

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Sindy Raquel Krzyzaniak

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
ESTUDOS EM MATERIAL BIOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS AO  
TRATAMENTO COM NANOTUBOS DE CARBONO**

Santa Maria, RS  
2020



**Sindy Raquel Krzyzaniak**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
ESTUDOS EM MATERIAL BIOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS AO  
TRATAMENTO COM NANOTUBOS DE CARBONO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Orientadora: Prof. Dra. Paola de Azevedo Mello

Santa Maria,RS  
2020

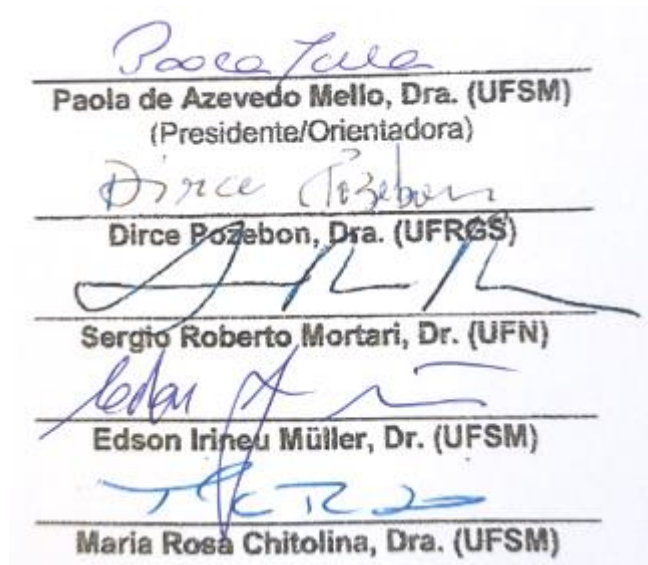


Sindy Raquel Krzyzaniak

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
ESTUDOS EM MATERIAL BIOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS AO  
TRATAMENTO COM NANOTUBOS DE CARBONO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

**Aprovada em 27 de maio de 2020:**



Paola de Azevedo Mello, Dra. (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)

Dirce Pozebon, Dra. (UFRGS)

Sergio Roberto Mortari, Dr. (UFN)

Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)

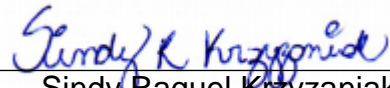
Maria Rosa Chitolina, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS  
2020



## DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta tese foi totalmente elaborada por mim e as informações retiradas na literatura estão devidamente referenciadas. Esta tese não foi apresentada anteriormente para a obtenção de qualquer outro grau.



---

Sindy Raquel Krzyzaniak





## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo incentivo à pesquisa por meio da bolsa de doutorado.

À Prof. Dra. **Paola de Azevedo Mello**, pela orientação neste trabalho, pelo exemplo profissional, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio e amizade ao longo destes anos.

Aos membros do exame de qualificação Profs. Drs. **Fábio Andrei Duarte**, **Rodrigo Cordeiro Bolzan**, **Sergio Roberto Mortari** e **Valderi Luiz Dressler** pelas valiosas contribuições neste trabalho. Às Profs. Dras. **Dirce Pozebon** e **Maria Rosa Chitolina** e aos Profs. Drs. **Edson Irineu Muller** e **Sergio Roberto Mortari** pela participação na banca examinadora desta tese e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos Profs. Drs. **Cezar Augusto Bizzi**, **Érico Marlon de Moraes Flores**, **José Neri Gottfried Paniz** e às Profs. Dras. **Rochele Sogari Picoloto** e **Jussiane Souza da Silva** pelas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como a amizade e convívio.

Aos colegas e funcionários do **LAQIA/CEPETRO**, pelo convívio, amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. **Maria Rosa Chitolina** e aos colegas do **Laboratório Enzitox**, pela disponibilidade do laboratório, pela ajuda e pelos ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao Prof. Dr. **Roberto Marinho** e a Dra. **Gabrielle Scapin** do laboratório **LAPBIO**, pela troca de conhecimento e contribuição neste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, **Ademir** e **Valéria**, pela disponibilidade e atenção.

Em especial, agradeço a minha família que sempre me incentivou a estudar e deu suporte para que isso fosse possível, principalmente ao meu pai **Cesar** e a minha mãe **Roseli**. Agradeço por todo o apoio dos meus amigos que estiveram comigo desde o início e aos que conquistei durante esta trajetória.



## RESUMO

# AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ESTUDOS EM MATERIAL BIOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM NANOTUBOS DE CARBONO

AUTORA: Sindy Raquel Krzyzaniak

ORIENTADOR: Prof. Dra. Paola de Azevedo Mello

Neste trabalho foram avaliados métodos para a análise de tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamentos com nanotubos de carbono (CNTs), possibilitando identificar onde estes se concentram, de maneira indireta, pela determinação de metais contaminantes dos CNTs. A determinação dos contaminantes nos tecidos, fluidos e pelos foi feita por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e/ou espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Além disso, foi feita a avaliação da distribuição dos contaminantes inorgânicos nos tecidos dos animais, através da obtenção de bioimagens, utilizando a técnica de ablação a laser (LA) combinada com ICP-MS (LA-ICP-MS). Inicialmente, foi necessário obter os tecidos (baço, cérebro, coração, fígado, pâncreas, pulmão e rim), fluidos (fezes e sangue) e pelos de animais submetidos a tratamentos com CNTs, conforme sugestão do Comitê de Ética Animal da UFSM, com a realização do estudo de toxicidade oral aguda e de toxicidade crônica. Nesse estudo foi usado um CNT funcionalizado com grupos hidroxila (CNT-OH). No teste de toxicidade oral aguda, os CNTs mostraram não ser tóxicos quando administrados em ratas na dose máxima de 2000 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo. De acordo com a análise histológica do fígado, as doses de 300 e 2000 mg kg<sup>-1</sup> provocaram pequenas lesões hepáticas. Devido a isto, no estudo de toxicidade crônica por 31 dias, foi feita a administração de 1 mg kg<sup>-1</sup>, 10 mg kg<sup>-1</sup> e 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT. A administração oral de CNTs não provocou alterações significativas em parâmetros bioquímicos e no final do tratamento os ratos foram eutanasiados e os órgãos, fluidos, pelos e fezes dos animais foram coletados. A necessidade de avaliar tecidos contaminados com CNTs exigiu o desenvolvimento de um método que apresentasse eficiência para a decomposição dessa matriz, um desafio em termos de preparo de amostras, para evitar resultados subestimados pela decomposição ineficiente do CNT presente no tecido. Para tal, foi avaliado o método de decomposição em sistema aberto com aquecimento em bloco digestor, bem como um método baseado na digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC). O preparo da amostra usando bloco digestor foi considerado inadequado haja vista que não possibilitou a decomposição dos CNTs. Na avaliação da MAWD-PDC foi investigada a influência da massa de tecido animal a ser decomposta e a eficiência de decomposição dos CNTs contidos nos tecidos. A exatidão do método foi avaliada com a decomposição de uma amostra de referência de fígado bovino, adicionada à amostras de fígado bovino e frango, usadas para simular os tecidos e foram observadas recuperações adequadas (90 a 127%). Os resultados obtidos utilizando 275 mg de CNT não apresentaram diferença (teste *t-student*) quando comparados a valores de referência. Após estas avaliações, a MAWD-PDC foi considerada adequada para a decomposição de tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs, empregando 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% como solução de decomposição e um programa constituído de *i*) 25 min a 180 °C (10 min de rampa) e *ii*) 40 min a 270 °C (5 min de rampa). De maneira geral, foram observadas diferenças entre os resultados obtidos para Ni no fígado, coração, pulmão e nas fezes dos animais pertencentes aos grupos tratados com CNTs em relação ao grupo controle. A análise de biodistribuição por LA-ICP-MS foi feita no baço, fígado, pulmão e rim dos animais do grupo controle e daqueles pertencentes ao grupo tratado com 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT. Foram obtidas as bioimagens da distribuição dos elementos considerados macronutrientes, como o Ca e Mg, e micronutrientes como o Cu, Fe, Mn e Zn, sendo observada diferença na distribuição de alguns elementos no rim, baço e pulmão. Tendo em vista os resultados obtidos usando MAWD-PDC e determinação de metais por ICP-OES e/ou ICP-MS e considerando as análises de biodistribuição por LA-ICP-MS, pode-se inferir que ambas as estratégias investigadas foram promissoras e podem ser utilizadas, contribuindo para a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dos CNTs.

