantações e reabsorções. Entretanto, houve maior porcentagem de perda pós-implantação nos grupos que receberam 3 e 30 mg de KCN, com 15,43% e 18,28%, respectivamente, em comparação ao grupo controle, com 8,08%.

A tabela 14 mostra e as figuras 11 e 12 ilustram os resultados das dosagens bioquímicas de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) na concentração sérica de glicose, e na atividade da enzima AST no grupo que recebeu a dose de 30 mg/kg/dia de KCN ($F=5,09$; $F=2,22$, respectivamente, $df=6/63$, $p<0,05$). A aplicação do teste de

Dunnett revelou aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis séricos de glicose e na atividade da enzima AST dos animais do grupo acima descrito em relação ao grupo controle. Em relação às concentrações de colesterol, uréia, creatinina e das atividades das enzimas ALT e FA, a análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p > 0,05$) nos diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 15 mostra e a figura 13 ilustra os níveis séricos de tiocianato de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p < 0,05$) nas concentrações séricas de tiocianato em todos os grupos experimentais em comparação ao grupo controle. A aplicação do teste de Dunnett revelou aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis séricos de tiocianato dos animais dos grupos experimentais em relação ao grupo controle ($F=70,19$; $df = 6/63$, $p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), segundo o teste estatístico de Tukey, comparando-se os grupos que receberam 1 e 0,8; 3 e 2,4; e 30 e 24 mg/kg/dia de KCN e KSCN, respectivamente.

A tabela 16 mostra a incidência de anomalias e malformações ósseas em fetos de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. O teste exato de Fischer revelou não haver diferenças significantes entre os diversos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle ($p > 0,05$).

A tabela 17 mostra a avaliação do grau de desenvolvimento fetal, medido pelo número dos centros de ossificação, de ratas gestantes que receberam, por via

oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 18 mostra a incidência de anomalias e malformações viscerais na prole de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. Os resultados mostraram que não foram verificadas malformações viscerais em nenhum grupo do estudo. Com relação às anomalias viscerais, o teste exato de Fischer revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) no número de fetos afetados no grupo experimental que recebeu a maior dose de KCN, 30 mg/kg/dia, em relação ao grupo controle. Entretanto, não houve aumento significativo no número de ninhadas afetadas.

A tabela 19 mostra a intensidade das lesões histológicas observadas em ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período. A intensidade das lesões foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. A seguir, estão descritas as lesões encontradas.

As figuras 14 A e 14 B mostram fotomicrografia do corte histológico de rim de rata gestante que recebeu, por via oral, na água de bebida, a dose de 24 mg/kg/dia de KSCN. O estudo histopatológico revelou congestão e hemorragia renal, e nefrose. A figura 15 mostra fotomicrografia do corte histológico de rim de rata gestante que recebeu, por via oral, na água de bebida, a dose de 30 mg/kg/dia de KCN. O estudo histopatológico revelou hemorragia e hemossiderose no tecido renal.

A congestão renal também foi verificada nos grupos que receberam 1 e 3 mg/kg/dia de KCN e 2,4 mg/kg/dia de KSCN de forma branda e de forma moderada no grupo que recebeu 30 mg/kg/dia de KCN e 24 mg/kg/dia de KSCN. No grupo controle e naquele que recebeu 0,8 mg/kg/dia de KSCN, não foram observadas alterações histológicas dignas de nota.

A figura 16 mostra fotomicrografia do corte histológico de fígado de rata gestante que recebeu, por via oral, na água de bebida, a dose de 24 mg/kg/dia de KSCN. O estudo histopatológico revelou congestão hepática, vacuolização de hepatócitos e proliferação dos ductos biliares. A figura 17 mostra fotomicrografia do corte histológico de fígado de rata gestante que recebeu, por via oral, na água de bebida, a dose de 30 mg/kg/dia de KCN. O estudo histopatológico revelou congestão e vacuolização de hepatócitos. Nos grupos que receberam a dose de 1 e 3 mg/kg/dia de KCN e 2,4 mg/kg/dia de KSCN observou-se congestão hepática de forma branda; no grupo que recebeu 3 mg/kg/dia de KCN, verificou-se também vacuolização de hepatócitos de forma branda. Nos grupos controle e aquele que recebeu a menor dose de KSCN, 0,8 mg/kg/dia, não foram observadas alterações histológicas dignas de nota.

As figuras 18 A, 18 B e 18 C mostram fotomicrografia do corte histológico do SNC de ratas gestantes que receberam, por via oral, na água de bebida, a dose de 30 mg/kg/dia de KCN. O estudo histopatológico revelou congestão e áreas hemorrágicas, neuronofagia, gliose difusa e necrose. A figura 19 mostra fotomicrografia do corte histológico do SNC de rata gestante que recebeu, por via oral, na água de bebida, a dose de 24 mg/kg/dia de KSCN. O estudo histopatológico revelou congestão, vacuolização discreta em substância branca do cerebelo. No grupo que recebeu 3 mg/kg/dia de KCN, verificou-se congestão e no grupo que

recebeu 2,4 mg/kg/dia de KSCN, gliose neste tecido. No grupo controle e nos grupos que receberam a menor dose de KCN, 1,0 mg/kg/dia, e KSCN, 0,8 mg/kg/dia, não foram observadas alterações histológicas dignas de nota.

A figura 20 mostra fotomicrografia do corte histológico de tireóide de rata gestante que recebeu, por via oral, na água de bebida, a dose de 30 mg/kg/dia de KCN. O estudo histopatológico deste órgão revelou grande aumento na quantidade de vacúolos de reabsorção no colóide dos folículos tireoidianos. Nos animais dos demais grupos experimentais, estas alterações também foram encontradas de forma dose dependente. No grupo controle não foram observadas alterações histológicas dignas de nota.

A figura 21 mostra fotomicrografia do corte histológico de pâncreas de rata gestante que recebeu, por via oral, na água de bebida, a dose de 30 mg/kg/dia de KCN e a figura 22 mostra fotomicrografia do corte histológico de pâncreas de rata gestante do grupo controle, para comparação. O estudo histopatológico deste órgão revelou perda de células nas ilhotas de Langerhans. Nos demais grupos experimentais e no grupo controle, não foram observadas alterações histológicas dignas de nota.

O estudo histopatológico do baço e dos pulmões dos grupos experimentais e controle não revelou alteração significativa nestes órgãos.

Tabela 8 – Peso médio corpóreo (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	Controle	FEC 1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
0	232,11 ± 6,52	228,60 ± 7,31	225,80 ± 7,31	224,13 ± 6,41	230,80 ± 6,19	234,11 ± 5,63	226,00 ± 8,30
6	241,56 ± 6,37	238,70 ± 7,95	235,70 ± 8,71	234,13 ± 7,28	240,10 ± 7,37	245,22 ± 6,45	236,44 ± 8,47
8	242,22 ± 6,18	242,00 ± 8,60	239,90 ± 8,90	236,25 ± 7,07	241,50 ± 7,84	247,44 ± 7,35	237,44 ± 8,44
10	249,22 ± 7,77	248,30 ± 8,28	244,00 ± 9,11	241,75 ± 7,56	244,60 ± 8,67	251,78 ± 7,83	241,56 ± 8,15
12	255,33 ± 7,51	253,40 ± 8,50	249,40 ± 9,74	248,38 ± 7,62	253,70 ± 8,63	256,44 ± 6,62	246,33 ± 7,66
14	257,22 ± 7,90	258,20 ± 8,18	254,20 ± 8,57	254,75 ± 7,65	259,80 ± 9,29	263,33 ± 8,41	256,56 ± 8,53
16	271,44 ± 8,60	269,90 ± 8,59	265,10 ± 8,40	267,13 ± 8,06	268,70 ± 8,45	272,67 ± 10,10	264,78 ± 8,18
18	289,00 ± 9,62	287,60 ± 9,14	280,40 ± 9,01	283,75 ± 8,35	284,90 ± 9,63	291,11 ± 11,84	281,22 ± 8,71
20	307,00 ± 12,17	300,10 ± 11,34	296,70 ± 12,31	300,38 ± 10,15	295,70 ± 9,66	307,11 ± 10,78	295,00 ± 9,31

Tabela 9 – Ganho médio de peso corpóreo (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Período da avaliação	Controle	FEC 1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
00 H 06	9,00 ± 1,70	10,10 ± 1,93	9,90 ± 2,65	10,00 ± 1,63	9,30 ± 2,01	11,11 ± 1,79	10,44 ± 1,17
06 H 14	19,22 ± 2,63	19,50 ± 1,62	18,50 ± 1,40	20,00 ± 1,55	19,70 ± 2,89	17,78 ± 3,12	18,67 ± 1,26
14 H 20	46,67 ± 5,59	41,90 ± 7,76	42,50 ± 5,36	46,25 ± 4,68	35,90 ± 3,80	44,11 ± 3,48	39,89 ± 2,03
00 H 20	74,89 ± 8,38	71,50 ± 7,12	70,90 ± 8,06	76,25 ± 5,84	64,90 ± 5,63	73,00 ± 6,88	69,00 ± 3,39

Tabela 10 - Consumo médio de ração (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Período da avaliação	Controle	FEC1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
06 H 09	60,33 ± 4,26	58,70 ± 2,63	49,60 ± 2,73	49,00 ± 3,20	45,50 ± 4,73	50,11 ± 3,41	51,89 ± 4,32
09 H 12	56,33 ± 1,53	57,80 ± 2,02	55,30 ± 2,48	58,25 ± 2,48	58,90 ± 3,51	59,89 ± 2,19	59,11 ± 3,84
12 H 15	65,44 ± 3,10	64,00 ± 2,39	60,10 ± 2,28	61,38 ± 3,00	68,90 ± 6,57	67,22 ± 2,74	64,67 ± 2,68
15 H 18	68,33 ± 4,58	71,00 ± 3,65	71,20 ± 3,18	70,00 ± 2,99	63,80 ± 5,65	67,78 ± 6,13	73,33 ± 4,45
06 H 18	60,76 ± 2,39	59,58 ± 2,24	58,90 ± 2,82	60,40 ± 3,15	57,66 ± 2,55	60,04 ± 2,34	59,44 ± 2,60

Tabela 11 - Consumo médio diário de água (mL) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	Controle	FEC 1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
7	33,33 ± 4,09	37,00 ± 5,22	30,70 ± 3,02	28,50 ± 4,20	29,00 ± 2,19	31,22 ± 2,41	32,10 ± 4,90
8	33,56 ± 4,24	30,90 ± 5,10	28,50 ± 2,78	24,50 ± 1,35	29,80 ± 3,19	32,78 ± 3,57	29,70 ± 4,81
9	32,44 ± 2,80	37,20 ± 7,03	28,40 ± 2,38	26,63 ± 1,40	33,20 ± 4,77	36,11 ± 3,63	29,90 ± 4,06
10	38,89 ± 3,39	41,00 ± 6,74	29,80 ± 1,24	31,00 ± 4,04	34,80 ± 3,84	35,22 ± 3,22	27,90 ± 3,56
11	37,11 ± 2,71	41,20 ± 8,32	38,20 ± 3,17	32,63 ± 2,66	41,10 ± 3,13	47,22 ± 7,28	32,80 ± 5,14
12	41,11 ± 3,94	39,10 ± 3,35	43,60 ± 4,75	33,63 ± 3,76	46,30 ± 6,34	44,78 ± 4,54	39,20 ± 7,04
13	47,33 ± 3,63	45,00 ± 7,50	44,40 ± 5,14	26,50 ± 2,40	52,30 ± 9,49	47,67 ± 5,39	33,20 ± 4,94
14	42,33 ± 3,13	44,70 ± 5,16	42,50 ± 3,28	32,13 ± 1,55	44,50 ± 5,90	52,22 ± 6,52	42,30 ± 7,74
15	49,78 ± 6,15	50,00 ± 5,11	50,20 ± 4,24	36,50 ± 2,84	45,90 ± 4,80	51,89 ± 6,27	55,80 ± 11,11
16	51,22 ± 4,19	55,60 ± 5,94	50,30 ± 5,93	41,25 ± 3,91	51,20 ± 7,26	51,33 ± 5,04	45,20 ± 6,33
17	48,22 ± 4,50	53,50 ± 5,62	49,90 ± 3,14	40,25 ± 4,26	51,40 ± 3,89	61,00 ± 10,29	52,90 ± 8,84
18	47,44 ± 3,53	54,10 ± 9,62	49,20 ± 4,26	43,63 ± 3,85	55,80 ± 4,43	68,33 ± 10,45	56,20 ± 9,45
19	49,78 ± 4,08	49,10 ± 5,05	57,80 ± 8,87	46,13 ± 4,72	51,60 ± 4,34	52,33 ± 3,05	55,10 ± 9,34
20	36,33 ± 5,29	41,50 ± 5,27	39,10 ± 8,19	40,63 ± 5,10	32,10 ± 4,79	32,51 ± 3,60	38,30 ± 6,20

Tabela 12 – Consumo médio diário de cianeto de potássio (KCN) ou tiocianato de potássio (KSCN) (mg) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	FEC 1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
7	1,11 ± 0,12	3,82 ± 0,28	33,72 ± 3,21	0,81 ± 0,09	2,60 ± 0,18	30,90 ± 3,41
8	0,89 ± 0,13	2,80 ± 0,20	29,45 ± 3,33	0,84 ± 0,09	2,55 ± 0,25	22,98 ± 1,95
9	1,33 ± 0,15	3,60 ± 0,32	33,37 ± 2,43	0,93 ± 0,08	2,70 ± 0,20	26,94 ± 3,20
10	1,13 ± 0,14	3,35 ± 0,33	34,84 ± 3,68	0,95 ± 0,09	2,43 ± 0,22	22,65 ± 2,86
11	1,01 ± 0,11	3,88 ± 0,31	33,52 ± 2,84	1,00 ± 0,09	2,13 ± 0,24	28,10 ± 2,32
12	1,10 ± 0,11	3,57 ± 0,32	32,73 ± 3,37	0,88 ± 0,07	2,45 ± 0,22	28,62 ± 2,43
13	1,12 ± 0,09	3,14 ± 0,29	25,29 ± 3,02	0,91 ± 0,09	2,61 ± 0,23	21,83 ± 1,93
14	1,04 ± 0,09	3,04 ± 0,25	39,74 ± 3,67	0,75 ± 0,06	2,62 ± 0,20	30,13 ± 2,02
15	1,18 ± 0,10	3,71 ± 0,25	33,87 ± 1,41	0,86 ± 0,06	2,42 ± 0,21	31,40 ± 1,92
16	1,13 ± 0,09	3,01 ± 0,25	34,44 ± 2,90	0,91 ± 0,09	2,43 ± 0,28	22,25 ± 2,67
17	0,97 ± 0,09	3,20 ± 0,26	30,43 ± 3,37	0,89 ± 0,09	2,76 ± 0,22	28,83 ± 3,18
18	0,98 ± 0,09	2,95 ± 0,28	34,78 ± 3,62	0,88 ± 0,06	2,76 ± 0,19	26,75 ± 3,48
19	0,91 ± 0,11	3,46 ± 0,26	32,33 ± 2,89	0,75 ± 0,08	2,09 ± 0,22	25,35 ± 2,87
20	0,83 ± 0,09	3,42 ± 0,29	26,23 ± 3,50	0,88 ± 0,09	1,99 ± 0,24	17,49 ± 1,97

Figura 9 - Consumo médio de cianeto de potássio (KCN), em mg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de KCN: 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); do 6º ao 20º dia de gestação

Figura 10 - Consumo médio de tiocianato de potássio (KSCN), em mg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de KSCN: 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação

Tabela 13 – Desempenho reprodutivo médio de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Parâmetro	Controle	FEC1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
Peso médio materno (g) no 20º dia de gestação	307,00 ± 12,17	300,10 ± 11,34	296,70 ± 12,31	300,38 ± 10,15	295,70 ± 9,66	307,11 ± 10,78	295,00 ± 9,31
Peso médio do útero gravídico (g)	63,06 ± 6,54	74,612 ± 4,04	58,54 ± 7,26	60,81 ± 8,38	58,89 ± 5,47	69,08 ± 4,53	60,60 ± 7,13
Peso médio materno sem o útero (g)	239,33 ± 6,57	224,50 ± 8,21	239,10 ± 10,6	222,90 ± 5,08	229,30 ± 5,87	232,70 ± 8,02	221,80 ± 6,79
Peso médio da placenta (g)	0,57 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,57 ± 0,01
Peso médio fetal (g)	4,61 ± 0,13	4,80 ± 0,10	4,88 ± 0,10	4,74 ± 0,09	4,57 ± 0,13	4,69 ± 0,07	4,65 ± 0,09
Peso médio da ninhada (g)	53,66 ± 3,27	51,85 ± 5,22	43,67 ± 2,98	45,21 ± 3,59	43,06 ± 3,19	45,91 ± 3,19	44,93 ± 2,78
Nº de fetos vivos	9,10 ± 1,01	10,33 ± 0,55	8,88 ± 0,75	8,63 ± 0,59	9,70 ± 0,88	9,70 ± 0,64	9,70 ± 0,63
Nº fetos mortos	0	0	0	0	0	0	0
Nº de fetos machos	3,90 ± 0,65	4,66 ± 0,57	5,22 ± 0,40	4,87 ± 0,44	4,10 ± 0,45	4,77 ± 0,57	4,1 ± 0,58
Nº de fetos fêmeas	5,20 ± 0,80	5,66 ± 0,66	3,67 ± 0,50	3,75 ± 0,88	4,60 ± 0,60	5,00 ± 0,74	5,60 ± 0,70
Comprimento dos fetos (cm)	3,93 ± 0,08	4,00 ± 0,03	3,93 ± 0,04	4,00 ± 0,03	3,91 ± 0,04	3,96 ± 0,04	3,86 ± 0,05
Nº de corpos lúteos	11,10 ± 0,64	12,67 ± 1,24	12,04 ± 1,12	11,11 ± 0,87	11,70 ± 0,91	11,67 ± 1,16	11,50 ± 0,81
Nº de implantações	9,90 ± 1,04	11,33 ± 0,55	10,50 ± 1,12	10,56 ± 1,26	10,80 ± 0,59	10,78 ± 0,72	10,80 ± 0,42
Nº de reabsorções	0,90 ± 0,23	1,00 ± 0,53	1,40 ± 0,43	0,89 ± 0,34	1,50 ± 0,52	2,22 ± 0,94	1,10 ± 0,43
% de perda pré-implantação	10,81	10,58	12,79	4,95	7,69	7,63	6,09
% de perda pós-implantação	8,08	8,83	15,43	18,28	10,19	10,02	10,18

Tabela 14 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L): alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

	Glicose	Colesterol	Uréia	Creatinina	ALT	FA	AST
Controle	81,38 ± 7,04	63,85 ± 15,98	16,73 ± 3,69	0,84 ± 0,12	31,86 ± 5,66	159,20 ± 23,28	105,16 ± 27,59
FEC1	84,57 ± 9,49	65,94 ± 14,66	11,26 ± 3,09	0,58 ± 0,08	35,03 ± 6,41	130,48 ± 26,02	114,23 ± 32,36
FEC2	84,11 ± 7,29	62,77 ± 14,95	18,41 ± 3,57	0,73 ± 0,13	37,67 ± 4,43	162,43 ± 24,58	134,80 ± 33,26
FEC3	112,13 ± 7,56*	60,08 ± 13,28	18,87 ± 3,12	1,00 ± 0,10	32,33 ± 8,12	155,60 ± 27,27	159,58 ± 33,97*
FES1	70,57 ± 7,10	61,97 ± 12,47	16,83 ± 3,48	0,97 ± 0,09	38,68 ± 4,92	202,25 ± 22,16	110,41 ± 36,43
FES2	61,71 ± 6,11	62,42 ± 15,48	19,46 ± 3,35	0,86 ± 0,09	31,28 ± 7,69	175,82 ± 23,30	141,73 ± 34,84
FES3	67,59 ± 6,37	69,58 ± 11,09	18,93 ± 3,14	0,90 ± 0,10	30,90 ± 4,76	196,15 ± 25,33	144,35 ± 35,33

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

Figura 11 - Níveis séricos de glicose (mg/dL) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação

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

Figura 12 - Atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação

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

Tabela 15 – Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Grupos	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L)
Controle	32,71 ± 3,98
FEC1	81,43 ± 9,20*
FEC2	167,90 ± 9,37*
FEC3	262,50 ± 9,61*
FES1	96,09 ± 10,02*
FES2	141,88 ± 11,00*
FES3	228,50 ± 12,99*

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

Tabela 16 – Incidência de anomalias e malformações ósseas em fetos de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as frequências de ocorrência

	Controle	FEC1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
Malformações esqueléticas							
Fetos afetados	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
Ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Anomalias esqueléticas							
Fetos afetados	23/40	20/40	28/40	26/40	27/40	21/40	23/40
Ninhadas afetadas	6/10	5/10	5/10	6/10	6/10	6/10	5/10
Ossificação craniana reduzida	8/40	8/40	8/40	11/40	5/40	5/40	10/40
Anomalias do esterno	10/40	12/40	12/40	12/40	11/40	13/40	13/40
Anomalias vertebrais	6/40	8/40	9/40	7/40	13/40	8/40	6/40
Anomalias das costelas	0/40	0/40	2/40	2/40	0/40	0/40	0/40

Tabela 17 – Número de centros de ossificação da prole de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram analisados 40 fetos por grupo

Centros de ossificação	Controle	FEC1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
Metacarpo direito	3,99 ± 0,01	3,99 ± 0,01	3,95 ± 0,25	3,99 ± 0,01	3,99 ± 0,01	3,99 ± 0,01	3,99 ± 0,01
Metacarpo esquerdo	3,99 ± 0,01	3,99 ± 0,01	3,95 ± 0,26	3,99 ± 0,01	3,99 ± 0,01	3,99 ± 0,01	3,99 ± 0,01
Falange anterior direita	3,43 ± 0,88	3,94 ± 0,35	3,87 ± 0,47	3,78 ± 0,57	3,80 ± 0,57	3,94 ± 0,25	3,76 ± 0,65
Falange anterior esquerda	3,47 ± 0,88	3,94 ± 0,35	3,88 ± 0,45	3,78 ± 0,35	3,77 ± 0,63	3,85 ± 0,53	3,70 ± 0,84
Metatarso direito	4,91 ± 0,30	4,99 ± 0,01	4,97 ± 0,18	4,96 ± 0,19	4,89 ± 0,30	4,97 ± 0,18	4,91 ± 0,28
Metatarso esquerdo	4,91 ± 0,30	4,94 ± 0,35	4,96 ± 0,80	4,92 ± 0,27	4,92 ± 0,27	4,85 ± 0,53	4,94 ± 0,25
Abertura cervical	1,79 ± 0,19	1,87 ± 0,16	1,77 ± 0,165	1,86 ± 0,14	1,84 ± 0,13	1,86 ± 0,13	1,84 ± 0,13

Tabela 18 - Incidência de anomalias e/ou malformações viscerais na prole de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as frequências de ocorrência

	Controle	FEC1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
Malformações viscerais							
Fetos afetados	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
Ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Anomalias viscerais							
Fetos afetados	10/40	18/40	6/40	20/40*	6/40	15/40	12/40
Ninhadas afetadas	6/10	7/10	5/10	6/10	5/10	6/10	5/10
Ureteres dilatados	1/40	7/40	3/40	5/40	2/40	3/40	5/40
Ureteres sinuosos	7/40	11/40	5/40	6/40	3/40	8/40	8/40
Hemorragia peritoneal	2/40	2/40	1/40	4/40	2/40	3/40	2/40
Hipertrofia do esôfago	2/40	0/40	0/40	7/40	1/40	4/40	2/40

* $p < 0,05$ (Teste exato de Fischer)

Tabela 19 – Intensidade das lesões histológicas observadas em ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, as diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FEC1); 3 (FEC2) e 30 mg/kg (FEC3); ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FES1); 2,4 (FES2) e 24 mg/kg (FES3); do 6º ao 20º dia de gestação. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram avaliados 3 fetos por grupo

	Controle	FEC1	FEC2	FEC3	FES1	FES2	FES3
Tecido renal							
Congestão renal	-	+	+	++	-	+	++
Nefrose	-	-	-	-	-	-	++
Hemorragia renal	-	-	-	+	-	-	+
Hemossiderose	-	-	-	+	-	-	-
Tecido hepático							
Congestão hepática	-	+	+	++	-	+	-
Vacuolização de hepatócitos	-	-	+	+	-	-	+
Proliferação dos ductos biliares	-	-	-	-	-	-	+
Tecido nervoso							
Congestão no SNC	-	-	+	++	-	-	+
Neuronofagia	-	-	-	+	-	-	+
Áreas hemorrágicas no SNC	-	-	-	+	-	-	-
Gliose	-	-	-	++	-	+	++
Necrose	-	-	-	+	-	-	-
Tecido pancreático							
Depleção de células das ilhotas de Langerhans	-	-	-	++	-	-	-
Tireóide							
Aumento de reabsorção no colóide dos folículos	-	+	++	+++	+	++	+++

A

B

Figuras 14A e 14B - Fotomicrografia de corte histológico do rim de rata, que recebeu 24 mg/kg/dia de KSCN, na água de bebida, do 6º ao 20º dia da gestação, mostrando congestão (C), hemorragia (H) e nefrose (N) (HE, 20 X)

Figura 15- Fotomicrografia de corte histológico do rim de rata, que recebeu 30 mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando hemorragia e hemossiderose (seta) (HE, 20 X)

Figura 16 - Fotomicrografia de corte histológico do fígado de rata, que recebeu 24 mg/kg/dia de KSCN, na água de bebida, do 6º ao 20º dia da gestação, mostrando vacuolização de hepatócitos e proliferação de ductos biliares (seta) (HE, 20 X)

Figura 17 - Fotomicrografia de corte histológico do fígado de rata, que recebeu 30 mg mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6º ao 20º dia da gestação, mostrando vacuolização de hepatócitos e congestão (HE, 10 X)

Figura 18A - Fotomicrografia de corte histológico do sistema nervoso central de rata, que recebeu 30 mg mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6º ao 20º dia da gestação, mostrando necrose neuronal (setas) (HE, 20 X)

Figura 18B - Fotomicrografia de corte histológico do sistema nervoso central de rata, que recebeu 30 mg mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6º ao 20º dia da gestação, mostrando congestão, focos hemorrágicos (seta) e gliose difusa (HE, 10 X)

Figura 18C - Fotomicrografia de corte histológico do sistema nervoso central de rata, que recebeu 30 mg mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando gliose nodular focal e neuronofagia (seta) (HE, 20 X)

Figura 19 - Fotomicrografia de corte histológico do sistema nervoso central de rata, que recebeu 24 mg/kg/dia de KSCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando vacuolização discreta em substância branca do cerebelo e congestão (seta) (HE, 10 X)

Figura 20 - Fotomicrografia de corte histológico da tireóide de rata, que recebeu 30 mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando aumento no número de vacúolos de reabsorção no colóide dos folículos tireoideanos (HE, 10 X)

Figura 21 - Fotomicrografia de corte histológico do pâncreas de rata, que recebeu 30 mg/kg/dia de KCN, na água de bebida, do 6° ao 20° dia da gestação, mostrando depleção de células nas ilhotas de Langerhans (★) (HE, 20 X)

Figura 22 - Fotomicrografia de corte histológico do pâncreas de rata do grupo controle (HE, 20 X)

4.4 EXPERIMENTO 4: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO, EM RATAS, DE KCN OU KSCN DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL. AVALIAÇÃO PÓS-NATAL

As tabelas 20 e 21 mostram o peso médio e o ganho médio de peso corpóreo (g), respectivamente, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 22 mostra o consumo médio de ração (g), nos diversos períodos avaliados, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 23 mostra o consumo médio diário de água (mL) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 24 mostra e as figuras 23 e 24 ilustram o consumo médio de KCN ou KSCN (mg), respectivamente, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) no consumo das substâncias estudadas nos diversos dias analisados, em um mesmo grupo experimental.

A tabela 25 mostra o desempenho reprodutivo de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle em relação aos seguintes parâmetros: número de fetos vivos e mortos, sexo e peso da ninhada.

As tabelas 26 e 27 mostram o peso médio corpóreo e o ganho de peso (g), respectivamente, de ninhadas de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 28 mostra o peso médio do cérebro e do cerebelo de filhotes, com 22 dias de idade, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à

eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 29 mostra e a figura 25 ilustra os resultados das dosagens bioquímicas de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) nas concentrações séricas de uréia e na atividade da enzima alanina aminotransferase. A aplicação do teste de Dunnett revelou aumento significante ($p<0,05$) nos níveis séricos da uréia dos animais do grupo que recebeu a dose de 30 mg/kg/dia de KCN ($F=10,485$; $df=6/63$) em relação ao grupo controle. Também, a aplicação do teste de Dunnett revelou aumento significante ($p<0,05$) na atividade da enzima alanina aminotransferase do grupo que recebeu a dose de 30 mg/kg/dia de KCN ($F=3,46$; $df=6/63$) em relação ao grupo controle. Nas demais dosagens não houve diferenças significantes ($p>0,05$).

As tabelas 30 e 31 mostram os resultados das dosagens bioquímicas de filhotes machos e fêmeas, respectivamente, com 22 dias de idade, de ratas que receberam de ratas, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) nas diversas análises bioquímicas.

A tabela 32 mostra e a figura 26 ilustra os níveis séricos de tiocianato de ratas, e suas respectivas proles, que receberam, por via oral, na água de bebida,

diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) nas concentrações séricas de tiocianato dentro de um mesmo grupo experimental e no grupo controle. Em contrapartida, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) nas concentrações séricas de tiocianato comparando-se os grupos das progenitores e seus respectivos filhotes. A aplicação do teste de Tukey-Kramer revelou aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis séricos de tiocianato dos filhotes, tanto de machos quanto de fêmeas nos grupos: controle ($F=25,64$; $df=2/27$); DC1 ($F=23,10$; $df=2/27$); DC2 ($F=37,37$; $df=2/27$); DC3 ($F=21,95$; $df=2/27$); DS1 ($F=14,40$; $df=2/27$); DS2 ($F=23,35$; $df=2/27$); DS3 ($F=12,05$; $df=2/27$) em relação às lactantes. Também, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) nas concentrações séricas de tiocianato de filhotes machos e fêmeas. A aplicação do teste t revelou aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis séricos de tiocianato de filhotes machos, em relação às fêmeas, dos grupos de mães que receberam a dose de 3 e 30 mg/kg/dia de KCN ($F=1,63$; $F=1,77$) em relação ao grupo controle. Nas demais dosagens não houve diferenças significantes ($p>0,05$).

As tabelas 33 e 34 mostram a intensidade das lesões histológicas observadas em ratas, e suas respectivas proles, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN, do 6º ao 20º dia de gestação e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A intensidade das lesões foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (++++) lesões severas. As lesões encontradas neste experimento são

bastante semelhantes às encontradas no experimento anterior, experimento 3, exceto aquelas lesões encontradas no pâncreas, que aqui não foram evidenciadas.

Em relação aos filhotes, o estudo histopatológico revelou congestão renal, hepática e no SNC, dos grupos de mães que receberam a dose de 3 mg/kg/dia de KCN e 2,4 mg/kg/dia de KSCN, de forma branda, e de forma moderada no grupo que recebeu 30 mg/kg/dia de KCN e 24 mg/kg/dia de KSCN. A vacuolização de hepatócitos, proliferação dos ductos biliares e a neuronofagia foram evidenciadas de forma branda e a gliose, de forma moderada, somente nos filhotes dos grupos de mães expostas as maiores doses de KCN e KSCN, ou seja, 30 e 24 mg/kg/dia, respectivamente. No grupo controle e nos demais grupos experimentais, não foram observadas alterações histológicas dignas de nota.

As figuras anteriormente descritas, no experimento 3, também ilustram as lesões encontradas no presente experimento.

Tabela 20 – Peso médio corpóreo (g) de ratas, no período de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6° ao 20° dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22° dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
0	227,90 ± 14,42	224,90 ± 18,00	220,20 ± 15,43	222,10 ± 17,07	177,00 ± 18,16	203,00 ± 15,23	222,80 ± 16,63
6	238,50 ± 3,78	231,30 ± 8,21	227,70 ± 6,26	232,20 ± 6,54	228,13 ± 7,33	235,00 ± 11,96	232,60 ± 6,55
8	240,20 ± 3,33	235,30 ± 9,03	234,80 ± 6,55	239,40 ± 6,46	231,00 ± 6,88	242,75 ± 11,45	231,90 ± 6,11
10	252,30 ± 3,59	240,80 ± 8,77	240,60 ± 7,37	243,60 ± 6,41	240,13 ± 6,24	251,38 ± 11,48	236,90 ± 7,30
12	257,90 ± 4,35	243,10 ± 9,20	247,10 ± 7,14	250,60 ± 6,39	247,38 ± 7,23	254,25 ± 11,30	242,60 ± 6,77
14	268,70 ± 4,80	251,10 ± 8,58	255,70 ± 6,71	260,50 ± 6,66	257,00 ± 6,95	266,50 ± 11,83	246,50 ± 7,13
16	284,20 ± 5,85	261,40 ± 9,28	276,20 ± 7,00	280,50 ± 7,84	273,13 ± 6,59	287,63 ± 11,18	260,50 ± 7,35
18	305,78 ± 6,03	281,60 ± 9,93	293,10 ± 7,21	299,00 ± 8,02	291,50 ± 6,73	309,63 ± 12,48	279,40 ± 7,74
20	312,80 ± 6,69	312,90 ± 11,02	302,70 ± 7,09	309,40 ± 8,11	301,75 ± 7,25	323,75 ± 13,65	306,60 ± 10,64

Tabela 21 - Ganho médio de peso corpóreo (g) de ratas, no período de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Período da avaliação	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
00 H 06	10,60 ± 2,62	6,40 ± 2,32	7,50 ± 2,51	10,10 ± 2,94	9,44 ± 2,36	8,10 ± 2,80	9,80 ± 1,59
06 H 14	19,40 ± 2,45	19,80 ± 1,83	18,60 ± 1,94	18,40 ± 0,64	18,00 ± 0,96	18,60 ± 3,34	13,90 ± 2,34
14 H 20	54,90 ± 4,89	61,80 ± 3,59	56,40 ± 3,08	58,80 ± 3,09	56,78 ± 2,76	67,20 ± 3,76	60,10 ± 4,36
00 H 20	84,90 ± 5,58	88,00 ± 4,20	82,50 ± 3,99	87,30 ± 2,77	84,22 ± 3,43	93,90 ± 4,84	83,80 ± 6,07

Tabela 22 – Consumo médio de ração (g) de ratas, no período de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Período da avaliação	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
06 H 09	75,50 ± 8,21	55,70 ± 13,06	70,80 ± 10,90	77,80 ± 10,73	46,44 ± 13,77	53,00 ± 10,40	56,10 ± 14,72
09 H 12	65,50 ± 5,69	54,80 ± 5,70	74,20 ± 5,89	75,80 ± 5,47	59,11 ± 5,95	54,70 ± 5,96	53,80 ± 5,65
12 H 15	64,90 ± 8,66	74,20 ± 8,37	77,70 ± 7,11	81,30 ± 8,81	61,33 ± 8,58	60,80 ± 8,47	62,70 ± 8,80
15 H 18	71,70 ± 8,58	71,30 ± 8,41	76,80 ± 8,76	92,80 ± 8,19	66,78 ± 8,54	71,80 ± 8,68	69,90 ± 8,73
18 H 20	73,00 ± 6,30	73,00 ± 4,06	80,80 ± 3,70	84,40 ± 3,87	68,78 ± 3,24	71,30 ± 2,85	72,50 ± 4,24
06 H 20	74,00 ± 4,78	65,80 ± 3,63	76,06 ± 14,99	82,42 ± 18,71	63,70 ± 3,18	62,47 ± 1,88	66,80 ± 3,15

Tabela 23 - Consumo médio de água (mL/dia) de ratas, no período de gestação, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
7	29,50 ± 1,68	30,30 ± 1,40	32,50 ± 3,38	30,00 ± 3,76	29,44 ± 1,61	26,70 ± 2,38	27,30 ± 2,81
8	34,50 ± 2,17	29,60 ± 2,90	30,10 ± 3,80	23,70 ± 3,35	32,33 ± 2,48	28,60 ± 1,59	30,10 ± 1,77
9	33,00 ± 3,38	33,00 ± 5,06	35,40 ± 5,77	34,00 ± 5,74	33,33 ± 3,48	30,60 ± 5,57	34,60 ± 3,88
10	40,70 ± 5,22	32,20 ± 5,05	40,40 ± 5,11	27,00 ± 5,78	28,67 ± 5,29	32,10 ± 5,14	28,40 ± 5,91
11	33,10 ± 2,84	33,50 ± 3,81	33,50 ± 4,48	29,40 ± 3,40	34,22 ± 2,21	30,60 ± 1,71	36,50 ± 3,13
12	46,30 ± 3,00	41,20 ± 7,71	36,70 ± 4,48	26,50 ± 2,87	31,00 ± 3,10	34,90 ± 2,93	40,80 ± 4,28
13	36,50 ± 5,73	44,70 ± 4,53	33,20 ± 3,71	34,10 ± 2,97	41,89 ± 3,95	36,40 ± 3,29	45,50 ± 5,04
14	45,20 ± 3,39	36,80 ± 3,67	40,50 ± 4,03	33,30 ± 4,54	40,67 ± 4,38	37,10 ± 4,88	51,10 ± 5,27
15	52,40 ± 4,97	46,80 ± 7,48	39,00 ± 3,08	39,00 ± 4,53	37,56 ± 2,57	39,60 ± 3,88	50,60 ± 5,42
16	48,90 ± 3,37	51,90 ± 4,96	49,10 ± 4,64	44,60 ± 4,63	55,56 ± 4,81	45,10 ± 3,93	46,30 ± 5,25
17	54,70 ± 6,55	48,90 ± 6,61	59,80 ± 6,67	40,90 ± 4,36	45,33 ± 6,61	49,30 ± 6,41	51,10 ± 5,09
18	57,50 ± 5,54	48,90 ± 5,74	54,10 ± 5,97	46,30 ± 4,80	48,78 ± 5,36	54,90 ± 6,90	47,60 ± 6,08
19	58,60 ± 4,49	68,00 ± 4,31	46,50 ± 4,68	47,70 ± 5,15	56,67 ± 4,34	53,60 ± 4,87	47,10 ± 5,30
20	54,70 ± 4,02	56,00 ± 3,72	43,50 ± 3,81	38,60 ± 3,57	51,89 ± 5,18	57,50 ± 5,79	68,00 ± 5,88