**Palavras-chave:** Nanotubos de carbono. Contaminantes inorgânicos. Análise de biodistribuição.



## ABSTRACT

# EVALUATION OF ANALYTICAL METHODS FOR STUDIES ON RAT BIOLOGICAL MATERIAL SUBMITTED TO TREATMENT WITH CARBON NANOTUBES.

AUTHOR: Sindy Raquel Krzyzaniak  
ADVISOR: PhD. Paola de Azevedo Mello

In this work, methods for the analysis of tissues, fluids and furs of rats submitted to the treatment with carbon nanotubes (CNTs) were evaluated, allowing to identify where they are concentrated, indirectly, by the determination of metal contaminants from CNTs. Contaminants determination was carried out by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and/or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Also, the distribution of inorganic contaminants in the tissues of animals was evaluated through bio-imaging by laser ablation (LA) combined to ICP-MS (LA-ICP-MS). Initially, it was necessary to obtain the tissues (spleen, brain, heart, liver, pancreas, lung and kidney), fluids (feces and blood) and furs of animals submitted to the treatment with CNTs, as suggested by the Comitê de Ética Animal of UFSM, with the study of acute oral toxicity and chronic toxicity. In this study, a functionalized CNT with hydroxyl groups (CNT-OH) was used. In the acute oral toxicity test, CNTs shown to be non-toxic when administered to rats at the maximum dose of 2000 mg kg<sup>-1</sup> per body weight. According to the histological analyzes of the liver, doses of 300 mg kg<sup>-1</sup> and 2000 mg kg<sup>-1</sup> caused small hepatic lesions. Because of this, 1 mg kg<sup>-1</sup>, 10 mg kg<sup>-1</sup> and 100 mg kg<sup>-1</sup> of CNT were administered in the chronic toxicity study for 31 days. Oral administration of CNTs did not cause significant changes in biochemical parameters and at the end of the treatment, the rats were euthanized and the organs, fluids, furs and feces of the animals were collected. The need to evaluate tissues contaminated with CNTs required the development of a method that was efficient for the decomposition of this matrix, a challenge in terms of sample preparation, to avoid results underestimated by the inefficient digestion of the CNT into the tissue. In this purpose, the decomposition method in open system with digestion heating block was evaluated, as well as a method based on microwave-assisted wet digestion using a pressurized digestion cavity (MAWD-PDC). Sample preparation using the digestion block was considered unsuitable once it does not allowed the decomposition of CNTs. For MAWD-PDC, the influence of the mass of animal tissue to be decomposed and the efficiency for the digestion of CNTs contained in the tissues were investigated. The accuracy of the method was evaluated with the decomposition of a reference sample of bovine liver, added to samples of bovine liver and chicken, used to simulate the tissues. Suitable recoveries (90 to 127%) were observed. Results obtained using 275 mg of CNT for decomposition by MAWD-PDC, presented no difference (t-student test) when compared with reference values. After optimization, the MAWD-PDC was considered suitable for the decomposition of tissues, fluids and furs of animals submitted to the treatment with CNTs using 6 mL of concentrated HNO<sub>3</sub> and 0.5 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a decomposition solution and a program consisting of *i*) 25 min at 180 °C (10 min ramp) and *ii*) 40 min at 270 °C (5 min ramp). In general, differences were observed between the results obtained for Ni in the liver, heart, lung and feces of the animals in the groups treated with CNTs in relation to the control group. The bio-distribution analysis by LA-ICP-MS in the spleen, liver, lung and kidney of the animals from the control group and those from the 100 mg kg<sup>-1</sup> CNT treated group was performed. Bio-imaging of the distribution of elements considered macronutrients, such as Ca and Mg, and micronutrients as Cu, Fe, Mn and Zn, were obtained. Differences in the distribution of some elements in the kidney, spleen, and lung were observed. In view of the results obtained using MAWD-PDC and the determination of metals by ICP-OES and/or ICP-MS and the bio-distribution analysis by LA-ICP-MS, it can be inferred that both investigated strategies were promising and can be used contributing to the assessment of the possible toxic effects of CNTs.