Tabela 24 - Consumo médio de cianato de potássio (KCN) ou tiocianato de potássio (KSCN), em mg/kg, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN: 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou KSCN: 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
7	0,98 ± 0,10	2,98 ± 0,46	23,36 ± 1,72	0,89 ± 0,06	2,93 ± 0,21	25,89 ± 2,84
8	1,12 ± 0,12	3,97 ± 0,49	32,28 ± 4,17	0,86 ± 0,07	2,60 ± 0,22	27,10 ± 2,41
9	1,15 ± 0,10	3,32 ± 0,50	28,71 ± 4,58	0,75 ± 0,07	2,58 ± 0,21	21,58 ± 2,45
10	1,04 ± 0,10	3,31 ± 0,50	37,79 ± 5,09	0,97 ± 0,07	2,35 ± 0,27	21,37 ± 2,48
11	1,20 ± 0,13	3,85 ± 0,54	27,87 ± 4,86	0,74 ± 0,08	2,74 ± 0,28	23,34 ± 2,52
12	1,23 ± 0,13	2,79 ± 0,42	41,12 ± 4,11	1,06 ± 0,09	2,59 ± 0,23	26,27 ± 2,43
13	0,86 ± 0,12	4,02 ± 0,43	29,63 ± 3,16	0,95 ± 0,09	2,70 ± 0,24	30,10 ± 2,21
14	1,23 ± 0,10	3,01 ± 0,45	38,20 ± 4,37	0,78 ± 0,06	3,12 ± 0,23	22,10 ± 2,27
15	1,15 ± 0,10	3,76 ± 0,47	34,69 ± 4,34	0,96 ± 0,09	2,84 ± 0,26	27,16 ± 2,69
16	1,02 ± 0,10	3,65 ± 0,44	30,07 ± 4,43	0,81 ± 0,06	2,66 ± 0,28	28,19 ± 2,50
17	1,02 ± 0,12	2,77 ± 0,46	37,50 ± 4,68	0,87 ± 0,07	2,79 ± 0,21	22,11 ± 2,24
18	1,45 ± 0,12	2,70 ± 0,47	32,46 ± 4,54	0,97 ± 0,07	2,52 ± 0,22	27,88 ± 2,88
19	0,95 ± 0,10	2,86 ± 0,45	25,03 ± 4,31	0,74 ± 0,09	2,79 ± 0,20	28,55 ± 2,53
20	1,02 ± 0,10	3,11 ± 0,40	38,41 ± 4,86	0,76 ± 0,09	2,09 ± 0,21	20,69 ± 2,35

Figura 23 - Média de consumo de cianeto de potássio (KCN), em mg, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN: 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto

Tabela 25 – Avaliação reprodutiva de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Parâmetro	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
Nº de fetos vivos	8,50 ± 0,31	8,30 ± 0,59	7,30 ± 1,03	8,10 ± 0,67	8,44 ± 0,63	9,70 ± 0,47	7,50 ± 0,79
Nº fetos mortos	0	0,20 ± 0,13	0,30 ± 0,15	0	0,22 ± 0,14	0	0,60 ± 0,33
Nº de fetos machos	4,00 ± 0,53	4,60 ± 0,60	3,70 ± 0,68	4,90 ± 0,58	4,11 ± 0,51	4,60 ± 0,58	2,50 ± 0,45
Nº de fetos fêmeas	4,50 ± 0,37	3,70 ± 0,45	3,80 ± 0,59	3,80 ± 0,89	4,33 ± 0,74	5,10 ± 0,53	4,90 ± 0,55
Peso da ninhada (g)	57,09 ± 3,31	53,46 ± 3,67	47,60 ± 3,66	56,30 ± 4,17	55,68 ± 3,57	65,23 ± 3,61	50,94 ± 3,70

Tabela 26 – Peso médio (g) das ninhadas de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6° ao 20° dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22° dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
1	51,77 ± 3,30	46,62 ± 3,10	42,20 ± 3,40	50,97 ± 3,10	46,90 ± 3,50	53,73 ± 3,70	46,16 ± 3,10
7	103,50 ± 5,02	98,60 ± 5,80	88,13 ± 5,07	98,08 ± 5,20	94,75 ± 5,90	108,10 ± 5,70	93,50 ± 5,10
14	180,00 ± 8,60	173,10 ± 9,30	150,80 ± 11,18	170,00 ± 5,10	167,40 ± 6,30	189,30 ± 5,20	161,20 ± 11,16
21	263,30 ± 11,38	254,80 ± 11,48	219,20 ± 11,77	262,00 ± 8,30	253,98 ± 11,30	285,10 ± 9,90	244,46 ± 11,11

Tabela 27 – Ganho médio de peso (g) dos filhotes de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Período da avaliação	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
01 H 07	51,73 ± 4,70	52,00 ± 4,80	45,93 ± 4,80	47,18 ± 4,61	43,11 ± 4,17	54,37 ± 4,15	47,34 ± 4,16
07 H 14	76,50 ± 5,72	74,50 ± 7,07	62,67 ± 8,06	71,92 ± 6,31	72,70 ± 5,82	81,21 ± 5,57	67,79 ± 7,89
14 H 21	83,30 ± 10,03	81,70 ± 10,11	68,40 ± 10,04	92,00 ± 7,28	84,20 ± 8,58	95,80 ± 6,43	83,20 ± 8,36
01 H 21	211,53 ± 11,31	208,20 ± 11,22	177,33 ± 11,77	211,10 ± 8,14	225,17 ± 11,33	231,32 ± 9,00	198,24 ± 11,06

Tabela 28 – Peso médio (g) do cérebro e cerebelo de filhotes, no 22º dia de vida, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 20 animais, machos e fêmeas, por grupo

	Peso do cérebro	Peso do cerebelo	Peso do cérebro	Peso do cerebelo
	filhotes machos		filhotes fêmeas	
Controle	1,05 ± 0,15	0,171 ± 0,04	1,02 ± 0,16	0,169 ± 0,01
DC1	1,16 ± 0,17	0,187 ± 0,02	1,11 ± 0,16	0,174 ± 0,02
DC2	1,11 ± 0,17	0,186 ± 0,02	1,15 ± 0,17	0,181 ± 0,02
DC3	1,07 ± 0,15	0,176 ± 0,02	1,02 ± 0,17	0,168 ± 0,02
DS1	1,07 ± 0,14	0,177 ± 0,02	1,02 ± 0,15	0,168 ± 0,02
DS2	1,06 ± 0,14	0,185 ± 0,01	1,04 ± 0,16	0,176 ± 0,01
DS3	1,03 ± 0,17	0,184 ± 0,02	1,05 ± 0,12	0,179 ± 0,01

Tabela 29 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST) de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

	Glicose	Colesterol	Uréia	Creatinina	ALT	FA	AST
Controle	79,20 ± 7,25	68,34 ± 8,66	12,02 ± 1,55	0,60 ± 0,03	34,80 ± 3,97	125,30 ± 12,50	84,48 ± 9,64
DC1	75,57 ± 10,32	69,31 ± 7,84	10,62 ± 1,61	0,62 ± 0,03	31,61 ± 3,43	126,78 ± 10,00	87,77 ± 9,17
DC2	73,88 ± 10,59	69,61 ± 9,53	11,10 ± 1,51	0,72 ± 0,05	36,52 ± 3,04	115,90 ± 12,68	80,23 ± 9,62
DC3	70,62 ± 7,34	60,41 ± 9,39	18,17 ± 1,10*	0,66 ± 0,04	50,08 ± 3,14*	140,87 ± 13,64	86,65 ± 9,91
DS1	68,71 ± 9,63	62,50 ± 9,22	11,96 ± 1,74	0,65 ± 0,05	36,55 ± 3,62	122,20 ± 14,63	81,23 ± 9,16
DS2	65,83 ± 11,89	62,93 ± 8,85	10,35 ± 1,57	0,66 ± 0,03	41,00 ± 3,29	117,90 ± 11,20	82,04 ± 9,09
DS3	68,33 ± 7,29	60,44 ± 8,16	10,03 ± 1,00	0,69 ± 0,03	33,73 ± 3,75	111,40 ± 12,40	89,17 ± 9,89

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

Figura 25 - Níveis séricos de uréia (A) (mg/dL) e atividade da enzima ALT (B) (U/L) de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto

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

Tabela 30 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), obtidos por meio de *pool* sangüíneo de filhotes machos de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 amostras por grupo

	Glicose	Colesterol	Uréia	Creatinina	ALT	FA	AST
Controle	121,00 ± 6,69	58,33 ± 8,58	14,47 ± 4,22	0,38 ± 0,03	40,62 ± 8,93	154,78 ± 13,38	74,78 ± 3,38
DC1	121,83 ± 8,09	57,86 ± 4,76	18,00 ± 3,39	0,38 ± 0,01	35,84 ± 5,42	142,73 ± 19,66	72,73 ± 3,66
DC2	123,13 ± 8,99	51,36 ± 7,02	18,25 ± 3,03	0,34 ± 0,02	36,60 ± 6,40	167,54 ± 16,92	87,54 ± 3,92
DC3	131,10 ± 13,01	52,05 ± 4,68	14,15 ± 4,80	0,37 ± 0,03	37,57 ± 9,12	154,53 ± 16,75	74,53 ± 3,75
DS1	116,63 ± 6,79	52,86 ± 4,17	19,41 ± 4,44	0,35 ± 0,02	33,85 ± 4,36	137,78± 9,91	77,78± 3,91
DS2	121,14 ± 5,99	56,37 ± 12,62	11,61 ± 2,96	0,35 ± 0,02	36,87 ± 6,02	153,26 ± 12,24	73,26 ± 3,24
DS3	115,00 ± 4,76	59,92 ± 8,96	10,12 ± 3,85	0,34 ± 0,01	32,26 ± 3,78	161,32 ± 14,75	81,32 ± 4,75

Tabela 31 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), obtidos por meio de *pool* sanguíneo de filhotes fêmeas de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6° ao 20° dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22° dia pós-parto. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 amostras por grupo

	Glicose	Colesterol	Uréia	Creatinina	ALT	FA	AST
Controle	101,01 ± 5,54	58,03 ± 8,85	15,00 ± 3,99	0,38 ± 0,01	40,00 ± 7,99	158,77 ± 17,28	74,01 ± 4,24
DC1	111,66 ± 7,07	59,44 ± 5,23	14,79 ± 4,47	0,38 ± 0,01	39,04 ± 6,00	148,03 ± 17,00	78,55 ± 4,99
DC2	103,12 ± 6,23	54,41 ± 6,13	13,71 ± 4,01	0,33 ± 0,02	37,60 ± 6,55	161,02 ± 15,00	73,47 ± 4,75
DC3	100,08 ± 6,53	59,05 ± 8,28	15,15 ± 6,01	0,38 ± 0,03	39,07 ± 8,02	154,53 ± 16,89	74,03 ± 3,87
DS1	117,09 ± 5,39	52,49 ± 7,26	16,01 ± 5,45	0,35 ± 0,02	41,05 ± 6,36	149,22 ± 14,99	79,01 ± 3,09
DS2	107,14 ± 8,00	56,74 ± 9,12	14,37 ± 4,06	0,35 ± 0,02	40,87 ± 7,02	150,00 ± 16,54	74,06 ± 4,52
DS3	100,00 ± 7,44	54,92 ± 7,77	12,12 ± 3,87	0,34 ± 0,01	42,26 ± 6,00	148,22 ± 17,75	72,12 ± 5,03

Tabela 32 – Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de ratas avaliadas no 22º dia pós-parto, e de suas respectivas proles, e que receberam durante a gestação, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianato de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram analisadas 10 amostras de cada grupo

Grupos	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) Mães	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/l) Filhotes machos	Níveis séricos de tiocianato (mcmol/l) Filhotes fêmeas
Controle	26,63 ± 2,77	69,14 ± 4,77*	60,80 ± 5,38*
DC1	35,11 ± 2,87	64,14 ± 4,41*	63,55 ± 2,84*
DC2	36,05 ± 2,83	77,21 ± 4,19*; [#]	65,25 ± 3,28*
DC3	36,73 ± 3,72	74,14 ± 4,75*; [#]	60,83 ± 3,57*
DS1	37,85 ± 3,25	71,12 ± 6,45*	64,50 ± 3,53*
DS2	36,95 ± 3,57	68,00 ± 3,14*	63,63 ± 3,70*
DS3	34,20 ± 4,29	66,42 ± 5,88*	54,50 ± 3,62*

*p<0,05 em relação ao grupo das mães (ANOVA seguido por Tukey-Kramer)

[#]p<0,05 em relação ao grupo dos filhotes fêmeas (teste t)

Figura 26 - Níveis séricos de tiocianato de ratas, e respectivos filhotes machos e fêmeas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto

*p<0,05 em relação ao grupo das mães

Tabela 33 – Intensidade das lesões histológicas observadas em ratas, que receberam durante a gestação, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram avaliados 3 animais por grupo.

	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
Tecido renal							
Congestão renal	-	+	+	++	-	+	++
Nefrose	-	-	-	-	-	-	++
Hemorragia renal	-	-	-	+	-	-	+
Hemossiderose	-	-	-	+	-	-	-
Tecido hepático							
Congestão hepática	-	+	+	++	-	+	-
Vacuolização de hepatócitos	-	-	+	+	-	-	+
Proliferação dos ductos biliares	-	-	-	-	-	-	+
Tecido nervoso							
Congestão no SNC	-	-	+	++	-	-	+
Neuronofagia	-	-	-	+	-	-	+
Áreas hemorrágicas no SNC	-	-	-	+	-	-	-
Gliose	-	-	-	++	-	+	++
Necrose	-	-	-	+	-	-	-
Tireóide							
Aumento de reabsorção no colóide dos folículos	-	+	++	+++	+	++	+++

Tabela 34 – Intensidade das lesões histológicas observadas em filhotes, no 22º dia de vida, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (DC1); 3 (DC2) e 30 mg/kg (DC3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (DS1); 2,4 (DS2) e 24 mg/kg (DS3), do 6º ao 20º dia de gestação e submetidas à eutanásia no 22º dia pós-parto. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram analisados 3 animais por grupo

	Controle	DC1	DC2	DC3	DS1	DS2	DS3
Tecido renal							
Congestão renal	-	-	+	++	-	+	++
Tecido hepático							
Congestão hepática	-	-	+	++	-	+	++
Vacuolização de hepatócitos	-	-	-	+	-	-	+
Proliferação dos ductos biliares	-	-	-	+	-	-	+
Tecido nervoso							
Congestão no SNC	-	-	+	++	-	+	++
Neuronofagia	-	-	-	+	-	-	+
Gliose	-	-	-	++	-	-	++

4.5 EXPERIMENTO 5: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO, EM RATAS, DE KCN OU KSCN, DURANTE A LACTAÇÃO

As tabelas 35 e 36 mostram o peso médio e o ganho médio de peso (g) corpóreo, respectivamente, de ratas lactantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1° ao 18° dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19° dia da lactação. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 37 mostra o consumo médio de ração (g), nos diversos períodos avaliados, de ratas lactantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1° ao 18° dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19° dia da lactação. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 38 mostra o consumo médio diário de água (mL) de ratas lactantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1° ao 18° dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19° dia da lactação. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os

diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 39 mostra e as figuras 27 e 28 ilustram o consumo médio de KCN ou KSCN (mg) de ratas lactantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1º ao 18º dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) no consumo das substâncias estudadas nos diversos dias analisados, em um mesmo grupo experimental.

As tabelas 40 e 41 mostram o peso médio corpóreo e o ganho de peso (g), respectivamente, das ninhadas de ratas lactantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1º ao 18º dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais comparados ao grupo controle.

A tabela 42 mostra os resultados das dosagens bioquímicas de ratas lactantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1º ao 18º dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) nas diversas análises.

As tabelas 43 e 44 mostram os resultados das dosagens bioquímicas de filhotes machos e fêmeas, respectivamente, com 18 dias de idade, de ratas lactantes que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1º ao 18º dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada

no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) nas diversas análises.

A tabela 45 mostra e a figura 29 ilustra a produção média de leite (g/ 10 horas) de ratas lactantes, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1º ao 18º dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A análise das variâncias revelou não haver diferenças significantes ($p>0,05$) na produção de leite nos diversos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Entretanto, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) na produção de leite comparando-se as duas metodologias. A aplicação do teste t revelou aumento significativo ($p<0,05$) na produção de leite quando utilizou-se o peso das mães em comparação ao peso das ninhadas, dos animais pertencentes aos grupos controle ($F=2,273$); FCL1 ($F=2,998$); FCL2 ($F=3,168$); FCL3 ($F=1,947$); FSL1 ($F=1,108$). Nos demais grupos não houve diferenças significantes.

A tabela 46 mostra e as figuras 30, 31, 32 e 33 ilustram os níveis séricos de tiocianato, das lactantes e dos lactentes, e os níveis lácteos de tiocianato, das lactantes, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1º ao 18º dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) nas concentrações séricas e lácteas de tiocianato dentro de um mesmo grupo experimental em relação ao grupo controle. A aplicação do teste de Dunnett revelou aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis séricos de tiocianato das progenitoras nos animais dos grupos que receberam as doses de 3 e 30 mg/kg/dia de KCN e nos

grupos que receberam as doses de 2,4 e 24 mg/kg/dia de KSCN ($F=131,90$, $df=6/63$) em relação ao grupo controle. Também verificou-se aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis lácteos dos animais dos grupos que receberam as doses de 1, 3 e 30 mg/kg/dia de KCN e nos grupos que receberam as doses de 2,4 e 24 mg/kg/dia de KSCN ($F=82,820$, $df=6/63$) em relação ao grupo controle.

Em relação aos lactentes, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) nas concentrações séricas de tiocianato dentro de um mesmo grupo experimental em relação ao grupo controle, nos filhotes machos e fêmeas. A aplicação do teste de Dunnett revelou aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis séricos de tiocianato nos filhotes machos das progenitoras de todos os grupos experimentais ($F=10,623$, $df=6/63$) em relação ao grupo controle. Ainda, verificou-se aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis séricos dos filhotes fêmeas das progenitoras dos grupos que receberam as doses de 3 e 30 mg/kg/dia de KCN e nos grupos que receberam as doses de 2,4 e 24 mg/kg/dia de KSCN ($F=13,325$, $df=6/63$, $p<0,05$) em relação ao grupo controle. Não foram verificadas diferenças entre filhotes machos e fêmeas, em relação a este parâmetro. Em contrapartida, a análise das variâncias revelou haver diferenças significantes ($p<0,05$) nas concentrações séricas de tiocianato comparando-se o grupo das progenitoras e seus respectivos filhotes. A aplicação do teste de Tukey-Kramer revelou aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis séricos de tiocianato dos filhotes, tanto de machos quanto de fêmeas no grupo controle ($F=28,848$; $df=2/27$); FCL1 ($F=19,25$; $df=2/27$); FCL3 ($F=20,73$; $df=2/27$); FSL1 ($F=20,298$; $df=2/27$) e FSL3 ($F=25,835$; $df=2/27$). Nos demais grupos não houve diferenças significantes.

A tabela 47 e 48 mostram a intensidade das lesões histológicas observadas em ratas lactantes, e em suas proles, respectivamente, e que

receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN ou KSCN do 1º ao 18º dia de lactação, e do grupo controle que recebeu somente água filtrada no mesmo período, e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A intensidade das lesões foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. As lesões encontradas neste experimento são bastante semelhantes às encontradas no experimento anterior, experimento 4, tanto nas lactantes como nos lactentes. No grupo controle e nos demais grupos experimentais, não foram observadas alterações histológicas dignas de nota.