**Keywords:** Carbon nanotubes. Inorganic contaminants. Bio-distribution analysis.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - a) Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (SEM, Sigma 300 VP, Carl Zeiss, Alemanha, 2,0 kV) para um CNT comercial purificado e b) espectro de raios-x (SEM, Sigma 300 VP, 15,0 kV) pontual, demonstrando a presença de catalisadores.....	30
Figura 2 - Forno de micro-ondas (MultiWave 7000®, Anton Paar).....	58
Figura 3 - Fluxograma representativo dos procedimentos e parâmetros avaliados. ....	70
Figura 4 - Imagens microscópicas da análise histológica do fígado de ratas submetidas ao estudo de toxicidade aguda. (A) Grupo controle, (B) CNT 5 mg kg <sup>-1</sup> , (C) CNT 50 mg kg <sup>-1</sup> , (D) CNT 300 mg kg <sup>-1</sup> e (E) CNT 2000 mg kg <sup>-1</sup> . (H&E 10X – Detalhes 40X).....	73
Figura 5 - Variação da massa corpórea dos ratos tratados com diferentes quantidades de CNT e do grupo controle por um período de 5 semanas (n=10). ....	75
Figura 6 - Resultados obtidos para Al por ICP-OES nas fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n=7 para fezes, n=3 para pelos nos grupos controle, 1 e 10 mg kg <sup>-1</sup> e n=5 para o grupo 100 mg kg <sup>-1</sup> ). ....	90
Figura 7 - Resultados obtidos para As por ICP-MS nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).....	91
Figura 8 - Resultados obtidos para Ca por ICP-OES nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).....	92
Figura 9 - Resultados obtidos para Cd por ICP-MS nas fezes de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7). ....	93
Figura 10 - Resultados obtidos para Co por ICP-MS nos tecidos, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNTs(n = 7).....	94
Figura 11 - Resultados obtidos para Cr por ICP-MS nas fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n=7 para fezes, n=6 para pelos nos grupos controle e 10 mg kg <sup>-1</sup> , n=5 para 1 mg kg <sup>-1</sup> e n=4 para o grupo 100 mg kg <sup>-1</sup> ). ....	95
Figura 12 - Resultados obtidos para Cu por ICP-MS nos tecidos, fluidos e	

	pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7). ....	96
Figura 13 - Resultados obtidos para Fe por ICP-OES nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n=7). ....		97
Figura 14 - Resultados obtidos para La por ICP-MS nas fezes de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).....		98
Figura 15 - Resultados obtidos para Mn por ICP-MS nos tecidos animais, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7). ....		99
Figura 16 - Resultados obtidos para Mg por ICP-OES nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7). ....		100
Figura 17 - Resultados obtidos para Mo por ICP-MS nos tecidos, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7). ....		101
Figura 18 - Resultados obtidos para Pb por ICP-MS nas fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n=7 para fezes, n=7 para pelos no grupo controle e 10 mg kg <sup>-1</sup> , n=4 para 1 mg kg <sup>-1</sup> e n=5 para o grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> ).....		102
Figura 19 - Resultados obtidos para V por ICP-MS nos tecidos, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7). ....		103
Figura 20 - Resultados obtidos para Zn por ICP-OES nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7). ....		104
Figura 21 - Aspecto dos digeridos após digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor, sendo A) e B) fezes de ratos tratados com 10 mg kg <sup>-1</sup> de CNT e C) E D) fezes de ratos tratados com 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.....		112
Figura 22 - Imagens das amostras do fígado do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Ca, (E) Cu e (G) Fe no fígado do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Ca, (F) Cu e (H) Fe no fígado do rato do grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. ....		117
Figura 23 - Imagens das amostras do fígado do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermeho. Bioimagens da distribuição de (C) Mg, (E) Mn e (G) Zn no fígado do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Mg, (F) Mn e (H) Zn no fígado do rato do grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup>		



de CNT.....	118
Figura 24 - Imagens das amostras do rim do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Ca, (E) Cu e (G) Fe no rim do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Ca, (F) Cu e (H) Fe no rim do rato do grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.....	120
Figura 25 - Imagens das amostras do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Mg, (E) Mn e (G) Zn no rim do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Mg, (F) Mn e (H) Zn no rim do rato do grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.....	121
Figura 26 - Imagens das amostras do baço do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Ca, (E) Cu e (G) Fe no baço do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Ca, (F) Cu e (H) Fe no baço do rato do grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.....	123
Figura 27 - Imagens das amostras do baço do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Mg, (E) Mn e (G) Zn no baço do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Mg, (F) Mn e (H) Zn no baço do rato do grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.....	124
Figura 28 - Imagens das amostras do pulmão do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Al, (E) Ca e (G) Cu no pulmão do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Al, (F) Ca e (H) Cu no pulmão do rato do do grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.....	127
Figura 29 - Imagens das amostras do pulmão do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Fe, (E) Mg e (G)	

Mn no pulmão do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Fe, (F) Mg e (H) Mn no pulmão do rato do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT..... 128

Figura 30 - Imagens das amostras do pulmão do rato do (A) grupo controle e (B) do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Ni e (E) Zn no pulmão do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Ni e (F) Zn no pulmão do rato do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT..... 129

Figura 31 - Imagens microscópicas da análise histológica de fígado de ratos submetidos ao estudo de toxicidade crônica. (A) Grupo controle, (B) CNT 1 mg kg<sup>-1</sup>, (C) CNT 10 mg kg<sup>-1</sup>, e (D) CNT 100 mg kg<sup>-1</sup>. (H&E 10X – Detalhes 40X). ..... 133

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais aspectos de trabalhos para avaliação da toxicidade dos CNTs <i>in vivo</i> relatados na literatura. ....	35
Tabela 2 - Bioimagens de NPs em tecidos de animais obtidas por LA-ICP-MS.....	51
Tabela 3 - Condições operacionais para a determinação elementar por ICP-OES e por ICP-MS.....	60
Tabela 4 - Condições operacionais do laser para a obtenção de biomagens de tecido animal por LA-ICP-MS.....	61
Tabela 5 - Programa de irradiação utilizado para a decomposição de CNTs, tecidos, fluidos e pelos de ratos por MAWD-PDC.....	67
Tabela 6 - Resultados obtidos por ICP-OES <sup>a</sup> e por ICP-MS <sup>b</sup> para contaminantes inorgânicos em fígado bovino e frango após digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor (valores em $\mu\text{g g}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão). ....	78
Tabela 7 - Resultados obtidos por ICP-OES <sup>a</sup> e por ICP-MS <sup>b</sup> para contaminantes inorgânicos em CNT (valores em $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=3, média $\pm$ desvio padrão).....	81
Tabela 8 - Resultados obtidos por ICP-OES <sup>a</sup> e por ICP-MS <sup>b</sup> para metais em fígado bovino e frango após digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC) (valores em $\mu\text{g g}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão). ....	85
Tabela 9 - Resultados obtidos por ICP-OES <sup>a</sup> e por ICP-MS <sup>b</sup> para contaminantes inorgânicos em CNT após MAWD-PDC (valores em $\mu\text{g g}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	88
Tabela 10 - Resultados obtidos para Ni por ICP-MS nos tecidos, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamentos com CNTs. ....	108
Tabela 11 - Parâmetros do método de MAWD-PDC.....	114
Tabela 12 - Valores bioquímicos séricos de ratos após 31 dias de tratamento com CNT, (n = 5).....	132



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μXRF	Microfluorescência de Raios-X, do inglês, <i>Micro-x-Ray Fluorescence</i>
ADA	Adenosina Deaminase, do inglês, <i>Adenosine Deaminase</i>
ALT	Alanina Aminotransferase, do inglês, <i>Alanine Aminotransferase</i>
AOAC	Associação Oficial dos Químicos Analíticos, do inglês, <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AST	Aspartato Transaminase, do inglês, <i>Aspartate Transaminase</i>
ASTM	Sociedade Americana para Testes e Materiais, do inglês, <i>American Society for Testing and Materials</i>
CCVD	Deposição Química de Vapor Catalisada, do inglês, <i>Catalytic Chemical Vapor Deposition</i>
CNT	Nanotubo de carbono, do inglês, <i>Carbon Nanotube</i>
DOTA	Ácido 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra-il)tetra-acético, do inglês, 2,2', 2'', 2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra-yl)tetraacetic Acid
DTPA	Ácido Dietilenotriaminopentacético, do inglês, <i>Diethylenetriaminopentacetic Acid</i>
ECHA	Agência Europeia de Produtos Químicos, do inglês, <i>European Chemicals Agency</i>
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês, <i>US Environmental Protection Agency</i>
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos, do inglês, <i>US Food and Drug Administration</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês, <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
GGT	Gama Glutamil Transpeptidase, do inglês, <i>Gamma Glutamyl Transpeptidase</i>
GLUCO	Glucosamina, do inglês, <i>Glucosamine</i>
GST	Glutathione S-transferase, do inglês, <i>Glutathione S-transferase</i>
GTX	Glutathione Peroxidase, do inglês, <i>Glutathione Peroxidase</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
INCQS/Fiocruz	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LA-ICP-MS	Ablação com Laser Combinada com a Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>

LOQ	Limite de quantificação, do inglês, <i>Limit of Quantification</i>
MAWD	Decomposição por Via Úmida Assistida por Radiação Micro-ondas, do inglês, <i>Microwave-Assisted Wet Digestion</i>
MAWD-PDC	Digestão por Via Úmida Assistida por Micro-ondas em uma Cavidade de Digestão Pressurizada, do inglês, <i>Microwave-Assisted Wet Digestion using a Pressurized Digestion Cavity</i>
MAWD-SRC	Decomposição por Via Úmida Assistida por Radiação Micro-ondas em Câmara Única de Reação, do inglês, <i>Microwave-Assisted Wet Digestion using Single Reaction Chamber</i>
MIC	Combustão Iniciada por Micro-ondas, do inglês, <i>Microwave-Induced Combustion</i>
MWCNT	Nanotubo de Carbono de Parede Múltipla, do inglês, <i>Multi-Wall Carbon Nanotube</i>
NNI	Iniciativa Nacional de Nanotecnologias dos Estados Unidos, do inglês, <i>US National Nanotechnology Initiative</i>
NPs	Nanopartículas, do inglês, <i>Nanoparticles</i>
NPSH	Tióis não proteicos, do inglês, <i>Non-protein Thiols</i>
NTF	Força Tarefa de Nanotecnologia, do inglês, <i>Nanotechnology Task Force</i>
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, do inglês, <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PEG	Polietilenoglicol, do inglês, <i>Polyethyleneglicol</i>
PEI	Polieterimida, do inglês, <i>Polyetherimide</i>
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons, do inglês, <i>Positron Emission Tomography</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>
SIMS	Espectrometria de Massa de Íon Secundário, do inglês, <i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único, do inglês, <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
SWCNT	Nanotubo de Carbono de Parede Simples, do inglês, <i>Single-Wall Carbon Nanotube</i>
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês, <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, do inglês, <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
XRF	Fluorescência de Raios-X, do inglês, <i>X-Ray Fluorescence</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1	NANOTUBOS DE CARBONO (CNTS).....	28
2.2	TOXICIDADE DOS NANOMATERIAIS .....	31
2.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS CNTS .....	32
2.4	DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM CNTS E EM TECIDOS BIOLÓGICOS.....	44
2.5	MAPEAMENTO DE ELEMENTOS USANDO ABLAÇÃO POR LASER COMBINADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (LA-ICP-MS).....	48
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
3.1	INSTRUMENTAÇÃO .....	58
3.2	ANIMAIS USADOS NO ESTUDO.....	62
3.3	ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL EM RATOS .....	62
<b>3.3.1</b>	<b>Toxicidade aguda .....</b>	<b>62</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Toxicidade crônica .....</b>	<b>63</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Outras avaliações bioquímicas .....</b>	<b>64</b>
3.4	REAGENTES E AMOSTRAS .....	64
3.5	PROCEDIMENTOS .....	65
<b>3.5.1</b>	<b>Descontaminação de vidrarias e materiais .....</b>	<b>65</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Avaliação histológica .....</b>	<b>66</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Determinação elementar em tecidos, fluidos e pelos de ratos tratados com CNTs após decomposição por via úmida .....</b>	<b>66</b>
3.5.3.1	<i>Digestão ácida por aquecimento convencional empregando bloco digestor.....</i>	66
3.5.3.2	<i>Digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC) .....</i>	67
<b>3.5.4</b>	<b>Determinação de carbono e acidez residual nos digeridos.....</b>	<b>68</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Obtenção de bioimagens por LA-ICP-MS.....</b>	<b>69</b>
3.6	RESUMO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	69
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>