As figuras anteriormente descritas, no experimento 3, também ilustram as lesões encontradas no presente experimento.

Tabela 35 – Peso médio corpóreo de ratas (g) que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1° ao 18° dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19° dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

	Dia da avaliação			
	1°	7°	14°	18°
Controle	252,56 ± 5,27	268,11 ± 7,08	281,22 ± 7,66	295,78 ± 11,94
FCL1	253,50 ± 5,59	260,78 ± 7,60	280,00 ± 4,90	289,56 ± 4,97
FCL2	252,44 ± 6,25	265,44 ± 6,82	279,89 ± 6,75	280,56 ± 7,15
FCL3	255,22 ± 5,82	261,56 ± 5,95	280,00 ± 5,09	286,78 ± 6,08
FSL1	254,00 ± 5,42	271,11 ± 5,07	278,67 ± 4,79	283,67 ± 6,95
FSL2	253,00 ± 7,36	260,33 ± 7,69	276,44 ± 8,00	280,33 ± 7,55
FSL3	253,22 ± 3,57	271,78 ± 4,18	284,67 ± 5,60	289,56 ± 5,98

Tabela 36 - Ganho de peso médio corpóreo (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1° ao 18° dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19° dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Período da avaliação	Controle	FCL1	FCL2	FCL3	FSL1	FSL2	FSL3
01 H 07	15,56 ± 2,87	8,70 ± 3,65	11,80 ± 2,72	6,80 ± 3,63	17,20 ± 3,61	8,00 ± 2,87	17,90 ± 3,05
07 H 14	13,11 ± 3,58	19,20 ± 5,70	14,20 ± 3,01	18,30 ± 5,05	8,20 ± 3,55	15,30 ± 4,86	12,60 ± 4,42
14 H 18	14,56 ± 6,00	8,90 ± 6,61	0,30 ± 3,56	7,30 ± 3,56	5,00 ± 3,93	3,30 ± 2,49	5,80 ± 3,86
01 H 18	43,22 ± 5,35	36,80 ± 2,78	26,30 ± 3,70	32,40 ± 4,50	30,40 ± 5,50	26,60 ± 3,96	36,30 ± 4,54

Tabela 37 – Consumo médio de ração (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Período da avaliação	Controle	↗L1	↗L2	↗L3	↘L1	↘L2	↘L3
01 H 04	75,11 ± 6,82	70,00 ± 5,19	71,20 ± 5,46	70,70 ± 4,80	69,30 ± 3,80	73,90 ± 5,74	81,10 ± 3,52
04 H 08	137,11 ± 13,48	141,90 ± 14,67	150,20 ± 11,52	141,00 ± 13,30	149,80 ± 6,90	128,50 ± 8,69	160,10 ± 15,81
08 H 12	189,11 ± 7,11	189,70 ± 6,19	165,30 ± 9,78	190,80 ± 4,90	174,90 ± 5,90	181,00 ± 4,96	191,50 ± 7,01
12 H 16	204,41 ± 6,16	210,80 ± 3,58	208,70 ± 3,01	202,30 ± 5,80	191,90 ± 9,99	201,80 ± 6,88	216,10 ± 8,20
16 H 18	123,78 ± 5,44	120,80 ± 4,65	121,40 ± 8,83	107,50 ± 5,90	108,90 ± 4,18	118,10 ± 4,17	117,70 ± 2,90
01 H 18	145,91 ± 7,80	146,64 ± 6,96	143,36 ± 7,72	142,36 ± 6,94	138,96 ± 6,15	140,66 ± 6,09	153,30 ± 7,49

Tabela 38 – Consumo médio de água (mL) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	Controle	FCL1	FCL2	FCL3	FSL1	FSL2	FSL3
1	51,22 ± 4,29	49,10 ± 2,93	49,00 ± 3,47	53,20 ± 1,76	47,60 ± 2,92	49,20 ± 5,39	37,80 ± 4,77
2	52,20 ± 2,28	52,30 ± 4,10	50,20 ± 4,03	50,20 ± 3,26	54,80 ± 6,83	55,40 ± 7,09	56,50 ± 3,80
3	59,56 ± 5,35	52,00 ± 4,60	45,00 ± 4,03	49,20 ± 3,00	50,80 ± 2,37	60,50 ± 6,52	54,30 ± 3,86
4	57,22 ± 2,86	58,10 ± 5,47	62,30 ± 5,56	51,70 ± 4,18	56,10 ± 8,43	61,10 ± 5,39	57,70 ± 3,75
5	57,22 ± 4,51	58,10 ± 6,04	59,05 ± 7,76	53,20 ± 6,44	65,60 ± 7,74	63,40 ± 3,64	57,90 ± 3,89
6	64,44 ± 7,05	59,80 ± 4,45	59,50 ± 4,51	62,00 ± 7,74	59,00 ± 4,80	68,90 ± 7,48	62,80 ± 4,48
7	66,00 ± 8,90	61,50 ± 4,86	58,60 ± 5,41	60,40 ± 6,32	66,20 ± 5,63	59,70 ± 8,51	67,70 ± 5,84
8	77,22 ± 6,36	76,60 ± 10,48	60,50 ± 6,33	62,10 ± 4,98	60,50 ± 8,34	75,40 ± 8,26	73,00 ± 6,63
9	73,78 ± 5,16	76,40 ± 9,17	68,50 ± 7,00	71,40 ± 10,42	66,50 ± 8,59	73,00 ± 5,18	79,50 ± 6,47
10	69,44 ± 4,93	74,70 ± 4,03	74,10 ± 4,00	64,80 ± 4,65	73,50 ± 6,53	69,10 ± 6,42	73,00 ± 5,32
11	77,33 ± 6,03	83,50 ± 8,48	73,50 ± 6,98	73,90 ± 8,62	76,20 ± 8,31	74,00 ± 4,60	73,50 ± 4,83
12	73,11 ± 5,23	82,60 ± 5,35	87,00 ± 9,00	67,60 ± 9,86	80,50 ± 7,16	78,60 ± 4,24	73,50 ± 4,83
13	85,78 ± 6,36	82,60 ± 5,35	77,50 ± 5,44	69,40 ± 4,46	78,20 ± 5,27	84,80 ± 5,06	88,50 ± 5,92
14	95,44 ± 6,37	92,80 ± 6,25	75,60 ± 7,00	87,10 ± 8,87	84,00 ± 5,36	95,50 ± 8,80	79,00 ± 6,23
15	83,30 ± 5,65	90,00 ± 5,24	87,20 ± 5,11	96,50 ± 9,95	91,40 ± 5,97	94,80 ± 9,62	96,10 ± 7,33
16	93,30 ± 7,06	88,20 ± 6,05	88,20 ± 4,94	91,10 ± 4,95	93,40 ± 6,43	93,40 ± 5,70	95,70 ± 5,49
17	95,56 ± 8,08	89,10 ± 8,04	91,10 ± 5,65	93,40 ± 5,32	82,60 ± 5,04	97,10 ± 8,83	91,60 ± 5,53
18	76,67 ± 9,62	75,00 ± 9,79	89,00 ± 10,49	72,00 ± 10,31	89,00 ± 10,68	62,00 ± 8,54	63,00 ± 9,73

Tabela 39 – Consumo médio de cianeto de potássio (KCN) ou tiocianato de potássio (KSCN), em mg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KCN: 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou KSCN: 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

Dia da avaliação	FCL1	FCL2	FCL3	FSL1	FSL2	FSL3
1	1,21 ± 0,10	3,53 ± 0,29	29,52 ± 1,69	0,86 ± 0,08	2,86 ± 0,20	30,96 ± 2,98
2	1,00 ± 0,09	2,78 ± 0,23	30,44 ± 2,94	0,87 ± 0,08	2,99 ± 0,40	24,20 ± 2,16
3	1,13 ± 0,09	3,99 ± 0,31	31,77 ± 2,26	0,95 ± 0,10	2,65 ± 0,43	25,27 ± 2,45
4	1,00 ± 0,08	3,91 ± 0,31	33,13 ± 3,81	0,89 ± 0,06	3,37 ± 0,37	25,08 ± 2,92
5	1,09 ± 0,05	2,92 ± 0,35	36,87 ± 2,01	0,77 ± 0,07	2,72 ± 0,27	27,13 ± 2,21
6	1,07 ± 0,05	3,07 ± 0,21	27,89 ± 1,53	0,95 ± 0,07	2,50 ± 0,27	27,38 ± 2,80
7	1,18 ± 0,08	3,03 ± 0,28	34,34 ± 2,44	0,73 ± 0,11	2,53 ± 0,21	25,49 ± 2,74
8	1,07 ± 0,10	3,51 ± 0,31	33,42 ± 2,53	0,86 ± 0,05	2,62 ± 0,26	28,11 ± 2,31
9	1,03 ± 0,10	3,30 ± 0,35	28,85 ± 2,31	0,94 ± 0,08	2,26 ± 0,24	22,75 ± 2,50
10	1,11 ± 0,06	3,07 ± 0,28	36,09 ± 3,01	0,71 ± 0,06	2,74 ± 0,21	21,83 ± 2,14
11	1,08 ± 0,06	3,78 ± 0,26	33,62 ± 3,26	0,97 ± 0,09	2,71 ± 0,15	31,92 ± 2,75
12	1,06 ± 0,11	2,80 ± 0,29	30,87 ± 3,98	0,80 ± 0,04	2,76 ± 0,29	26,07 ± 2,96
13	1,03 ± 0,06	2,87 ± 0,23	37,75 ± 3,58	0,89 ± 0,06	2,46 ± 0,15	24,09 ± 2,78
14	0,99 ± 0,05	4,39 ± 1,23	32,22 ± 3,11	0,88 ± 0,08	2,82 ± 0,28	29,01 ± 2,98
15	1,10 ± 0,09	3,14 ± 0,27	32,06 ± 3,96	0,85 ± 0,08	2,42 ± 0,29	24,00 ± 2,17
16	0,79 ± 0,11	3,08 ± 0,25	29,94 ± 3,74	0,76 ± 0,05	2,27 ± 0,20	24,02 ± 2,21
17	0,87 ± 0,10	2,67 ± 0,32	23,73 ± 3,17	0,47 ± 0,17	2,71 ± 0,19	26,84 ± 2,50
18	1,05 ± 0,08	3,28 ± 0,26	31,91 ± 3,24	0,84 ± 0,09	2,61 ± 0,25	25,54 ± 2,15

Figura 28 - Consumo médio de tiocianato de potássio (KSCN), em mg, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de KSCN: 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação

Tabela 40 – Peso médio das ninhadas (g) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1° ao 18° dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19° dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram avaliadas 10 ninhadas por grupo

	Dia da avaliação			
	1	7	14	18
Controle	53,67 ± 0,79	119,11 ± 4,53	221,22 ± 6,69	255,00 ± 8,42
FCL1	53,30 ± 0,88	122,10 ± 5,80	230,50 ± 6,40	279,70 ± 14,26
FCL2	50,20 ± 1,13	109,11 ± 5,08	216,20 ± 3,24	265,10 ± 10,21
FCL3	54,70 ± 0,82	117,60 ± 2,80	216,60 ± 5,71	262,20 ± 8,38
FSL1	53,20 ± 1,13	123,60 ± 4,54	226,10 ± 6,66	272,70 ± 8,97
FSL2	53,50 ± 0,70	121,30 ± 5,72	219,20 ± 3,06	271,80 ± 12,12
FSL3	54,70 ± 1,22	131,70 ± 4,88	233,20 ± 6,44	291,80 ± 11,13

Tabela 41 – Ganho de peso (g) médio das ninhadas de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1° ao 18° dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19° dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram avaliadas 10 ninhadas por grupo

Período	Controle	FCL1	FCL2	FCL3	FSL1	FSL2	FSL3
da avaliação							
01 H 07	65,44 ± 4,64	68,80 ± 5,30	48,00 ± 5,56	62,10 ± 2,47	70,00 ± 4,66	67,80 ± 6,50	77,00 ± 4,69
07 H 14	102,11 ± 7,65	108,40 ± 7,65	118,00 ± 8,18	99,90 ± 4,77	102,00 ± 3,41	97,90 ± 12,03	111,50 ± 5,64
14 H 18	44,89 ± 9,32	49,20 ± 4,42	48,90 ± 4,22	45,16 ± 3,53	46,60 ± 5,50	52,60 ± 8,63	48,60 ± 5,05
01 H 18	216,17 ± 12,86	226,40 ± 13,64	214,90 ± 9,58	207,00 ± 7,97	219,50 ± 9,48	218,30 ± 12,40	237,10 ± 11,05

Tabela 42 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados 10 animais por grupo

	Glicose	Colesterol	Uréia	Creatinina	ALT	FA	AST
Controle	77,31 ± 10,01	60,8 ± 12,42	10,12 ± 1,25	0,66 ± 0,03	31,20 ± 3,97	126,30 ± 12,45	81,45 ± 9,54
FCL1	77,75 ± 9,54	64,99 ± 13,21	10,13 ± 1,41	0,65 ± 0,03	32,41 ± 3,43	125,75 ± 10,12	82,73 ± 9,27
FCL2	74,08 ± 10,12	69,22 ± 9,54	11,11 ± 1,81	0,61 ± 0,05	36,62 ± 3,04	119,93 ± 12,00	80,20 ± 9,00
FCL3	70,00 ± 10,52	69,56 ± 9,77	10,17 ± 1,10	0,66 ± 0,04	30,08 ± 3,14	127,8 ± 13,00	85,60 ± 9,00
FSL1	69,45 ± 9,39	62,40 ± 9,51	10,66 ± 1,54	0,65 ± 0,02	34,55 ± 3,72	129,29 ± 14,12	86,20 ± 9,21
FSL2	67,87 ± 10,22	62,11 ± 9,85	10,35 ± 1,57	0,66 ± 0,02	31,00 ± 3,39	119,97 ± 11,23	83,05 ± 9,00
FSL3	70,03 ± 7,69	60,33 ± 9,16	10,33 ± 1,22	0,66 ± 0,05	33,73 ± 3,45	119,46 ± 12,44	81,19 ± 9,87

Tabela 43 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), obtidos, no 18º dia de vida, por meio de *pool* sanguíneo, de filhotes machos de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram analisadas 10 amostras por grupo

	Glicose	Colesterol	Uréia	Creatinina	ALT	FA	AST
Controle	131,01 ± 6,79	59,38 ± 8,58	18,17 ± 2,02	0,35 ± 0,02	37,12 ± 5,03	164,70 ± 14,34	84,00 ± 3,45
FCL1	121,45 ± 8,49	57,56 ± 8,26	18,09 ± 2,30	0,34 ± 0,02	36,88 ± 5,45	162,76 ± 15,60	82,05 ± 3,77
FCL2	128,45 ± 8,56	51,56 ± 7,92	18,52 ± 2,09	0,34 ± 0,03	35,00 ± 6,45	167,50 ± 16,00	87,03 ± 3,95
FCL3	131,22 ± 8,29	52,55 ± 5,52	18,10 ± 2,88	0,37 ± 0,03	36,17 ± 6,02	164,00 ± 16,00	84,08 ± 3,78
FSL1	126,03 ± 8,54	52,16 ± 6,52	17,79 ± 2,01	0,35 ± 0,03	37,00 ± 6,53	167,00 ± 16,42	87,77 ± 3,01
FSL2	121,04 ± 8,56	56,27 ± 8,66	17,60 ± 2,81	0,35 ± 0,02	37,08 ± 6,45	159,21 ± 16,21	83,12 ± 3,24
FSL3	125,00 ± 7,52	54,00 ± 8,06	17,02 ± 2,81	0,35 ± 0,03	38,01 ± 6,73	162,85 ± 15,00	81,54 ± 3,75

Tabela 44 - Níveis séricos de glicose (mg/dL); colesterol (mg/dL); uréia (mg/dL) e creatinina (mg/dL); e atividades das enzimas (U/L) alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST), obtidos, no 18º dia de vida, por meio de *pool* sanguíneo, de filhotes fêmeas de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram analisadas 10 amostras por grupo

	Glicose	Colesterol	Uréia	Creatinina	ALT	FA	AST
Controle	89,00 ± 7,85	52,41 ± 9,45	18,22 ± 5,41	0,35 ± 0,01	35,01 ± 4,53	160,87 ± 16,47	83,08 ± 4,27
FCL1	141,58 ± 9,22	54,22 ± 9,52	18,00 ± 4,27	0,36 ± 0,01	35,04 ± 5,00	162,05 ± 16,06	82,04 ± 4,06
FCL2	123,13 ± 8,99	50,01 ± 9,12	18,05 ± 4,83	0,35 ± 0,03	35,06 ± 5,40	167,00 ± 16,04	80,52 ± 4,00
FCL3	101,82 ± 10,01	59,41 ± 8,72	18,01 ± 5,54	0,38 ± 0,01	35,75 ± 5,13	164,35 ± 16,00	87,27 ± 4,12
FSL1	118,63 ± 6,79	52,21 ± 9,18	18,00 ± 5,44	0,35 ± 0,02	35,00 ± 5,04	167,14 ± 16,85	85,51 ± 4,19
FSL2	121,63 ± 8,87	56,74 ± 10,06	18,07 ± 5,87	0,35 ± 0,02	35,47 ± 5,04	162,21 ± 16,24	85,00 ± 4,54
FSL3	125,00 ± 9,47	56,45 ± 8,54	18,54 ± 5,52	0,35 ± 0,01	34,78 ± 4,97	160,45 ± 15,78	88,54 ± 4,81

Tabela 45 – Produção média de leite (g/10 horas), no 14º dia de lactação de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. Os dados apresentados foram obtidos considerando-se a diferença de peso materno antes e após a mamada (PM), ou considerando-se a diferença de peso dos filhotes após e antes a mamada (PF). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizados os pesos corpóreos de 10 animais, lactantes, e a média do peso de 10 ninhadas, em cada grupo

Grupos	Produção láctea (g/10 horas)	
	PM	PF
Controle	14,56 ± 0,98*	11,44 ± 0,65
FCL1	15,70 ± 1,16*	12,40 ± 0,67
FCL2	14,00 ± 0,89*	10,40 ± 0,50
FCL3	15,50 ± 1,20*	11,30 ± 0,86
FSL1	15,70 ± 1,00*	11,90 ± 0,95
FSL2	14,90 ± 1,52	11,80 ± 1,11
FSL3	13,40 ± 1,39	11,00 ± 1,10

*p<0,05 em relação à produção de leite comparando-se com o peso das ninhadas (PF), em um mesmo grupo

Figura 29 - Produção média de leite (g/10 horas), no 14º dia de lactação de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. Os dados apresentados foram obtidos considerando-se a diferença de peso materno antes e após a mamada (PM), ou considerando-se a diferença de peso dos filhotes após e antes a mamada (PF). Foram utilizados os pesos corpóreos de 10 animais, lactantes, e a média do peso de 10 ninhadas, em cada grupo

* $p < 0,05$ em relação à produção de leite comparando-se ao peso das ninhadas (PF), em um mesmo grupo

Tabela 46 – Níveis séricos e lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas e suas proles, avaliados no 19º e 18º dia da lactação, respectivamente. As mães receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. Foram utilizadas 10 amostras por grupo