4.1	APRESENTAÇÃO E CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	72
4.1.1	<b>Estudo de toxicidade oral aguda .....</b>	<b>72</b>
4.1.1.1	<i>Análise histopatológica em estudo de toxicidade aguda.....</i>	<i>73</i>
4.1.2	<b>Estudo de toxicidade crônica .....</b>	<b>74</b>
4.2	DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM TECIDOS, FLUIDOS E PELOS DE RATOS TRATADOS COM CNTS .....	75
4.2.1	<b>Avaliação do método de digestão ácida por aquecimento convencional em sistema aberto empregando bloco digestor.....</b>	<b>75</b>
4.2.1.1	<i>Influência da massa de amostra utilizada para decomposição .....</i>	<i>75</i>
4.2.1.2	<i>Avaliação da eficiência de decomposição de CNTs.....</i>	<i>80</i>
4.2.2	<b>Avaliação da digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC).....</b>	<b>83</b>
4.2.3	<b>Influência da massa de amostra utilizada na decomposição.....</b>	<b>83</b>
4.2.4	<b>Avaliação da eficiência de decomposição de CNTs .....</b>	<b>87</b>
4.2.5	<b>Avaliação da decomposição dos tecidos, fluidos e pelos dos animais tratados com CNTs por MAWD-PDC .....</b>	<b>89</b>
4.3	ANÁLISE DE BIODISTRIBUIÇÃO POR LA-ICP-MS.....	115
4.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICA .....	131
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>135</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>139</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>149</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>151</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Estudos relacionados à toxicidade dos nanomateriais têm sido propostos de maneira crescente, uma vez que estes já são utilizados para os mais diversos fins, mesmo sem algum controle específico. Neste sentido, os nanotubos de carbono (CNTs) merecem atenção tendo em vista às suas potencialidades para utilização na medicina e em áreas relacionadas. Os CNTs são uma forma alotrópica do carbono, caracterizados pelo enrolamento de uma ou mais folhas de grafeno na forma de tubos em nanoescala, com diâmetro variando de poucas dezenas até 100 nanômetros e comprimento que varia de alguns micrômetros até vários centímetros (TASIS *et al.*, 2006). Características tais como a elevada área superficial, a alta resistência química e mecânica, as propriedades físicas, químicas e biológicas diferenciadas, a cavidade oca e a possibilidade de funcionalização, os tornam candidatos promissores para atuarem no carreamento de fármacos, próteses neurais, marcadores biológicos, dentre outros (PRAJAPATI *et al.*, 2020).

É importante destacar que apesar da inexistência de normas que regulamentem a segurança, a toxicidade dos CNTs pode variar devido à diferença no tamanho, na morfologia, na estrutura, na pureza obtida na síntese e na purificação, no tipo e na quantidade de impurezas metálicas e na funcionalização que pode estar presente (ALSHEHRI *et al.*, 2016). Apesar de todos os esforços, tanto no âmbito nacional quanto internacional, ainda inexistem leis que regulamentem os nanomateriais de maneira adequada. Isto deve-se a diversos fatores, como a carência de estudos de toxicologia a longo prazo, de equipamentos de proteção individual adequados e, até mesmo, a falta de conhecimento dos princípios básicos dos fenômenos em nanoescala. Dessa forma, atualmente, a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dos nanomateriais é feita baseando-se nos métodos já estabelecidos para os seus análogos, o que torna-se preocupante, uma vez que, por possuírem propriedades diferentes, podem ter as suas características alteradas devido às condições do meio (BERTI e PORTO, 2016).

Nas últimas duas décadas, diversos estudos sobre os possíveis efeitos tóxicos dos CNTs *in vitro* e *in vivo* foram relatados (ALSHEHRI *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2020; VAN ZANDWIJK e FRANK, 2020). Dentre os trabalhos relatados, é possível constatar a diversidade das características dos CNTs utilizados nos estudos e, conseqüentemente, em alguns casos, pode-se constatar respostas contraditórias

sobre os possíveis efeitos tóxicos. Apesar dos estudos *in vitro* serem considerados mais simples, tem como principal limitação, a não representatividade do quão prejudicial o composto/material possa ser, uma vez que não há interação com diferentes células e com o organismo como um todo (FERNANDES e PEDROSO, 2017; HALL *et al.*, 2007). De maneira geral, os estudos *in vivo* buscam compreender a toxicidade dos CNTs avaliando características como *i)* a contribuição das impurezas metálicas que possam ser inseridas no processo de síntese dos CNTs; *ii)* o efeito em relação ao tamanho, funcionalização e ao tipo de CNT (simples ou de paredes múltiplas) e, além da toxicidade, buscam *iii)* investigar, em órgãos específicos, onde os CNTs atuam ou se concentram (ALSHEHRI *et al.*, 2016).

É importante destacar que os trabalhos que fazem menção a efeitos tóxicos provenientes de impurezas metálicas presentes nos CNTs, exceto o desenvolvido por Muller *et al.*, apenas inferem a concentração destas no CNT e não no órgão investigado (KOYAMA *et al.*, 2009; LAM *et al.*, 2004; MULLER *et al.*, 2005; SAMIEI *et al.*, 2020). Ainda, ressalta-se que os métodos empregados para decomposição dos CNTs e posterior determinação de elementos, como, por exemplo, a fusão ou simplesmente uma extração ácida, são considerados inadequados uma vez que não possibilitam a decomposição completa da matriz, podendo levar a resultados incorretos (KRZYZANIAK *et al.*, 2019). Outro aspecto importante, refere-se à investigação dos órgãos em que os CNTs atuam ou se concentram, ou, ainda, como estes se distribuem, visando aplicações futuras como carreadores de fármacos e no tratamento de câncer (fototerapia), por exemplo.

Nesse sentido, somente alguns poucos trabalhos voltados à investigação da presença de CNTs em órgãos específicos são encontrados na literatura (CHERUKURI *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008; MCDEVITT *et al.*, 2007; SHINOHARA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2007). Dentre as estratégias mais utilizadas, destaca-se a marcação de radionuclídeos em CNTs para posterior obtenção de imagens *in vivo*. No entanto, apesar dos resultados promissores, têm-se como desvantagens o relativo alto custo dos equipamentos, bem como a alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas dos CNTs modificados com marcador (LIU *et al.*, 2008; TAMURA *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, está sendo dada ênfase aos estudos relacionados à verificação da distribuição espacial dos elementos (bioimageamento). A obtenção de

bioimagens dos órgãos dos animais é uma forma de verificar o acúmulo do material, composto ou elemento administrado em determinado local, bem como mapear possíveis lesões e compreender as rotas de exposição. Para isso, diversas técnicas têm sido propostas, dentre elas a ablação com laser combinada com a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) (POZEBON, DRESSLER e SCHEFFLER, 2017). Apesar disso, a LA-ICP-MS ainda não foi empregada para estudos de bioimageamento em tecidos de ratos submetidos a tratamentos com CNTs.

É possível observar que, apesar dos esforços para mensurar o potencial efeito tóxico dos CNTs, muitos questionamentos e respostas contraditórias são encontrados na literatura. No que diz respeito à presença de CNTs nos tecidos dos animais, a estratégia indireta de determinar a concentração dos metais, principalmente aqueles utilizados como catalisadores no processo de síntese, pode ser considerada como promissora. Entretanto, é imprescindível que se tenha atenção para a adequabilidade do método de preparo de amostra e da técnica de determinação. Isso se faz necessário, tendo em vista a complexidade das matrizes das amostras, sendo os CNTs considerados de difícil decomposição, enquanto que para os tecidos dos animais o desafio reside na pequena quantidade de amostra disponível. Dessa forma, é desejável que o método de preparo de amostra para um estudo desse tipo atenda aos requisitos para ambas as situações: diluição mínima, já que a quantidade de amostra é pequena, eficiência na decomposição do CNT e que a frequência analítica seja elevada, já que o número de amostras costuma ser elevado.

Diante do que foi exposto e visando contribuir com a avaliação de métodos que possam auxiliar na compreensão dos potenciais efeitos tóxicos dos CNTs, o presente trabalho tem por objetivo avaliar métodos de preparo de amostras adequados para a determinação de contaminantes em tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamentos com CNTs possibilitando, de maneira indireta, identificar onde os CNTs se concentram. Dentre estes, será avaliado um método baseado na digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC) para decomposição de tecidos, fluidos e pelos de ratos contaminados com CNTs e posterior determinação dos contaminantes por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Além

disso, será feita a avaliação da distribuição dos contaminantes inorgânicos nos tecidos, através da obtenção de bioimagens, utilizando a técnica LA-ICP-MS.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

*Esta revisão está dividida em quatro partes principais. Na primeira, serão abordados alguns aspectos gerais sobre nanotubos de carbono (CNTs), suas propriedades, produção e aplicações. Na segunda parte, será abordada a toxicidade dos nanomateriais com ênfase na dos CNTs e serão apresentados os principais trabalhos para avaliação da toxicidade in vivo já publicados. Na terceira parte, serão abordados brevemente os métodos de preparo de amostras empregados para decomposição de tecidos biológicos e de CNTs. Por fim, será feita uma abordagem sobre a biodistribuição de elementos utilizando a técnica LA-ICP-MS e sua aplicabilidade para análise de biodistribuição de nanopartículas em tecidos de animais.*

## 2.1 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTS)

Os nanotubos de carbono, descobertos em 1991 por Iijima (IIJIMA, 1991), representam uma importante classe de nanoestruturas, com diversas aplicações em função de suas propriedades químicas, mecânicas e elétricas diferenciadas. Os CNTs são uma forma alotrópica do carbono caracterizada pelo enrolamento de uma ou mais folhas de grafeno na forma de tubos em nanoescala, com diâmetro variando de poucas dezenas até 100 nanômetros e comprimento que varia de alguns micrômetros até vários centímetros (TASIS *et al.*, 2006). Em geral, existem dois tipos principais de nanotubos de carbono: os CNTs de parede simples (do inglês, *Single-Wall Carbon Nanotube*, SWCNT) e, caso tubos de grafeno adicionais estejam organizados em torno da estrutura do SWCNT, tem-se um CNT de parede múltipla (do inglês, *Multi-Wall Carbon Nanotube*, MWCNT).

Para a síntese dos CNTs, diversos processos de têm sido empregados, sendo que os mais utilizados são a descarga em arco elétrico, a ablação por laser e a deposição química de vapor catalisada (CCVD). Dentre estes, a CCVD é o processo mais empregado e possibilita a produção de CNTs em grande escala (SHAH e TALI, 2016; YAHYAZADEH e KHOSHANDAM, 2017). O processo é baseado na decomposição de precursores de carbono, como hidrocarbonetos de origem fóssil (acetileno, benzeno, eteno ou metano) ou hidrocarbonetos de origem vegetal (cânfora e óleo de palma), na presença de catalisadores metálicos (Co, Fe, La, Mo e Ni e suas combinações) e em atmosfera inerte. Neste processo, ocorre o aquecimento do catalisador (300 a 1200 °C) em um tubo pelo qual passa uma corrente de gás, contendo um ou mais precursores de carbono, necessários para o crescimento dos CNTs. Como consequência do processo de síntese, os CNTs podem conter impurezas, que incluem aquelas presentes na composição dos suportes dos catalisadores, os próprios catalisadores e sub-produtos da reação, tais como carbono amorfo e grafitizado, além de quaisquer outros possíveis contaminantes que possam ser inseridos pelos materiais e reagentes empregados.

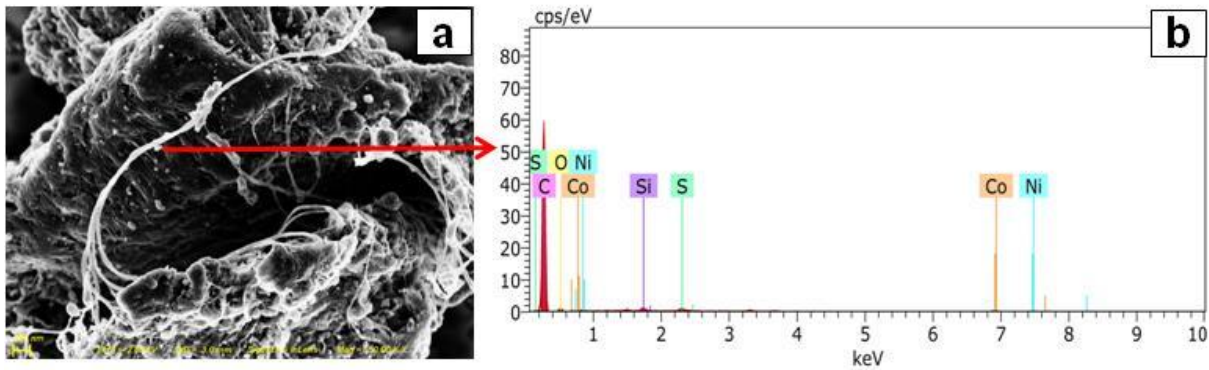
É importante destacar que além dos contaminantes oriundos do processo de síntese, metais e halogênios também podem ser inseridos em CNTs com a finalidade de alterar as propriedades físicas e químicas destes materiais e, dessa forma, não são considerados como impurezas. Ainda com esta finalidade, muitos processos de funcionalização dos CNTs, através de suas paredes, pontas ou por

encapsulamento, têm sido desenvolvidos, como por exemplo, a inserção de grupos químicos como o -COOH, -OH e -CHO, fornecendo hidrofiliidade e facilitando a interação dos nanotubos com moléculas orgânicas e biológicas e com outros grupos químicos (DOMAGAŁA *et al.*, 2019; SOUZA FILHO e FAGAN, 2007).