Níveis de tiocianato (mcmol/L)				
	Mães		Prole	
			Machos	Fêmeas
	Leite	Soro	Soro	Soro
Controle	45,22 ± 4,48	29,14 ± 5,90	69,40 ± 5,71 [#]	71,43 ± 4,26 [#]
FCL1	83,28 ± 8,17*	44,24 ± 6,71	102,97 ± 6,57*; [#]	98,27 ± 8,82 [#]
FCL2	124,89 ± 9,47*	105,18 ± 8,31*	116,16 ± 8,71*	112,08 ± 12,61*
FCL3	240,51 ± 7,32*	225,16 ± 9,47*	143,27 ± 12,34*; [#]	140,33 ± 9,67*; [#]
FSL1	59,44 ± 10,09	49,31 ± 5,30	119,68 ± 8,81*; [#]	106,35 ± 10,04 [#]
FSL2	182,39 ± 7,81*	84,55 ± 10,07*	106,53 ± 6,03*	111,73 ± 10,07*
FSL3	203,39 ± 9,72*	272,11 ± 10,69*	159,18 ± 11,64*; [#]	183,70 ± 10,64*; [#]

*p< 0,05 em relação ao grupo controle

[#]p<0,05 em relação às mães, em um mesmo grupo e meio biológico avaliado

Figura 31 - Níveis lácteos de tiocianato (mcmol/L) de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação

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

Figura 32 - Níveis séricos de tiocianato (mcmol/L) de filhotes machos, no 18º dia de vida, de ratas que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianeto de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3), do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação

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

Tabela 47 – Intensidade das lesões histológicas observadas em ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianato de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3) do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram avaliados 3 animais em cada grupo

	Controle	FCL1	FCL2	FCL3	FSL1	FSL2	FSL3
Tecido renal							
Congestão renal	-	+	+	++	-	+	++
Nefrose	-	-	-	-	-	-	++
Hemorragia renal	-	-	-	+	-	-	+
Hemossiderose	-	-	-	+	-	-	-
Tecido hepático							
Congestão hepática	-	+	+	++	-	+	-
Vacuolização de hepatócitos	-	-	+	+	-	-	+
Proliferação dos ductos biliares	-	-	-	-	-	-	+
Tecido nervoso							
Congestão no SNC	-	-	+	++	-	-	+
Neuronofagia	-	-	-	+	-	-	+
Áreas hemorrágicas no SNC	-	-	-	+	-	-	-
Gliose	-	-	-	++	-	+	++
Necrose	-	-	-	+	-	-	-
Tireóide							
Aumento de reabsorção no colóide dos folículos	-	+	++	+++	+	++	+++

Tabela 48 – Intensidade das lesões histológicas observadas em filhotes, no 18º dia de vida, de ratas, que receberam, por via oral, na água de bebida, diferentes doses de cianato de potássio (KCN): 1 (FCL1); 3 (FCL2) e 30 mg/kg (FCL3) ou tiocianato de potássio (KSCN): 0,8 (FSL1); 2,4 (FSL2) e 24 mg/kg (FSL3) do 1º ao 18º dia de lactação e submetidas à eutanásia no 19º dia da lactação. A intensidade foi caracterizada por meio de escores: (-) sem lesão; (+) lesões brandas, (++) lesões moderadas, (+++) lesões severas. Foram avaliados 3 animais em cada grupo

	Controle	FCL1	FCL2	FCL3	FSL1	FSL2	FSL3
Tecido renal							
Congestão renal	-	-	+	++	-	+	++
Tecido hepático							
Congestão hepática	-	-	+	++	-	+	++
Vacuolização de hepatócitos	-	-	-	+	-	-	+
Proliferação dos ductos biliares	-	-	-	+	-	-	+
Tecido nervoso							
Congestão no SNC	-	-	+	++	-	+	++
Neuronofagia	-	-	-	+	-	-	+
Gliose	-	-	-	++	-	-	++

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O cianeto é um íon muito estudado em toxicologia e tem sido associado a vários episódios de intoxicação, como: ingestão de alimentos e água contaminados, guerra química, suicídios, homicídios, nível ocupacional e utilização em determinados medicamentos (EL GHAWABJ et al., 1975.; MA; PRITSOS, 1997; SOLDAN et al., 2001; SHULZ; BONN; KINDLER, 1979; WATTS, 1998; WAY, 1984). Nos animais, as principais fontes de exposição ao cianeto são de origem vegetal e em efluentes nas proximidades de indústrias que utilizam-no em alguma etapa de seu processo (SAAD, CAMARGO, 1967). Somente os Estados Unidos produzem 300.000 toneladas desta substância, por ano, para alimentar suas indústrias de eletroplatação, de papel e plástico, e na extração de ouro (UNITED STATES ARMY, 1999).

Além da intoxicação aguda pelo cianeto, vários estudos apontam, cada vez mais, o risco dos efeitos tóxicos produzido por este íon, quando da exposição prolongada (MCMILLAN; GEEVARGHESE, 1979; OKOLIE; OSAGIE, 1999; RAGOOBIRSINGH; ROBINSON; MORISON, 1993; SPENCER, 1999). De fato, pesquisas realizadas com esta substância, em diferentes espécies animais, mostram a sua grande relevância tanto no que se refere à saúde pública quanto à animal, podendo, neste último caso, acarretar também em significantes prejuízos econômicos (DOHERTY; FERM; SMITH, 1982; SOTO-BLANCO, 1999; TEWE; MANNER; GOMES, 1977).

O presente estudo dá continuidade à pesquisa que vem sendo realizada neste mesmo laboratório, avaliando os efeitos tóxicos da exposição prolongada do cianeto em ratos (SOUSA, 2000), verificando-se, agora, a possível toxicidade deste íon, e de seu principal metabólito, o tiocianato, em ratas e em suas proles, durante o período perinatal. A primeira etapa deste estudo visou verificar os níveis séricos de tiocianato, pois estes são utilizados como referência para o monitoramento da exposição prolongada ao cianeto (CARLSSON et al., 1999; POTTER et al., 2001; SOUSA et al., 2003; SPENCER, 1999; THORNE, 2001).

Procurou-se, inicialmente, escolher e padronizar uma técnica de determinação de tiocianato no soro, no líquido amniótico e no leite de ratas que melhor se adequasse às condições deste laboratório, pois, na literatura, são descritas diversas metodologias empregadas para a determinação deste ânion nos vários líquidos biológicos, em diferentes espécies animais (BRUCE et al., 1955; CHEN et al., 1996; KAGE; NAGATA; KUDO, 1996). Dentre estas metodologias, está a técnica de espectrofotometria, inicialmente elaborada por Pettigrew e Fell (1972) e, posteriormente, modificada por Siqueira et al. (1996) e Tominaga e Mídio (1990, 1991) que utilizaram a cromatografia de troca iônica associada à espectrofotometria. Esta técnica está bem padronizada para a determinação da concentração de tiocianato na urina e no plasma tanto de humanos (SIQUEIRA et al., 1996; TOMINAGA; MÍDIO, 1990, 1991), como no plasma de caprinos, suínos e ratos (MANZANO, 2001; SOTO-BLANCO, 1999; SOUSA, 2000). Assim, foi necessário, nesta etapa, aprimorar a metodologia que utiliza a espectrofotometria, para a determinação do tiocianato, agora também no leite e líquido amniótico de ratas, e suas características definidas, pois a validação de qualquer metodologia analítica é primordial para garantir a qualidade e a confiabilidade dos dados (CHANSIN et al.,

1998). Para tal, esta técnica, de espectrofotometria, já implantada neste laboratório, foi, no presente estudo, otimizada, substituindo-se a técnica manual para aquela semi-automática e validada para os diversos líquidos biológicos estudados. Com isto, diminui-se o consumo de reagentes e, conseqüentemente, os gastos e a demanda de tempo para estas análises, implementando o estudo com os materiais biológicos anteriormente citados.

A validação da metodologia compreendeu o estudo da linearidade da resposta, a confecção da curva de calibração e a determinação da precisão e recuperação do tiocianato. De acordo com os resultados obtidos, a metodologia foi considerada adequada, pois apresentou linearidade de resposta, obtendo-se como valores do coeficiente de variação de 1,2 a 3,7 % intra dia, e de 2,6 a 7,2 % 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 recuperação média do tiocianato foi de 99,7 e 97,5; 89,7 e 83,4; 98,0 e 82,1 para os meios biológicos, a saber: soro, leite e líquido amniótico, adicionados de solução padrão nas concentrações de 25 e 300 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. A título de exemplo e para comparar com os dados disponíveis na literatura, verifica-se que Bruce et al. (1955); Imanari, Tanabe e Toida (1982); Siqueira et al. (1996); Toida et al. (1984) e Tominaga e Mídio (1991) obtiveram 100%, 97,7%, 92,8%, 98,3% e 96,3%, respectivamente, de recuperação do tiocianato, em sangue. Portanto, os valores obtidos na presente pesquisa mostraram-se adequados para todos os materiais biológicos analisados.

Sabe-se que os níveis plasmáticos constantemente elevados do tiocianato é fundamental para o desenvolvimento das patologias associadas à exposição prolongada ao cianeto (SPENCER, 1999). Embora haja vários estudos

em diferentes espécies animais, relatando os efeitos tóxicos devido à exposição prolongada ao cianeto, as informações sobre a toxicocinética do cianeto e de seu principal metabólito, o tiocianato, são bastante limitadas, o que torna muito difícil interpretar os achados toxicológicos e avaliar os riscos de exposição que estas substâncias possam causar; e, embora a absorção, a transformação e a eliminação deste íon e de seu metabólito, têm sido estudadas em várias espécies de animais, o perfil da cinética de transformação do cianeto em tiocianato tem recebido muito pouca atenção. De fato, não há na literatura, descrição da avaliação comparativa entre a fase de estro, na gestação e na lactação, em relação ao perfil toxicocinético destas substâncias, em nenhuma espécie animal. Desta forma, partiu-se, numa próxima etapa, para o estudo da cinética de transformação do cianeto em tiocianato. A dose de KCN utilizada em tal estudo foi de 3,0 mg/kg, pois pesquisas anteriores em porcos, caprinos e ratos (MANZANO, 2001; SOTO-BLANCO; GÓRNIK; KIMURA, 2001; SOUSA et al. 2003) mostraram que esta dose, administrada, mesmo de uma só vez, não promoveu os sinais e sintomas típicos, nem letalidade, reportada na intoxicação aguda pelo cianeto. Além disto, aquelas pesquisas prévias revelaram que a administração de 3,0 mg/kg de KCN gerou concentrações detectáveis de tiocianato no sangue dos animais tratados.

A administração pela via oral foi a de eleição, já que é esta a principal via de exposição ao cianeto, tanto para humanos como para os animais (WAY, 1984). Além disto, a propagação de xenobióticos se faz, preferencialmente, por via oral, por meio da água de bebida e do alimento, e estas formas de administração têm sido amplamente utilizadas em estudos de toxicologia, devido à conveniência, baixo custo e mínimo estresse ao animal (YUAN, 1993). Por outro lado, a administração do agente tóxico, por via oral, veiculada na alimentação ou na água de bebida,

apresenta inconvenientes, sendo um deles, a dificuldade na padronização da concentração em um meio biológico em relação a uma determinada dose do agente tóxico em estudo, pois há grandes flutuações no consumo de água ou alimento. Neste sentido, por exemplo, estudos conduzidos pelo *The National Toxicology Program*, EUA, indicam que a incidência de mortes, quando se administra um determinado agente tóxico, por água de bebida ou alimento é, geralmente, muito menor do que aquela quando os animais recebem este toxicante, na mesma dose, através de gavagem (YUAN, 1993). Por outro lado, a utilização da gavagem apresenta também desvantagens; assim, tem sido demonstrado, em alguns estudos toxicológicos, que a administração, por via oral, de uma só vez, de um determinado agente tóxico, pode promover a saturação, tanto dos processos de biotransformação, quanto os de eliminação de xenobióticos (YUAN et al., 1995).

Em relação aos parâmetros toxicocinéticos avaliados, estes devem ser comparados entre os experimentos, com formas diferentes de administração, pois os processos de absorção, biotransformação e eliminação poderão comportar-se diferentemente. De fato, foi demonstrado que o alcalóide xantínico, cafeína, quando administrado, por gavagem, às ratas gestantes, produz proles com ectodactilia; no entanto, este efeito não foi observado quando as mães receberam este alcalóide, na mesma dose, veiculado à água de bebida. Esta discrepância de efeitos, segundo os autores, estaria vinculado, diretamente, às diferenças na toxicocinética entre uma e outra forma de administração (SMITH; CLARK, 1987). Em um outro estudo, Yuan et al. (1995) observaram em ratos, que os efeitos carcinogênicos da exposição ao composto benzil acetato por gavagem são mais pronunciados, que aqueles em que se administra esta substância veiculada ao alimento. Estes autores atribuem o efeito carcinogênico, quando da administração por via intra esofágica, do composto,

devido à maior formação de um metabólito intermediário, o qual possui a ação carcinogênica de fato. Portanto, pode-se inferir que a forma de administração de um determinado agente tóxico são passíveis de interferência significativa na toxicodinâmica. Além disto, deve-se considerar que a formação de metabólitos podem ser, em alguns casos, a responsável pela toxicidade.

Vale ressaltar que, neste estudo, não foram realizadas administrações do cianeto pelo alimento, pois este íon é bastante volátil, não sendo, portanto, tecnicamente possível a incorporação do cianeto à ração. De fato, estudos anteriores, conduzidos neste laboratório, identificaram grandes perdas quando da peletização da ração contendo o KCN.

A cinética de uma substância química em um organismo, seja fármaco ou toxicante, pode ser bastante complexa, já que vários processos, tais como a absorção, a distribuição e a eliminação, atuam alterando as concentrações nos tecidos e líquidos. Desta forma, são necessárias simplificações para prever o comportamento das substâncias no organismo. Um modo de se obter estas simplificações é aplicar modelos matemáticos para os vários processos (DIPIRO et al., 1996). Um tipo clássico de modelo utilizado em toxicocinética é o modelo compartimental e, geralmente, utiliza-se modelos que melhor descrevem as flutuações na concentração do xenobiótico, ao longo do tempo. Por exemplo, os aminoglicosídeos, que não se distribuem extensivamente nos tecidos extravasculares, devido, principalmente, ao caráter polar, são descritos no modelo mono compartimental. Já os benzodiazepínicos, que são moléculas apolares, são melhores descritos por modelos mais complexos (DIPIRO et al., 1996). Portanto, pelas características da molécula do tiocianato, ou seja, polar, bem como pelo tipo de gráfico da concentração *versus* o tempo, pode-se caracterizar a cinética de

transformação do cianeto em tiocianato como um modelo mono compartimental. Neste modelo assume-se que, após a administração de uma dose, ocorre uma distribuição instantânea por todo o organismo, embora os processos de absorção e eliminação sejam bastante dinâmicos.

Os resultados obtidos, neste estudo, mostraram o aumento significativo nos níveis plasmáticos de tiocianato da 3^a até a 24^a hora, após o tratamento com o KCN, em ambas as formas de administração, em ratas, tanto na fase estrogênica como na de lactação. Por outro lado, ratas gestantes apresentaram níveis plasmáticos elevados do metabólito do cianeto somente da 3^a até a 12^a hora, após a administração do KCN, tanto por gavagem, como na água de bebida. Este dado mostra, portanto, que os níveis séricos de tiocianato materno foram mais fugazes que aqueles encontrados nas ratas virgens e lactantes. Por outro lado, deve-se considerar que nas fêmeas gestantes o xenobiótico, o seu metabólito, ou ambos podem atingir outros locais, como o líquido amniótico e o feto. Portanto, a hipótese mais provável para explicar esta peculiaridade nas gestantes seria de que o tiocianato não estaria restrito somente ao organismo materno, mas também ao fetal, bem como no líquido amniótico.

Um outro achado interessante nesta avaliação foi a observação de que aquelas fêmeas que receberam o KCN por gavagem, apresentaram, de maneira geral, níveis de tiocianato superiores, quando comparados com aqueles de fêmeas tratadas com o agente tóxico na água de bebida. Deve-se ressaltar que estas alterações foram verificadas nos três estados fisiológicos avaliados: fase estrogênica, de gestação e de lactação. Como a quantidade de KCN administrado na água de bebida não diferiu significativamente daquela administrada por gavagem, nos diferentes estados fisiológicos avaliados, uma possível explicação para tal fato

poderia estar relacionada à quantidade de KCN ingerida, considerando-se o período de tempo para o consumo da dose total do KCN, ou seja, de uma só vez, por gavagem, ou em quantidades pequenas, durante até 12 horas, na água de bebida. Estas diferenças poderiam alterar o tempo necessário para a excreção do metabólito. Neste sentido, verifica-se que a $t_{1/2\beta}$ do tiocianato de fêmeas, que receberam o KCN por gavagem, é maior quando o KCN é administrado por água de bebida; portanto, pode-se supor que haverá, relativamente, maior tempo para a excreção do metabólito e, conseqüentemente, maior concentração sanguínea de tiocianato nos diferentes tempos avaliados, até 24 horas, naqueles animais que receberam o KCN por gavagem. Reforça esta hipótese os dados da C_{max} e do t_{max} . Assim, o parâmetro C_{max} indica o pico da concentração sérica de qualquer substância, neste caso do tiocianato, e o t_{max} refere-se ao tempo em que ocorre este pico. Portanto, quanto maior o valor da C_{max} , maior será a taxa de transformação do cianeto em tiocianato. Assim, a análise dos dados relativos aos parâmetros toxicocinéticos, comparando-se as duas vias, os valores de C_{max} do tiocianato foram maiores, quando administrou-se o KCN por gavagem em um t_{max} menor, em relação à água de bebida. Desta maneira, a transformação do cianeto em tiocianato é mais rápida quando a administração é realizada pela via gavagem.

Um outro importante dado obtido neste estudo toxicocinético foi aquele que mostrou que os níveis séricos de tiocianato de ratas na fase estrogênica foram sempre superiores àqueles obtidos tanto de fêmeas gestantes quanto de lactantes, a partir da 3ª hora após a administração do cianeto, tanto por gavagem quanto na água de bebida, até o final da avaliação. Uma possível explicação para este fato poderia estar relacionado à redistribuição do tiocianato, em outros órgãos ou líquidos corporais, naquelas fêmeas gestantes e na fase de lactação. Reforça esta hipótese

aqueles achados relativos à dosagem dos níveis de tiocianato no leite e no líquido amniótico. Assim, foram observados aumentos nos níveis lácteos do tiocianato nas fêmeas, tanto as tratadas com o KCN por gavagem quanto na água de bebida, a partir da primeira dosagem, ou seja, já aos 30 minutos após a administração de KCN, sendo que estes níveis elevados persistiram até a 24^a hora desta avaliação. Neste sentido, um estudo conduzido por Pavelka et al. (2002) mostrou que o iodeto ingerido concentra-se também na glândula mamária. Uma vez que é amplamente conhecido que o tiocianato compete com o iodeto na glândula tireóide (DOHAN; DE LA VIEJA; CARRASCO, 2000), o aumento da concentração do metabólito do cianeto na glândula mamária poderia estar também relacionado à competição deste íon com o iodeto e, desta maneira, acumulando-se neste local.