A fim de minimizar os problemas relacionados à contaminação, os CNTs são submetidos a uma etapa de purificação. Para isso, métodos físicos e químicos são empregados para garantir a qualidade e pureza do produto final (HOU, LIU e CHENG, 2008; ISMAIL *et al.*, 2008). Dentre estes, os métodos químicos são os mais utilizados e normalmente são empregados reagentes oxidantes como HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e KMnO<sub>4</sub>, ou suas combinações, bem como o uso de fontes de energia convencionais e alternativas (micro-ondas e ultrassom). Durante esta etapa, as impurezas adsorvidas na superfície dos CNTs são extraídas pela solução e removidas da matriz (KO *et al.*, 2005; LIU e HARRIS, 2008).

Mesmo após a purificação, alguns metais podem permanecer presentes em níveis de concentração relativamente elevados, uma vez que podem estar presos (encapsulados) no interior da estrutura do nanotubo (ISMAIL *et al.*, 2008; PUMERA, 2007). Isto se deve, principalmente, ao fato de que a maior parte dos métodos de purificação utilizados visa a purificação em termos de material nanoestruturado em detrimento de carbono amorfo, e não necessariamente leva à remoção de resíduos de catalisadores. Ainda, a completa remoção deste tipo de impureza requer a utilização de métodos que operam à alta temperatura e pressão, podendo levar a completa degradação do tubo (ISMAIL *et al.*, 2008). Na Figura 1 está mostrada uma imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura e um espectro de raios-x, onde é possível observar a presença de impurezas metálicas na estrutura do CNT, mesmo após purificação.

Figura 1 - a) Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (SEM, Sigma 300 VP, Carl Zeiss, Alemanha, 2,0 kV) para um CNT comercial purificado e b) espectro de raios-x (SEM, Sigma 300 VP, 15,0 kV) pontual, demonstrando a presença de catalisadores.



Fonte: (ENDERS, 2016).

A presença de contaminantes inorgânicos, além de causar alterações consideráveis nas características esperadas, principalmente, nas propriedades físico-químicas do material sintetizado, pode comprometer suas aplicações. Dentre as aplicações dos CNTs, pode-se citar o desenvolvimento de materiais para aplicações industriais e equipamentos eletrônicos, a utilização na medicina e na biotecnologia, bem como aplicações em química analítica, como adsorvente de metais (As, Cr, Hg e Pb) em afluentes e efluentes, e na composição de eletrodos, por exemplo, exigindo que seja conhecida a composição dos CNTs, já que esta pode influenciar no comportamento do eletrodo (BASSYOUNI *et al.*, 2019; GUSAIN, KUMAR e RAY, 2020; STEFANO *et al.*, 2020; STEFANO *et al.*, 2017; TROJANOWICZ, 2006).

A disseminação do uso de CNTs torna-se preocupante, uma vez que não há o conhecimento exato dos possíveis efeitos tóxicos. Ainda, têm-se dificuldades, do ponto de vista analítico, em mensurar o teor de contaminantes neste tipo de nanomaterial. Em geral, estes problemas permeiam todos os campos da nanociência, a qual preconiza que os materiais em escala nanométrica podem apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores (dependendo do seu diâmetro e forma estrutural), como na micro e na macroescala (BERTI e PORTO, 2016).



## 2.2 TOXICIDADE DOS NANOMATERIAIS

Embora o termo nanotecnologia tenha sido proferido em 1974 por Norio Tanigushi, a possibilidade de manipular a matéria em escala atômica e molecular e os progressos científicos que esta manipulação poderia trazer, foram mencionados em 1959 por Richard Feynman, na palestra intitulada “*There’s a plenty of room at the bottom*” (Há mais espaços lá embaixo) (FEYNMAN, 1992). Considerada uma ciência relativamente nova, muitos questionamentos ainda são feitos em relação à própria definição do termo e à segurança dos nanomateriais.

Existem diversas definições para nanotecnologia, segundo a Iniciativa Nacional de Nanotecnologias dos Estados Unidos (do inglês, *US National Nanotechnology Initiative*, NNI): “nanotecnologia é o entendimento e o controle da matéria em dimensões de aproximadamente 100 nanômetros, em que fenômenos únicos permitem o desenvolvimento de novas aplicações”. Alternativamente, a Sociedade Americana para Testes e Materiais (do inglês, *American Society for Testing and Materials*, ASTM) diz que “nanotecnologia é o termo que se refere a um conjunto de tecnologias que medem, manipulam e incorporam materiais e/ou características em dimensões aproximadas de, pelo menos, 1 a 100 nanômetros”. Ambas definições destacam a importância do tamanho, porém, outros fatores, como o formato, a carga, a superfície, o volume entre outras propriedades químicas, físicas e biológicas, também devem ser levadas em consideração. Por questão de segurança e de conformidade da indústria, a Agência Europeia de Produtos Químicos (do inglês, *European Chemicals Agency*, ECHA) define como “nano” qualquer material que esteja entre 1 e 999 nm e em que, pelo menos, 50% dos componentes de sua estrutura micrométrica tenham dimensões entre 1 e 100 nm (BERTI e PORTO, 2016). Com base nestas definições, pode-se concluir que um nanomaterial que não tenha atividade/funcionalidade ou que, na nanoescala, não apresente propriedades diferenciadas das de seu análogo na micro ou macroescala, não deve ser considerado um produto da nanotecnologia.

A aplicação da nanotecnologia resulta na produção de materiais com propriedades diferenciadas, exigindo, dessa forma, uma avaliação criteriosa quanto à segurança e à qualidade do nanomaterial para quem o utiliza, manuseia, manipula ou produz. Com a finalidade de identificar e abordar formas de avaliação dos

potenciais efeitos tóxicos de produtos nanotecnológicos regulados pelo FDA (do inglês, *US Food and Drug Administration*), em 2007 foi criada a NTF (do inglês, *Nanotechnology Task Force*) (NTF, 2007). Esta teve dentre os objetivos, a elaboração de um relatório com levantamento de considerações científicas e regulatórias relacionadas à segurança e à efetividade de produtos contendo nanomateriais, controlados pelo FDA. Ainda, este inclui propostas para a agência prover assistência às indústrias em casos que o uso de nanomateriais necessite de informações adicionais, como a mudança de diretrizes ou no processo. No entanto, atualmente, o FDA não considera categoricamente todos os produtos oriundos da nanotecnologia como prejudiciais ou não prejudiciais, considera apenas, da mesma forma que para os produtos convencionalmente manufaturados, as características do produto acabado e a segurança relacionada ao seu propósito de uso.