Em relação ao líquido amniótico, embora a diferença significativa nos níveis de tiocianato tenha sido observado somente na 3^a hora e apenas naquelas fêmeas tratadas com KCN por gavagem, em todas as avaliações subsequentes, deste meio biológico, verificou-se que, tanto por gavagem quanto na água de bebida, foram detectados níveis superiores de tiocianato, quando comparados ao tempo zero. Além do líquido amniótico, deve-se considerar, também, a passagem do cianeto para o compartimento fetal. De fato, segundo Dencker e Danielsson (1987) e Schwartz (2001), substâncias aniônicas, tais como os ácidos fracos, neste estudo, o ácido cianídrico, podem acumular no embrião de rato, possivelmente devido ao gradiente de pH entre o plasma materno, que é mais ácido em relação ao pH do feto, tornando este composto na forma ionizável no embrião. Portanto, nesta situação, haverá o “aprisionamento” deste íon no organismo fetal (SCOTT; NAU, 1987). Ainda, como em ratos, tanto na placenta como no feto, existe a enzima rodanase (TEWE et al., 1977), responsável pela transformação do cianeto em

tiocianato, pode-se teorizar que o cianeto “aprisionado” poderá ser transformado em seu metabólito.

Vale ressaltar que a inclusão na análise da redistribuição do tiocianato no leite e no líquido amniótico foi de fundamental importância para a interpretação correta dos dados obtidos no estudo toxicocinético, pois se levar em consideração somente os parâmetros C_{max} e t_{max} de ratas que receberam o KCN, tanto na água de bebida quanto por gavagem, poder-se-ia concluir, erroneamente, que as fêmeas gestantes biotransformam menos o cianeto, quando comparadas às ratas lactantes e àquelas em fase de estro.

Estima-se que aproximadamente 80% do cianeto absorvido é transformado em tiocianato, o qual é quase completamente eliminado pelos rins (ANSELL; LEWIS, 1970). Portanto, a eficiência da excreção renal é um fator determinante para a eliminação e o estágio fisiológico no qual o animal se encontra deve ser um fator que afeta consideravelmente a sua eficiência. Sabe-se que quanto maior for o valor do *clearance*, maior será a eliminação do xenobiótico (VRIES, 1996). No entanto, deve-se considerar que a $t_{1/2\beta}$ de uma determinada substância é dependente, não só da taxa de eliminação mas também da distribuição. Por conseguinte, se uma substância apresenta uma $t_{1/2\beta}$ longa, esta não estaria necessariamente relacionada somente ao *clearance* baixo, mas também a um alto valor do V_d (BIRKETT, 1988; NAU, 1987). De fato, os dados obtidos na presente pesquisa mostraram que o *clearance* do tiocianato foi superior naquelas fêmeas na fase de estro, que receberam o KCN na água de bebida, quando comparou-se este parâmetro com aqueles dos outros grupos de animais, nas diferentes fases fisiológicas, que receberam o KCN de ambas as formas. No entanto, de todos os grupos de ratas avaliadas, foram aquelas gestantes, que receberam o KCN por

gavage, que apresentaram $t_{1/2\beta}$ maior. Como o V_d destes animais mostrou-se como um dos mais alto, pode-se concluir que, de fato, este parâmetro tem papel fundamental para a melhor interpretação da $t_{1/2\beta}$.

O parâmetro ASC está relacionado ao *clearance*, por exemplo, de um agente tóxico em estudo, e quanto maior seu valor, menor o *clearance* e, portanto, maior a exposição ao xenobiótico (VRIES, 1996). Os resultados aqui obtidos mostraram que os maiores valores de ASC foram verificados em ratas na fase estrogênica. Portanto, pode-se hipotetizar que os animais neste estado fisiológico estão mais expostos ao tiocianato e, conseqüentemente, mais susceptíveis aos efeitos tóxicos desta substância. Ainda, considerando-se este parâmetro, ao comparar as duas formas de administração do cianeto: gavage e água de bebida, verifica-se que os valores de ASC são menores quando da administração do KCN na água de bebida. Uma possível justificativa para este achado estaria relacionada à ingestão que, pela água de bebida, ocorre de maneira gradual, o que mimetizaria pequenas seções de gavage. Portanto, a transformação do cianeto em tiocianato e a eliminação deste último podem estar ocorrendo de maneira simultânea a cada seção; enquanto que na administração do KCN intra esofagiano este fato não ocorre.

Partindo de dados disponíveis na literatura de que ratos toleram até 30 mg/kg/dia de KCN, quando administrados de maneira fracionada e que a dose letal de KCN para ratos (DL_{50}) é de 10 mg/kg/dose (BALLANTYNE, 1987) optou-se, nesta pesquisa, por administrar nas fêmeas, gestantes ou lactantes, as doses de 1, 3 e 30 mg/kg/dia de KCN. Como já mencionado, uma vez que a grande maioria do cianeto é biotransformado em tiocianato - cerca de 80% - (ANSELL e LEWIS, 1970), foram

escolhidas as doses de 0,8; 2,4 e 24 mg/kg/dia de KSCN, o que equivaleria, respectivamente, à menor, intermediária e maior dose do KCN aqui utilizado.

Optou-se por realizar a administração prolongada do KCN e do KSCN, por via oral, na água de bebida, uma vez que o método por gavagem poderia produzir, grande estresse nos animais, e este acarretar em abortamentos. Além disto, o método de administração intra esofágico não permitiria submeter os animais a administrações de doses superiores a 10 mg/kg de KCN, pois esta sabidamente produz sinais claros de intoxicação aguda em ratos (SOUSA, 2000). Para maior confiabilidade neste procedimento, foi necessário avaliar o consumo da água contendo KCN e KSCN, pois a adição destas substâncias poderiam alterar a palatabilidade, causando maior ou menor consumo de água. No entanto, os resultados obtidos revelaram não haver queda no consumo de água pelos animais destes grupos, permitindo concluir, portanto, que este procedimento de administração mostrou-se adequado.

Uma vez que a implantação embrionária em ratos ocorre até o 5º dia de gestação (SZABO, 1988), e como o presente estudo não objetivava avaliar as alterações na pré-implantação, escolheu-se por administrar o KCN e o KSCN na água de bebida, do 6º ao 20º dia de prenhez. Assim, neste estudo, as gestantes foram expostas às diferentes doses dos toxicantes por 14 dias.

O peso corporal é um dos principais parâmetros de avaliação toxicológica, apresentando para o investigador um aviso, muitas vezes precoce, do aparecimento dos efeitos tóxicos de uma determinada substância nos animais (STEVENS; GALLO, 1989). Vários são os trabalhos que associaram a intoxicação prolongada do cianeto à queda do ganho de peso. Assim, Panigrahi et al. (1992) verificaram queda no ganho de peso em frangos de corte; Doherty, Ferman e Smith (1982) em hamsters;

Aletor (1993) e Guzmán, Ochoa e Gil (1977) em ratos; Soto-Blanco (2002) em caprinos e Manzano (2001) em suínos. Ainda, Blanc et al. (1985) verificaram este efeito em humanos expostos ocupacionalmente ao cianeto. No presente estudo não foram evidenciados queda no ganho de peso das gestantes e no consumo de ração, nas ratas dos diversos grupos experimentais que receberam as diferentes doses de KCN ou KSCN. Por outro lado, um estudo realizado, neste laboratório, utilizando-se ratos machos, nos quais se administrou o KCN, também na água de bebida, durante este mesmo período, 14 dias, na dose de 9,0 e 12,0 mg/kg, ou seja, quase 1/3 menor do que a dose máxima aqui utilizada, revelou haver alteração no ganho de peso (SOUSA, 2000). Desta maneira, pode-se inferir que o estado fisiológico ou o sexo, ou ambas variáveis, alteram a toxicidade ao cianeto, considerando-se o parâmetro peso.

Diversos sistemas do organismo são afetados na intoxicação prolongada pelo cianeto (SPENCER, 1999), razão pela qual vários parâmetros devem ser utilizados para avaliar estes efeitos. Entre estas principais manifestações tóxicas está o bócio. De fato, vários trabalhos, em diferentes espécies de animais, tais como em ratos (TEWE; MANNER; GOMES, 1977), cães (KAMALU; AGHARANYA, 1991), suínos (MANZANO, 2001; OKE, 1984; ONG, 1989; TEWE et al., 1984), e também no homem (ADEWUSI; AKINDAHUNSI, 1994), apontam o efeito tireotóxico produzido pela exposição contínua e prolongada ao cianeto. O mecanismo desta ação tóxica está bem estabelecido, sendo este a competição do tiocianato com o iodeto na proteína transportadora deste íon, na tireóide, diminuindo, portanto, a captação de iodeto por esta glândula (CARRASCO, 1993; DELANGE; ERMANS, 1996; KONDE et al., 1994; PHILBRICK et al., 1979).

A presente pesquisa revelou no estudo histopatológico das tireóides das gestantes, que receberam as maiores doses de KCN e KSCN, a presença de grande quantidade de vacúolos de reabsorção no colóide dos folículos tireoideanos. Vale ressaltar que, embora em menor quantidade, estes vacúolos também foram encontrados nos demais animais prenhes dos diferentes grupos experimentais. Segundo Kaneko (1989), há dois tipos de bócio, aquele não tóxico, o qual é, ainda, subdividido em bócio simples e hipotireoidismo, e o tóxico. No bócio simples, os níveis dos hormônios tireoideanos estão na faixa de normalidade, pois há o aumento compensatório na massa glandular da tireóide, maximizando a captura de iodeto e secretando quantidades normais dos hormônios tireoideanos. Caso o estímulo prossiga, o bócio simples pode evoluir para o hipotireoidismo, quando os níveis dos hormônios tireoideanos estão diminuídos, evidenciando, desta forma, os sinais clínicos como a obesidade, o mixedema, a pele seca, perdas de pelos e cabelos e, na forma mais grave, o aparecimento do cretinismo. Portanto, pode-se sugerir que o aparecimento de grande quantidade de vacúolos de reabsorção caracterize o bócio simples nestes animais. Reforça esta hipótese, o estudo conduzido por Carcangiu (1997), o qual associou estes vacúolos ao aumento da atividade secretora da glândula tireóide.

Por outro lado, a avaliação bioquímica destas mães, mostraram, ao contrário do que se supunha, não haver alterações nos níveis de colesterol, um parâmetro utilizado para a avaliação da função da tireóide (TANIS; WESTENDORP; SMELT, 1996). Assim, sabe-se que a concentração desta substância é inversamente proporcional àquelas dos hormônios tireoideanos. Portanto, no hipotireoidismo, os níveis sanguíneos de colesterol apresentam-se elevados, em qualquer espécie animal estudada (KANEKO, 1989). Pouco poderia ser especulado, neste momento

sobre este resultado. Uma conjectura seria que a alteração da função hepática poderia acarretar num déficit na produção de colesterol por este órgão. De fato, apesar da avaliação bioquímica mostrar somente alteração da enzima AST, o estudo histopatológico do fígado, nos diferentes grupos experimentais, revelou a presença de congestão hepática, vacuolização dos hepatócitos e proliferação dos ductos biliares, o que poderia estar promovendo o comprometimento das funções deste órgão. Fortalece esta suposição os dados obtidos por Kamalu (1993), em cães, expostos prolongadamente ao cianeto, nos quais também foram verificadas lesões no parênquima hepático.

Um importante efeito produzido pela exposição prolongada pelo cianeto é o neurotóxico. Em seres humanos, as principais manifestações neurológicas são a neuropatia atáxica tropical, o *konzo*, a ambliopia por tabaco, a neurite retrolobular e a atrofia óptica (BANEJA; TYLLESKÄR; ROSLING, 1997; FREEMAN, 1988; NJOH, 1990; OSUNTOKUN, 1979; TYLLESKÄR et al., 1995).

Na presente pesquisa, o estudo histopatológico do SNC das ratas gestantes que receberam as maiores doses, tanto de KCN, quanto de KSCN revelaram significantes alterações neste nível. Estes achados têm significativa contribuição para aquelas pesquisas que objetivam determinar o mecanismo de ação neurotóxico produzido pelo cianeto no SNC. Desta maneira, embora existam várias teorias procurando explicar quais seriam os mecanismos que levariam à neurotoxicidade (BOROWITZ et al., 1994; ISOM; BOROWITZ, 1995; KANTHASAMY et al. 1997; MILLS et al., 1996), a grande maioria destas exclui a possibilidade do tiocianato ser o responsável ou, pelo menos, o coadjuvante neste efeito tóxico. Entretanto, uma vez que este estudo claramente evidenciou que a administração do KSCN, nas fêmeas, produziu lesões no SNC, semelhantes àsquelas verificadas

quando da administração do KCN, e, sabendo-se que a transformação de tiocianato para cianeto não ocorre (BALLANTYNE, 1987; UNITED STATES ARMY, 1999), pode-se supor que o metabólito do cianeto tem participação na neurotoxicidade produzida por esta exposição contínua. Reforça esta teoria, aquela sugerida por Spencer (1999), o qual verificou, em ratos, que o tiocianato modula a função dos receptores dl-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato (AMPA), uma subclasse dos receptores glutaminérgicos, no tecido do SNC. Assim, este pesquisador propõe que o tiocianato potencializaria a resposta mediada por estes receptores, resultando em danos aos neurônios ricos neste tipo de receptor.

O levantamento dos trabalhos encontrados na literatura, referentes aos efeitos tóxicos prolongados produzidos pelo cianeto, mostra ser a alteração da função tireoidiana e as lesões no SNC os principais efeitos tóxicos descritos nesta exposição, nas diferentes espécies animais estudadas. Por outro lado, pesquisas conduzidas por Kamalu (1993), em cães; Okolie e Osagie (1999), em coelhos; e, mais recentemente, Manzano (2001), em suínos, revelam que a intoxicação prolongada por KCN pode, também, causar lesão no parênquima renal. Da mesma maneira, o estudo histopatológico realizado, neste laboratório, no tecido renal de ratos machos, tratados por 14 dias com KCN, revelaram, também, alterações neste órgão (SOUSA et al., 2002). No presente experimento, estas lesões foram também verificadas, nas gestantes tratadas com o KCN e com o KSCN.

Existem algumas hipóteses que tentam explicar o mecanismo de ação nefrotóxico produzido pela exposição prolongada ao cianeto. Uma delas seria a de que os rins, por possuírem também a enzima rodanase, quando da exposição crônica ao cianeto, haveria o comprometimento da função desta enzima, e, conseqüentemente, a formação de radicais livres, promovendo a peroxidação das

membranas de células renais (ALETOR, 1993). Uma outra teoria estaria relacionada ao fato de o tiocianato ser um vasodilatador, podendo este, então, por este mecanismo, acarretar em nefrose. De fato, o tiocianato já foi utilizado, na clínica de humanos, como medicamento anti-hipertensivo, por sua potente atividade vasodilatadora (CARRASCO, 1993). Uma vez que esta pesquisa revelou que aquelas fêmeas tratadas com o KSCN, também apresentaram lesões ao nível renal, entre os prováveis mecanismos de ação nefrotóxica na exposição prolongada ao cianeto, descartar-se a hipótese na qual se propõe a inibição da enzima rodanase, sendo, portanto, a segunda teoria a mais factível.

Uma patologia que também vem sendo associada à exposição prolongada ao cianeto é a diabetes pancreática e do tipo J (MCMILLAN; GEEVARGHESE, 1979). Estas formas de diabetes são encontradas principalmente em regiões tropicais, onde os indivíduos acometidos possuem antecedentes de desnutrição, são insulino-dependentes e resistentes à cetose, e, de maneira geral, são adolescentes ou adultos jovens. A diabetes do tipo J seria a forma branda e a pancreática a mais severa (MCMILLAN; GEEVARGHESE, 1979). McMillan e Geevarghese (1979) encontraram hiperglicemia em ratos expostos prolongadamente ao cianeto; além disto, Kamalu (1991) observou, em cães, aumento na gliconeogênese, hipoinsulinemia e fibrose nas ilhotas de Langerhans.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram depleção de células das ilhotas de Langerhans, naquelas ratas gestantes que receberam a maior dose de KCN. Ainda, a análise bioquímica mostrou que estas fêmeas possuíam níveis maiores de glicose de forma significativa. Segundo Kamalu (1991), o aumento dos níveis de glicose nesta intoxicação seria causado pela ação direta tanto dos íons cianeto quanto do tiocianato no pâncreas, promovendo lesão neste órgão e,

conseqüentemente, a diminuição da secreção de insulina. Uma vez que, no presente estudo não foi observado qualquer alteração, histopatológica ou bioquímica, naquelas gestantes tratadas mesmo com a maior dose de KSCN, inabilita o tiocianato como um possível candidato a produzir a toxicidade no pâncreas endócrino. Portanto, pode-se inferir que a alteração no tecido pancreático é devido ao cianeto, e não ao seu metabólito, o tiocianato.

Ainda, em relação à toxicidade do cianeto no pâncreas, uma comparação interessante é aquela entre os dados obtidos neste laboratório, quando se administrou a ratos machos, durante o mesmo período, o KCN, e os dados agora obtidos em ratas gestantes. Assim, no estudo com os machos, ao contrário do verificado nesta pesquisa, não foi encontrada nenhuma alteração que indicasse qualquer comprometimento do tecido pancreático endócrino. Portanto, a gestação, de alguma maneira, contribuiu para o desencadeamento do efeito tóxico no pâncreas endócrino, produzido pelo cianeto.

Um dado relevante neste estudo foi aquele obtido, quando da avaliação histopatológica, no qual se verificou que fêmeas que receberam o KCN e o KSCN, durante a gestação, continuaram a apresentar alterações histológicas, em todos os tecidos, exceto o pancreático, 22 dias após a última administração dos agentes tóxicos. Como os níveis do tiocianato destas fêmeas experimentais não diferiram daqueles das ratas do grupo controle, pode-se supor que as lesões encontradas foram produzidas na época da exposição a estas substâncias, ou seja, durante a gestação. Reforçam estes dados provenientes da histopatologia aqueles da análise bioquímica, na qual se verificou que as ratas submetidas à maior dose de KCN apresentaram níveis elevados de ALT e uréia. Assim sendo, pode-se hipotetizar que estas lesões produzidas pelo cianeto e/ou tiocianato não são transitórias.

O interesse pelas malformações congênitas datam da antigüidade da civilização. Naquele tempo, a explicação para tal fato seria que estas “terras” estavam relacionadas a um evento mitológico ou, principalmente, à punição dos pecados (GILDEN; BODEWITZ, 1991). No entanto, as malformações nunca despertaram interesse pela comunidade científica, até o começo do século passado, quando os cientistas se atinham, praticamente, à incidência de malformações em condições de laboratório e, só esporadicamente, estas alterações eram associadas às situações cotidianas, por exemplo, com a exposição ao vírus da rubéola e à radiação. Foi o desastre com a talidomida, na década de 60, aquele que alterou o curso destas pesquisas e, deste então são muitos os laboratórios e pesquisadores mobilizados no estudo destes efeitos tóxicos (ROGERS; KAVLOCK, 2001).

Atualmente, esta área da ciência está bem desenvolvida, sendo a mesma denominada de toxicologia do desenvolvimento, a qual é parte da toxicologia reprodutiva, e que é, ainda, subdividida em toxicologia pré e pós-natal (PETERS, 1998). Por outro lado, enquanto hoje em dia, muitas novas informações estão disponíveis sobre a origem das desordens do desenvolvimento, resultante da exposição perinatal de substâncias químicas, há uma grande preocupação dos pesquisadores, relativa à 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 a outra, intermediária entre estas. Esta substância a ser testada deverá ser administrada, no mínimo, da implantação à cesariana. Um dia antes do parto, as fêmeas são submetidas à cesariana, avaliando-se o número de corpos lúteos implantados, sendo os fetos e as placentas pesados e, a seguir, metade da prole utilizada para avaliação esquelética e a outra metade para pesquisa de anormalidades viscerais (OECD, 1996; USEPA, 1991; WHO, 1967).

Segundo Claudio et al. (1999), a maior limitação destes protocolos de avaliação de toxicidade é que não há o exame dos filhotes, em nenhuma fase pós-natal, o que, na maioria das vezes, poderá levar a erros no julgamento sobre o efeito teratogênico da substância testada. De fato, por exemplo, o heptacloro, pode causar aumento de morte pós-natal, depois do 6º dia do nascimento. Ainda, esta substância pode produzir catarata, que se manifesta somente após o 21º dia de vida (NAROTSKY; KAVLOCK, 1995). Além desta, uma outra crítica bastante procedente, destes mesmos autores, aos protocolos de avaliação de toxicidade do desenvolvimento, refere-se à carência de dados toxicocinéticos, antes de se realizar estes testes, ficando bastante subjetiva a escolha das três doses do xenobiótico a ser avaliado, bem como do comportamento cinético da substância em estudo.

Portanto, a presente pesquisa visou verificar os possíveis efeitos teratogênicos quando da exposição ao cianeto, avaliando-se o efeito desta substância na prole, não só por meio do protocolo convencional mas também após o nascimento.

Escassos são os trabalhos na literatura, relatando os efeitos tóxicos perinatais produzidos pelo cianeto e seu principal metabólito, o tiocianato, nas diferentes espécies animais e, mesmo nestas pesquisas existentes, os dados são

bastante controversos. Assim, Tewe, Manner e Gomez (1977) verificaram que, embora houvesse aumento dos níveis de tiocianato na urina, no soro, no líquido amniótico de ratas gestantes, cujas dietas continham cianeto, mandioca fresca ou processada, não foi observada qualquer alteração em suas proles. Por outro lado, Singh (1981) relatou um alto índice de malformações, tais como retardo no crescimento, bem como defeitos em membros de fetos de ratas cuja dieta básica durante a prenhez consistia em 80% de farinha de mandioca. Uma possível explicação para esta divergência nos achados, entre as duas pesquisas, poderia estar relacionada aos níveis de KCN ingeridos pelas mães, nestes estudos. Além disto, uma crítica a estas pesquisas anteriores seria relativa à quantidade de farinha de mandioca adicionada à ração das gestantes, que poderia causar total desbalanceamento da ração e, conseqüentemente, desnutrição, o que, sabidamente acarreta em efeitos teratogênicos (ROGERS; KAVLOCK, 2001). Portanto, no presente estudo, optou-se por utilizar o KCN, adicionado na água de bebida, com a finalidade de não produzir o desbalanceamento da ração.

A avaliação da *performance* reprodutiva materna é um dos principais parâmetros utilizados nos protocolos convencionais de avaliação de toxicidade do desenvolvimento. Esta avaliação permitiria verificar com maior precisão e profundidade, se o cianeto e o seu principal metabólito produziria efeitos tóxicos, não só diretamente no organismo fetal, mas também na fisiologia reprodutiva da fêmea, o que poderia levar aos efeitos tóxicos no feto. O presente estudo revelou que, de todos os parâmetros pesquisados, a porcentagem de perda pós-implantação foi o único que se apresentou aumentado, e somente naquelas gestantes que receberam 3 e 30 mg/kg/dia de KCN. Quanto às análises óssea e visceral dos fetos, estas revelaram significância apenas no número de fetos com anomalias viscerais, mas

não no número de ninhadas afetadas, e somente naqueles fetos de mães expostas a maior dose de KCN.

Por outro lado, embora não fossem detectadas alterações bioquímicas ou no peso médio do cérebro e cerebelo, a avaliação histológica de filhotes, no 22º dia de vida, de mães tratadas somente durante a gestação, com as maiores doses tanto de KCN, quanto de KSCN, mostraram evidentes as alterações, principalmente ao nível de tecido renal, hepático e SNC. Este dado tem importante contribuição, não só evidenciando os efeitos tóxicos da administração pré-natal do cianeto, mas também reforçando a importância da avaliação pós-natal dos filhotes.

Vale ressaltar que não foram evidenciadas diferenças significantes no ganho de peso e consumo de água entre fêmeas do grupo controle e experimental, durante a fase de gestação, portanto, pode-se descartar a possibilidade de que as alterações aqui encontradas nos filhotes, provenientes de mães que receberam as maiores doses de KCN ou KSCN seriam devido à toxicidade materna, o que, sabidamente, poderia levar, indiretamente à toxicidade fetal (BARROW, 2000; JONG-CHOON KIM et al., 2001; KRAVER, 1987).

Um dado que merece ser melhor explorado em futuras pesquisas é aquele concernente à semelhança e intensidade de lesões produzidas tanto pela administração pelo KCN quanto pelo KSCN, nos filhotes experimentais. Assim, como no organismo não há transformação de tiocianato para cianeto (BALLANTYNE, 1987; UNITED STATES ARMY, 1999), reforça-se a hipótese de que as lesões observadas nos diferentes sistemas, inclusive no SNC, quando da exposição prolongada ao cianeto não estaria relacionada diretamente a esta substância e sim ao seu principal metabólito.

O leite materno é uma mistura complexa cuja composição é dependente das atividades de secreção da glândula mamaria e dos processos de transporte nela existente, refletindo as necessidades nutricionais dos neonatos mamíferos (MCMANAMAN; NEVILLE, 2003). No entanto, o leite pode também ser uma via de excreção materna de substâncias tóxicas (BEGG et al., 2002; OSKARSSON; HALLÉN; SUNDBERG, 1995). De fato, diversas substâncias químicas são capazes de serem transferidas pelo leite, representando uma importante fonte de intoxicação para o neonato. Como exemplos, estão algumas toxinas encontradas em plantas, como alcalóides pirrolizidínicos e ptaquilosídeos (ALONSO-AMELOT, 1997; MEDEIROS; GÓRNIK; GUERRA, 1999) e alguns contaminantes ambientais como o mercúrio e o chumbo (OSKARSSON; HALLÉN; SUNDBERG, 1995; ROZMAN; KLAASSEN, 2001).

Deve-se ressaltar que a lactação é um período no qual os recém-nascidos são mais sensíveis que os adultos aos efeitos tóxicos das substâncias químicas, já que se sabe que o neonato tem baixa capacidade de biotransformar os xenobióticos pela imaturidade dos sistemas enzimáticos (ALCORN; MCNAMARA, 2003.). Acrescente-se, também, que certos sistemas irão se desenvolver completamente somente no período pós-natal. Por exemplo, o SNC no rato se forma completamente ao redor do 21º dia de vida (KAUFMANN, 2000) e, neste caso, existem claras evidências que este sistema em desenvolvimento é muito mais sensível, em relação ao SNC de ratos adultos, aos vários toxicantes (TILSON, 2000).

Por outro lado, a despeito da grande importância da excreção de vários xenobióticos no leite e suas prováveis conseqüências na saúde do neonato, surpreendentemente, muito pouca atenção tem sido dada à toxicologia do desenvolvimento pós-natal e a exposição aos diferentes agentes tóxicos pelo leite

(FLEISHAKER, 2002). De fato, Loebstein, Lalkin e Koren (1997) apontam que há grandes lacunas nas informações sobre a transferência para o leite, em humanos e animais, de substâncias químicas, bem como a extensão da exposição do lactente aos xenobióticos. Portanto, foi também objetivo da presente pesquisa, avaliar os possíveis efeitos tóxicos na prole de ratas expostas ao KCN e ao KSCN, durante o período de lactação.

Partindo-se do conhecimento que ratos neonatos não acessam a água de bebida antes do 18º dia de vida (PAVELKA, et al., 2002), optou-se por administrar o KCN e o KSCN, até esta data, já que este procedimento permitiria que apenas as lactantes ingerissem a dieta hídrica, impossibilitando, assim, que os filhotes se expusessem diretamente a estes xenobióticos. Portanto, os possíveis efeitos tóxicos observados nos filhotes seriam mediados exclusivamente pela ingestão do leite materno.

Esta pesquisa revelou que lactantes, tratadas com as maiores doses de KCN ou KSCN, apresentaram níveis séricos de tiocianato significativamente maiores que aquelas do grupo controle; e, da mesma maneira que o ocorrido com aquelas fêmeas gestantes, embora a avaliação relativa tanto ao consumo de ração e peso, bem como à bioquímica não revelasse qualquer alteração nos parâmetros pesquisados, o estudo histopatológico mostrou lesões no tecido nervoso, hepático e renal e, ainda, foram verificados aumento de reabsorção no colóide dos folículos tireoideanos. No entanto, este mesmo experimento não mostrou qualquer alteração no pâncreas endócrino, como o verificado naquelas ratas tratadas com os agentes tóxicos durante a prenhez. A ausência de alteração neste último órgão pode reforçar a suposição, aqui levantada, que, de alguma maneira, este estado fisiológico, ou seja, a gestação, contribui para a depleção de células das ilhotas de Langerhans.

Ainda, em relação à dosagem de tiocianato destas mães lactantes, este estudo evidenciou o aumento nos níveis desta substância no leite de todas as lactantes dos diferentes grupos experimentais que receberam o KCN, bem como naquelas tratadas com as maiores doses de KSCN. Este achado corrobora com outros estudos, os quais verificaram que a concentração láctea do tiocianato é diretamente influenciada pela dieta (GARG; GUPTA, 1987; MOATE et al., 1996; SAHA; SINGHAL, 1993; SUBUH et al., 1995;).

O leite é composto por três frações: aquosa, lipídica e protéica. Dependendo de suas características físico-químicas, os xenobióticos podem estar presentes em quaisquer destas porções. Há fortes indícios de que o tiocianato fique, em grande parte, ligado às proteínas do leite (LUNDQUIST et al., 1985). Entretanto, pouco poderia ser especulado sobre a maneira pela qual há a passagem do tiocianato para a glândula mamaria, já que, no presente momento, há poucas informações disponíveis na literatura a respeito dos mecanismos e fatores que regulam a entrada de substâncias químicas no leite. Dentre estas poucas informações, existe aquela teoria a qual propõe ser a difusão passiva o principal meio de transferência para a glândula mamaria da maioria dos xenobióticos (LOEBSTEIN; LALKIN; KOREN, 1997).

No entanto, o acúmulo de certos fármacos como a cimetidina e a ranitidina, no leite de ratas, em níveis superiores àqueles esperados pela simples difusão passiva, sugerem, também, a presença de processos de transporte ativo, mediado por transportadores ou carregadores na glândula mamaria (MCNAMRA; MEECE; PAXTON, 1996). Neste sentido, existem estudos que mostram que o epitélio mamário pode expressar certas proteínas transportadoras de xenobióticos, as quais são, também, encontradas no epitélio renal e hepático (ITO; ALCORN,

2003). Estes transportadores de xenobióticos, como por exemplo, a P-glicoproteína que media o efluxo de toxicantes, através do epitélio, podem ter a única finalidade de eliminação de agentes tóxicos. Ainda, existem as proteínas que transportam tanto substâncias fisiológicas essenciais, como glicose, proteínas e peptídeos, como também xenobióticos. Por exemplo, os polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs), os quais são encontrados no epitélio da glândula mamária, tanto de humanos como de ratos, e estão envolvidos no transporte, por exemplo de hormônios tireoideanos, prostaglandinas e bilirrubina, e também dos fármacos digoxina, benzilpenicilina e lovastatina (DOHAN et al., 2000; ITO; ALCORN, 2003).

Recentemente, foi descoberta na glândula mamária, a proteína, Na^+I^- *symporter* (NIS), com a mesma função apresentada na tireóide, ou seja, a de transferir o iodeto para o leite (SPITZWEG et al., 1998). Supõe-se que a existência desta proteína, nas células na glândula produtora de leite, teria como finalidade suprir o neonato com o iodeto, pois sabe-se que os estoques deste íon na tireóide de neonatos são muito baixos e a sua principal fonte é o leite materno. Suporta esta conjectura um estudo conduzido por Cho et al. (2000), o qual mostram que há significativo aumento da recaptura de iodo e dos níveis de NIS no tecido mamário de ratas após o parto. Portanto, pode-se supor que o aumento dos níveis lácteos de tiocianato nas fêmeas, aqui verificados, dos diferentes grupos experimentais, tenha ocorrido por este mecanismo, ou seja, às custas da inibição da captura do iodeto nesta glândula. Corrobora com esta suposição uma pesquisa conduzida por Clewell e Gearhart (2002), que verificaram aumento dos níveis de perclorato, em ratas lactantes, substância que compete com o iodeto pelo NIS.

A comparação entre os níveis séricos de tiocianato, entre as lactantes e as suas respectivas proles, mesmo aquelas que não foram expostas ao KCN ou ao

KSCN, permite concluir que os filhotes apresentam, de maneira geral, maiores concentrações sangüíneas de tiocianato. De fato, sabe-se que o tiocianato é um componente normal do leite, participando no sistema lactoperoxidase, um sistema inespecífico de inibição do crescimento antimicrobiano (REITER, 1985). No entanto, ao se realizar uma outra comparação, entre os níveis de tiocianato sérico de filhotes, machos e fêmeas, de mães tratadas com o KCN ou o KSCN e aqueles de seus respectivos controles, verifica-se que, exceto naquela prole de fêmeas provenientes de lactantes tratadas com as menores doses de KCN e KSCN, todos os filhotes dos diferentes grupos experimentais apresentaram níveis sangüíneos de tiocianato significativamente maiores. Este dado sugere que o período de lactação também poderia expor as proles, dos diferentes grupos experimentais, aos efeitos tóxicos do tiocianato. De fato, embora o estudo bioquímico, e o ganho de peso, nada tenham mostrado nestes animais que indicasse algum efeito tóxico, a avaliação histopatológica claramente evidenciou alterações no parênquima hepático, renal, bem como no SNC, sobretudo naqueles filhotes de ratas tratadas com a maior dose de KCN ou KSCN.

Um questionamento que poderia ser levantado, neste momento, seria sobre a possibilidade de que tanto a quantidade como a qualidade do leite produzido por estas mães, dos diferentes grupos experimentais, poderiam ser os responsáveis pelos efeitos observados nas suas proles. Assim, com o objetivo de esclarecer esta dúvida, realizou-se o experimento no qual se avaliou a quantidade de leite produzida por estas fêmeas, tomando-se como referência ou o peso corpóreo das mães ou o de seus filhotes, antes e após a mamada. Os dados mostraram que, embora houvesse diferenças nas quantidades de leite produzido, considerando-se este cálculo por um ou por outro método, ou seja, tomando-se como referência o peso

corpóreo das mães ou das proles, não foram detectadas alterações significantes na quantidade de leite entre lactantes dos grupos controle e experimentais. Portanto, pode-se concluir que não houve a ingestão de menor quantidade de leite pelo filhotes de ratas pertencentes aos grupos experimentais.

A avaliação, tanto do consumo de ração como do peso corpóreo destas ratas durante a lactação, também não apontou qualquer alteração entre os diferentes grupos. Deste modo, considerando-se, agora, a qualidade do leite, embora neste estudo não tenha sido realizada a análise bromatológica deste alimento, pode-se inferir que como as ratas pertencentes aos diferentes grupos experimentais não apresentaram menor consumo, não deve ter havido alteração na quantidade dos constituintes normais do leite. Portanto, também a qualidade do leite, produzido por aquelas fêmeas expostas tanto ao KCN como ao KSCN, não foi afetada .

Os dados aqui apresentados, referentes à avaliação da intoxicação durante a lactação têm importância, pois corrobora com outros tantos estudos, nos quais se evidenciaram a importância da exposição pela via láctea aos vários agentes tóxicos (ROZMAN; KLAASSEN, 2001). Além disto, mostra que, embora o tiocianato seja um componente natural do leite, níveis mais elevados do que aqueles normais podem comprometer a saúde do neonato.

Concluindo, a realização desta pesquisa não só gerou vários dados importantes, relativos aos efeitos da exposição prolongada ao cianeto, como, também, permitiu substancial melhoria na técnica para a dosagem do tiocianato em diferentes líquidos biológicos: sangue, líquido amniótico e leite. O aperfeiçoamento desta técnica possibilitou, conseqüentemente, a realização do estudo toxicocinético do principal metabólito do cianeto. Este trabalho também contribuiu, sobremaneira,

para a toxicologia do desenvolvimento, já que os dados aqui obtidos expuseram, claramente, a necessidade de se rever os protocolos de avaliação de teratogenicidade atualmente utilizados.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A metodologia, aqui aprimorada, de dosagem do tiocianato sérico, lácteo e no líquido amniótico é eficaz para o monitoramento da exposição ao cianeto em ratos.
- A administração dos agentes tóxicos, cianeto e tiocianato, pela água de bebida não alterou a palatabilidade da mesma.
- O estudo da transformação do cianeto em tiocianato possibilitou verificar que os diversos parâmetros toxicocinéticos diferem quando se administra o cianeto pela via oral, por gavagem ou pela água de bebida, nos três estados fisiológicos estudados. Ainda, analisando-se os parâmetros toxicocinéticos permitiram inferir que as ratas lactantes ficaram menos expostas ao tiocianato e àquelas na fase estrogênica, as mais expostas.
- Os efeitos antitireoideanos, bem como a toxicidade no SNC, renal e hepática em ratas, gestantes e lactantes, foram, provavelmente, promovidos pelo tiocianato e não pelo cianeto, enquanto que aquele no pâncreas endócrino, possivelmente, esteja vinculado ao cianeto.

- A toxicidade do cianeto é dependente do sexo e do estado fisiológico de ratas, em relação ao parâmetro ganho de peso.
- Não foram verificados efeitos fetotóxicos importantes em fetos de ratas gestantes expostas ao cianeto e ao tiocianato, quando da avaliação pelo protocolo convencional.
- O estudo histopatológico mostrou alterações evidentes, principalmente ao nível de tecido renal, hepático e SNC em filhotes de ratas expostas durante a gestação e a lactação, e avaliados no 22º ou 18º dia de vida, respectivamente.
- O tiocianato exógeno foi capaz de ser transferido das mães para a prole por meio do leite.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADEWUSI, S. R. A.; AKINDAHUNSI, A. A. Cassava processing, consumption, and cyanide toxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, n. 1, p. 13-23, 1994.

ALCORN, J.; MACNAMARA, J. Pharmacokinetics in the newborn. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 5, p. 667-686, 2003.

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

ALONSO-AMELOT, M.E. The link between bracken fern and stomach cancer: milk. **Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 694-696, 1997.

ANSELL, M.; LEWIS, F. A. A review of cyanide concentrations found in human organs. A survey of literature concerning cyanide metabolism, 'normal', non-fatal and fatal body cyanide levels. **Journal of Forensic Medicine**, v. 17, n. 4, p. 148-155, 1970.

ASSAN, R.; THIEBAUT, M. F.; LALOUX, S.; CLAUSER, E.; BOUKERSI, A. Diabetogenic tropical pancreatitis. **Diabetes and Metabolism**, v. 14, n. 3, p. 299-312, 1988.

BAGGOT, J. D. Clinical pharmacokinetics in veterinary medicine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 24, n. 4, p. 254-273, 1992.

BALLANTYNE, B. Toxicology of cyanides. In: _____. **Clinical and experimental toxicology of cyanides**. Bristol: Wright, 1987. p. 41-126.

BANEA, M.; TYLLESKÄR, T.; ROSLING, H. Konzo and ebola in Bandundu region of Zaire. **The Lancet**, v. 349, n. 9052, p. 621, 1997.

BARROW, P. Reproductive and developmental toxicology safety studies. In: KRINKE, G. J. (Ed.). **The handbook of experimental animals: the laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 199-225.

BEGG, E. J.; DUFFULL, S. B.; HACKETT, L. P.; ILETT, K. F. Studying drugs in human milk: time to unify the approach. **Journal of Human Lacting**, v. 18, n. 4, p. 323-332, 2002.

BENES, P.; KOELSCH, G.; DVORAK, B.; FUSEK, M.; VETVICKEA, V. Detection of procathepsin D in rat milk. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, n. 1, p. 113-118, 2002.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 691-699.

BIRKETT, D. J. **Pharmacokinetics made easy**. Australia: McGraw-Hill, 1998. 119 p.

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

BOROWITZ, J. L.; RATHINAVELU, A.; KANTHASAMY, A.; WILSBACHER, J.; ISOM, G. E. Accumulation of labeled cyanide in neuronal tissue. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 129, n. 1, p. 80-85, 1994.

BRUCE, R. B.; HAWARD, J. W.; HANZAL, R. F. Determination of cyanide, thiocyanate, and alpha-hydroxynitriles in plasma or serum. **Analytical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1346-1347, 1955.

CARCANGIU, M. L. Thyroid gland. In: STEPHEN, S. (Ed.). **Histology for pathologists**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 1075-1092.

CARLSSON, L.; MLINGI, N.; JUMA, A.; RONQUIST, G.; ROSLING, H. Metabolic fates in humans of linamarin in cassava flour ingested as stiff porridge. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 307-312, 1999.

CARRASCO, N. Iodide transport in the thyroid gland. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1154, n. 1, p. 65-82, 1993.

CARROLL, F. D. Jamaican optic neuropathy in immigrants to the United States. **America Journal of Ophthalmology**, v. 71, n. 2, p. 261-265, 1971.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

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.

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

CHO, J. Y.; LEVEILLE, R.; KAO, R.; PARLOW, A. F.; BURAK, W. E.; MAZZAFERRI, E. L.; JHIANG, S. M. Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na⁺/I⁻ symporter expression in mammary glands. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 85, n. 8, p. 2936-2943, 2000.

CLAUDIO, L.; BEARER, C.F.; WALLINGA, D. Assessment of the U.S. environmental protection agency methods for identification of hazards to developing organisms, part II: the developing toxicity testing guideline. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 35, n. 6, p.554-563, 1999.

CLEWELL, R. A.; GEARHART, J. M. Pharmacokinetics of toxic chemical in breast milk: use of PBPK models to predict infant exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 6, p. 333-337, 2002.

CONN, E. E. Cyanogenesis, the production of cyanide, by plants. In: KEELER, R. F.; VAN KAMPEN, K. R.; JAMES, L. F. (Ed.). **Effects of poisons plants on livestock**. New York: Academic Press, 1978. p. 301-310.

CREWS, S. J. Bilateral amblyopia in West Indians. **Transactions of the Ophthalmological Society of the United Kingdom**, v. 83, n. 1, p. 653-667, 1963.

DELANGE, F. M.; ERMANS, A. M. Iodine deficiency. In: BRAVERMAN, L. E.; UTIGER, R. D. (Ed.). **Werner and Ingbar's the Thyroid: a fundamental and clinical text**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 296-316.

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: ASPH, 1996. 200 p.

DOHAN, O.; DE LA VIEJA, A.; CARRASCO, N. Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, n. 3, p. 99-105, 2000.

DOHERTY, P. A.; FERM, V. H.; SMITH, R. P. Congenital malformations induced by infusion of sodium cyanide in the golden hamster. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 456-464, 1982.

EL GHAWABI, S. H.; GAAFAR, M. A.; EL-SAHARTI, A. A.; AHMED, S. H.; MALASH, K. K.; FARES, R. Chronic cyanide exposure: a clinical, radioisotope, and laboratory study. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 32, n. 2, p. 215-219, 1975.

FLEISHAKER, J. C. Models and methods for predicting drug transfer into human milk. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 5, p. 643-652, 2003.

FREEMAN, A. G. Optic neuropathy and chronic cyanide intoxication: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 81, n. 2, p. 103-106, 1988.

GARG, M. R.; GUPTA, J. N. Thiocyanate levels in milk on feeding rape seed meal. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 40, n. 1, p. 367-368, 1987.

GAITAN, E.; COOKSEY, R. C.; LEGAN, J.; LINDSAY, R. H.; INGBAR, S. H.; MEDEIROS-NETO, G. Antithyroid effects *in vivo* and *in vitro* of babassu and mandioca: a staple food in goitre areas of Brazil. **European Journal of Endocrinology**, v. 131, n. 2, p. 138-144, 1994.

GILDEN, N.; BODEWITZ, H. Regulating teratogenicity as a health risk. **Social Science & Medicine**, v. 32, n. 10, p. 1191-1198, 1991.

GÓRNIAK, S. L. ; SPINOSA, H. S. Farmacologia veterinária: considerações sobre farmacocinética que contribuem para explicar as diferenças de respostas observadas entre as espécies animais. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 30, p. 15-22, 2003.

GRAPHPAD INSTAT. **Instat guide to choosing and interpreting statistical tests**, version 3.00. San Diego, 1998. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 23 mar. 2004.

GRAPHPAD PRISM. **Graphpad software**. Version 3.00. San Diego, 1999. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 23 mar. 2004.

GREGUS, Z.; KLAASSEN, C. D. Mechanisms of toxicity. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 35-81.

GUTZWILLER, A. A. The effect of a diet containing cyanogenetic glycosides on the selenium status and the thyroid function of sheep. **Animal Production**, v. 57, n. 1, p. 415-419, 1993.

GUZMÁN, V.; OCHOA, R.; GIL, A. Intoxicacion cronica por acido cianhidrico en ratas y su interacion con la proteina y el tiosulfato de sodio de la dieta. **Revista ICA**, v. 12, n. 3, p. 241-252, 1977.

HOUAISS, A.; VILLAR, M. S.; FRANCO, F. M. M. **Dicionário Houaiss da língua portuguesa**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001. 2925 p.

IMANARI, T.; TANABE, S.; TOIDA, T. Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate by high performance liquid chromatography. **Chemical and Pharmaceutical 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, 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.

JONG-CHOON KIM; HO-CHUL SHIN; SHIN-WOO CHA; WOO-SUK KOH; MOON-KOO CHUNG; SANG-SEOP HAN. Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. **Life**

Sciences, v. 69, n. 22, p. 2611-2625, 2001.

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.; AGHARANYA, J. C. The effect of a nutritionally-balanced cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diet on endocrine function using the dog as a model. 2- Thyroid. **British Journal of Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 373-379, 1991.

KAMALU, B. P. Pathological changes in growing dogs fed on a balanced cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diet. **British Journal of Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 921-934, 1993.

KAMALU, B. P. The adverse effects of long term cassava (*Manihot esculenta* Crantz) consumption. **International Journal of Food Science Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 65-93, 1995.

KAMALU, B. P. The effect of a nutritionally-balanced cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diet on endocrine function using the dog as a model. 1- Pancreas. **British Journal of Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 365-372, 1991.

KANEKO, J. J. Thyroid function. In: KANEKO, J. J. (Ed.). **Clinical biochemistry of Domestic Animals**, 4th ed. San Diego: Academic Press, 1989. p. 630-649.

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 mediate toxicity in rat pheochromocytoma cells. **Toxicology Letters**, v. 93, n. 1, p. 47-54, 1997.

KAUFMANN, W. Developmental neurotoxicity. In: KRINKE, G. J. (Ed.). **The Handbook of experimental animals: the laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 227-249.

KONDE, M.; INGENBLEEK, Y.; DAFPE, M.; SYLLA, B.; BARRY, O.; DIALLO, S. Goitrous endemic in Guinea. **The Lancet**, v. 344, n. 8938, p. 165-178, 1994.

KRAVER, B. Physiological changes and drug disposition during pregnancy. In: NAU, H.; SCOTT, W. J. (Ed.). **Pharmacokinetics in teratogenesis**. Florida: CRC Press, 1987. p. 4-11.

LOEBSTEIN, R.; LALKIN, A.; KOREN, G. Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 33, n. 5, p. 328-343, 1997.

LUNDQUIST, P.; ROSLING, H.; SÖRBO, B. Determination of cyanide in whole blood, erythrocytes, and plasma. **Clinical Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 591-595, 1985.

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

MACKENZIE, A. D.; PHILLIPS, C. I. West Indian amblyopia. **Brain**, v. 91, n. 2, p. 249-260, 1968.

MACNAMARA, P. J.; MEECE, J. A.; PAXTON, E. Active transport of cimetidine and ranitidine into the milk of Sprague-Dawley rats. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutics**, v. 277, n. 3, p. 1615-1621, 1996.

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.

MCMANAMAN, J. L.; NEVILLE, M. C. Mammary physiology and milk secretion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 5, p. 629-641, 2003.

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

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIK, S. L.; GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 97-100, 1999.

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

MILLS, E. M.; GUNASEKAR, P. G.; PAVLAKOVIC, G.; ISOM, G. E. Cyanide induced apoptosis and oxidative stress in differentiated PC12 cells. **Journal of**

Neurochemistry, v. 67, n. 3, p. 1039-1046, 1996.

MOATE, P. J.; DALLEY, D. E.; GRAINGER, C.; GOUDY, A.; CLARKE, T.; WILLIAMS, P.; LIMSOWTIN, G. The effect of feeding turnips on the concentration of thiocyanate in milk and consequence for cheese making. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 2, p. 1-5, 1996.

NAROTSKY, M. G.; KAVLOCK, R. J. A multidisciplinary approach to toxicological screening: II developmental toxicity. **Journal of Toxicology Environmental Health**, v. 45, n. 2, p. 145-171. 1995.

NAU, H. Species differences in pharmacokinetics, drug metabolism, and teratogenesis. In: NAU, H.; SCOTT, W. J. (Ed.). **Pharmacokinetics in teratogenesis**. Florida: CRC Press, 1987. p.8 2-102.

NJOH, J. Tropical ataxic neuropathy in Liberians. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 42, n. 1, p. 92-94, 1990.

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. Series B**, v. 54, n. 7, p. 301-314, 1984.

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

OKOLIE, N. P.; OSAGIE, 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.

OSKARSSON, A.; HALLÉN, I. P.; SUNDBERG, J. Exposure to toxic elements via breast milk. **Analyst**, v. 120, n. 6, p. 765-770, 1995.

OSUNTOKUN, B. O. Ataxic neuropathy associated with high cassava diets in West Africa. In: NESTEL, B.; MAC INTYRE (Ed.). **Chronic cassava toxicity**. Ottawa:

International Development Research Center, 1979. p. 127-128.

OSUNTOKUN, 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.

OSUNTOKUN, B.; O OSUNTOKUN, O. Tropical amblyopia in Nigerians. **American Journal of Ophthalmology**, v. 72, n. 2, p. 708-716, 1971.

OTHA, R.; SHIROTA, M.; TOHEI, A., TAYA, KAZUYOSHI. Maternal behavior, milk ejection, and plasma hormones in hatano high and low avoidance rats. **Hormones and Behavior**, v. 42, n. 2, p. 116-125, 2002.

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. 1025-42, 1992.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 133-224.

PAVELKA, S.; BABICHY, A.; LENER, J.; VOBACHY, M. Impact of high bromine intake in the rat on iodine transfer to the suckling. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 1041-1045, 2002.

PETERS, P. W. J. Developmental toxicology: adequacy of current methods. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 1, p. 55-62, 1998.

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.

PHILBRICK, D. J.; HOPKINS, J. B.; HILL, D. C.; ALEXANDER, J. C.; THOMSON, R. G. Effects of prolonged cyanide and thiocyanate feeding in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 5, n. 4, p. 579-592, 1979.

PITCHUMONI, C. S.; JAIN, N. K.; LOWENFELS, A., B.; DIMAGNO, E. P. Chronic cyanide poisoning: unifying concept for alcoholic and tropical pancreatitis. **Pancreas**, v. 3, n. 3, p. 220-222, 1988.

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. 2, p. 141-146, 2001.

POTTS, A. M. Tobacco amblyopia. **Survey on Ophthalmology**, v. 17, n. 5, p. 313-339, 1973.

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

RAGOOBIRSINGH, D.; ROBINSON, H. M.; MORISON, E. Y. S. A. Effects of cassava cyanoglucoside, linamarin, on blood sugar levels in the dog. **Journal of Nutricional Biochemistry**, v. 4, n. 11, p. 625-629, 1993.

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.

REITER, B. Protective proteins in milk. **International Dairy Federal Bulletin**, v. 191, p. 2-35, 1985.

RENWICH, A. G. Toxicokinetics. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T. C.; SYVERSEN, T. (Ed.). **General and applied toxicology**. 2nd ed. London: Bath Press, 2000. p. 67-95.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 351-386.

ROZMAN, K .K.; KLASSEN, C. D. Absorption, distribution, and excretion of toxicants. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 107-132.

SAAD, A. D.; CAMARGO, V. A. Intoxicação cianídrica em animais domésticos. **O Biológico**, v. 33, n. 10, p. 211-220, 1967.

SAHA, S. K.; SINGHAL, K. K. Thiocyanate excretion in milk of different species of ruminants fed on mustard cake supplemented ration. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 1, p. 43-46, 1993.

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

SCHWARTZ, S. Providing toxicokinetics support for reproductive toxicology studies in pharmaceutical development. **Archives of Toxicology**, v. 75, n. 7, p. 381-387, 2001.

SCOTT, W. J.; NAU, H. Accumulation of weak acids in the young mammalian embryo. In: NAU, H.; SCOTT, W. J. (Ed.). **Pharmacokinetics in teratogenesis**. Florida: CRC Press, 1987. p. 72-76.

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

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

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

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

SMITH, D. A.; CLARK, B. Pharmacokinetics and toxicity testing basic principles and pitfalls. In: NAU, H.; SCOTT, W. J. (Ed.). **Pharmacokinetics in teratogenesis**. Florida: CRC Press, 1987. p. 108-121.

SNEDECOR, G. W. **Statistical methods**. 4th ed. Ames: College Press, 1946. 324 p.

SOLBERG, Y.; ROSNER, M.; BELKIN, M. The association between cigarette smoking and ocular diseases. **Survey on Ophthalmology**, v. 42, n. 1, p. 533-547, 1998.

SOLDÁN, P.; PAVONIC, M.; BOUCEK, J.; KOKES, J. Baia mare accident – brief ecotoxicological report of Czech experts. **Ecotoxicology 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. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SOTO-BLANCO, B. **Toxicidade subaguda, prolongada, pré-natal e pós-natal do cianeto em caprinos.** 2002. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SOTO-BLANCO, B.; GÓRNIK, S. L., KIMURA, E. T. Physiopathological 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 da exposição prolongada ao cianeto em ratos.** 2000. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SOUSA A. B.; MANZANO, H.; SOTO-BLANCO, B.; GÓRNIK, S. L. Toxicokinetics 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.; SOTO-BLANCO, B.; GUERRA, J. L., KIMURA, E. T.; GÓRNIK, S. L. Does prolonged oral exposure to cyanide promote hepatotoxicity and nephrotoxicity? **Toxicology**, v. 174, n. 2, p. 87-95, 2002.

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

SPITZWEG, C.; JOBA, W.; EISENMENGER, W.; HEUFELDER, A. E. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucous. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 5, p. 1746-1751, 1998.

STAPLES, R. E.; SCHENELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in KOH-alizarin S method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, n. 1, p. 61-63, 1964.

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

STEVENS, K. R.; GALLO, M. Practical considerations in the conduct chronic toxicity

studies. In: HAYES, A. W. (Ed.) **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 237-250.

SUBUH, A. M. H.; ROWAN, T. G.; LAWRENCE, T. L. J. Toxic moieties in ruminal and duodenal digesta and in milk and hepatic integrity in cattle given diets based on rapeseed meals of different glucosinolate contents either untreated or treated with heat or formaldehyde. **Animal Feed Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 51-61, 1995.

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.

SYME, I. G.; BRONTE-STEART, J.; FOULDS, W. S.; MACCLURE, E.; LOGAN, R.; STANSFIELD, M. Clinical and biochemistry findings in Leber's hereditary atrophy. **Transactions of the Ophthalmological Society of the United Kingdom**, v. 103, n. 5, p. 556-559, 1983.

SZABO, K. T. **Congenital malformations in laboratory and farm animals**. San Diego: Academic Press, 1988. 313 p.

TANIS, B. C.; WESTENDORP, G. J.; SMELT, H. M. Effect of thyroid substitution on hypothyroidism on hypercholesterolaemia in patients with subclinical hypothyroidism: a reanalysis of intervention studies. **Clinical Endocrinology**, v. 44, n. 6, p. 643-649, 1996.

TAYLOR, P. Skeletal examination. In: _____. **Practical teratology**. London: Academic Press, 1986. p.77-100.

TEWE, O. O.; AFOLABI, A. O.; GRISSOM, F. E. G.; LITTLETON, G. K.; OKE, O. L. Effect of varying dietary cyanide levels on serum thyroxine and protein metabolites in pigs. **Nutrition Reports International**, v. 30, n. 5, 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 of the Science of Food and Agriculture**, v. 28, n. 8, p. 750-756, 1977.

THE CUBAN OPTIC NEUROPATHY FIELD INVESTIGATION TEAM. Epidemic optic neuropathy in Cuba – clinical characterization and risk factors. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 21, p. 1176-1182, 1995.

TILSON, H. A. The role of developmental neurotoxicology studies in risk assessment. **Toxicology Pathology**, v. 28, n. 1, p. 149-156, 2000.

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

TSAO, K.; AIKEN, P. A.; JOHNS, D. R. Smoking as an etiological factor in a pedigree with Leber's hereditary optic neuropathy. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, n. 5, p. 577-581, 1999.

TUCKER, K.; HEDGES, T. R. Food shortages and an epidemic of optic and peripheral neuropathy in Cuba. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 12, p. 349-357, 1993.

TOMINAGA, Y. M.; MÍDIO, F. Modified method of determination of thiocyanate in urine by ion exchange chromatography and spectrophotometry. **Revista Farmácia e Bioquímica Universidade de São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 100-105, 1991.

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

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

TROUP, C. M.; BALLANTYNE, B. Analysis of cyanide in biological fluids and tissues. In: BALLANTYNE, B. (Ed.). **Clinical and experimental toxicology of cyanides**. Bristol: Wright, 1987, p. 22-40.

TYLLESKÄR, T.; BANE, M.; BIKANGI, N.; NAHIMANA, G.; PERSSON, L. A.; ROSLING, H. Dietary determinants of a non-progressive spastic paraparesis (konzo): a case-referent study in a high incidence area of Zaire. **International Journal of Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 949-56, 1995.

UNITED STATES ARMY. Medical Research Institute of Chemical Defense. Chemical Casualty Care Division. Cyanide. In: _____. **Medical management of chemical casualties handbook**. 3rd ed. Aberdeen, 1999. Disponível em: <<http://www.vnh.org/CHEMCASU/03cyanide.html>>. Acesso em: 03 jan. 2004.

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.

VICKERY, B. H.; BENNET, J. P. Rats and mice. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.) **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970. p. 229-315.

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.

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

WILSON, J. D. Current status of toxicology. In: WILSON, J. D.; FRASER, F. C. (Ed.) **Handbook of teratology**. London: Plenum Press, 1977. v. 1, p. 47-74.

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

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

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.