No Brasil, por intermédio do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), foi criada a rede nacional de nanotoxicologia, denominada Nanotox, a qual conta com pesquisadores de diversas áreas, empenhados no estabelecimento de marcos regulatórios e proposição da análise de riscos para a pesquisa e a indústria nacional (BERTI e PORTO, 2016). No entanto, apesar de todos os esforços, tanto no âmbito nacional quanto internacional, ainda inexitem leis que regulamentem os nanomateriais de maneira adequada. Isto deve-se a diversos fatores, como a carência de estudos de toxicologia a longo prazo, equipamentos de proteção individual adequados e, até mesmo, a falta de conhecimento dos princípios básicos dos fenômenos relacionados à nanoescala. Apesar disso, atualmente, a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dos nanomateriais é feita baseando-se nos métodos já estabelecidos para os seus análogos, o que torna-se preocupante, uma vez que, por possuírem propriedades diferentes, podem ter as suas características alteradas devido às condições do meio.

### 2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS CNTS

Estudos relacionados à toxicidade dos nanomateriais têm sido cada vez mais emergentes, uma vez que estes já são utilizados para os mais diversos fins, mesmo sem esse controle. Neste sentido, os CNTs carecem de atenção tendo em vista às suas potencialidades de aplicação. Características tais como a alta área superficial, a alta resistência química e mecânica, as propriedades físicas, químicas e biológicas

diferenciadas, a cavidade oca e a possibilidade de funcionalização, os tornam candidatos promissores para atuarem no carreamento de fármacos, próteses neurais, marcadores biológicos, dentre outros (ALSHEHRI *et al.*, 2016; PRAJAPATI *et al.*, 2020). É importante destacar que apesar da inexistência de normas que regulamentem a segurança quanto ao uso dos CNTs, a toxicidade destes pode variar devido às diferenças no tamanho, na morfologia, na estrutura, na pureza obtida na síntese e na purificação, no tipo e na quantidade de impurezas metálicas, bem como em função do método de funcionalização ao qual estes podem ser submetidos.

Sob esse aspecto, nas últimas duas décadas, diversos estudos sobre os possíveis efeitos tóxicos dos CNTs *in vitro* e *in vivo* foram relatados na literatura. Os estudos de toxicidade *in vitro* são usados para indicar possíveis efeitos tóxicos do composto/material em culturas celulares. Entretanto, apesar destes serem considerados mais simples e fornecerem respostas em um curto período de tempo, não indicam quão prejudicial o composto/material possa ser, uma vez que não há interação com diferentes células e com o organismo vivo como um todo (HALL *et al.*, 2007; KUMAR, SHARMA e MAITRA, 2017). Além da influência na toxicidade devido às diferenças das características dos CNTs, muitos trabalhos *in vitro* destacam que alguns indicadores (azul de coomassie, azul de alamar e cloreto de tetrazólio, por exemplo) utilizados nos ensaios de viabilidade celular, podem ser potencialmente tóxicos, fazendo com que este parâmetro também tivesse que ser levado em consideração (ALSHEHRI *et al.*, 2016).

Os ensaios *in vivo* são empregados utilizando modelos animais, em que as alterações causadas no desenvolvimento no organismo como o crescimento, a taxa de mortalidade e a lesão de alguns órgãos, podem ser considerados como indicadores de toxicidade. Estes ensaios são considerados mais complexos e morosos e envolvem um maior número de variáveis, uma vez que a substância/material ou elemento administrado pode interagir e sofrer influência do organismo como um todo. Dessa forma, as respostas obtidas pelos ensaios *in vivo* são consideradas mais reais e representativas quando comparadas com aquelas obtidas pelos ensaios *in vitro*. Contudo, destaca-se que, apesar das críticas e opiniões desfavoráveis ao uso dos ensaios *in vivo* devido à quantidade e sofrimento dos animais, estes ainda são os mais utilizados (FERNANDES e PEDROSO, 2017; HALL *et al.*, 2007; KUMAR, SHARMA e MAITRA, 2017). Para a execução de ambos

os ensaios, agências reguladoras como o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz), a Agência de Proteção do Ambiente (do inglês, *Environmental Protection Agency*, EPA), o FDA e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, *Organization for Economic Co-operation and Development*, OECD) já possuem protocolos padronizados (HALL *et al.*, 2007).

Para uma visão mais ampla acerca da diversidade de CNTs e respectivos efeitos tóxicos, na Tabela 1 estão resumidas particularidades de trabalhos sobre a avaliação da toxicidade dos CNTs *in vivo*, que foi a abordagem utilizada neste estudo.

Tabela 1 - Principais aspectos de trabalhos para avaliação da toxicidade dos CNTs *in vivo* relatados na literatura.

(continua)

Amostra	Características	Modelo	Comentários	Referência
<i>SWCNT não modificado</i>				
SWCNT	-	Camundongos machos	Foi observada resposta inflamatória aguda nos pulmões dos camundongos na concentração de 100 µg mL <sup>-1</sup> . Administração intratraqueal.	(PARK <i>et al.</i> , 2014)
SWCNT	2,37 ± 0,40 nm (Ø) 0,85 ± 0,42 µm (l)	Embriões de camundongos fêmeas	Em concentrações acima de 100 ng/camundongo foram detectadas espécies reativas de oxigênio na placenta de fetos mal formados. Administração via intravenosa no plexo venoso retrobulbar.	(PIETROIU STI <i>et al.</i> , 2011)
SWCNT	1 nm(Ø) 300 nm (l)	Coelhos	Foi investigada a presença de SWCNT no cérebro, cordão da medula espinhal, coração, pulmão, fígado, baço, rim, pâncreas, estômago, pele, músculo e osso. Após 24 h da administração de 7,5 mL de 20 µg kg <sup>-1</sup> de CNT foi observada a presença de CNT somente no fígado. Ausência de toxicidade na concentração administrada via injeção intravenosa.	(CHERUKU RI <i>et al.</i> , 2006)
SWCNT	10 - 30 nm (Ø) 2 - 3 µm (l)	Camundongos machos	Ausência de toxicidade na concentração de 600 µg de CNT. Acúmulo de <sup>13</sup> C-SWCNT no fígado, pulmão e baço. Administração via injeção única na cauda.	(YANG <i>et al.</i> , 2007)
SWCNT	0,9 - 1,7 nm (Ø) < 1 µm (l)	Ratas	Foi observado efeito genotóxico na concentração de 0,064 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. Administração via oral por gavagem.	(FOLKMAN N <i>et al.</i> , 2009)
SWCNTs	-	Camundongos machos	Foi observada inflamação peribrônquica e necrose nos pulmões após 90 dias da administração de 0,1 e 0,5 mg kg <sup>-1</sup> de CNT. Houve a morte de 5 camundongos (n = 9) submetidos a dose máxima de CNT (maior concentração de Ni e Y, 26 e 5%, respectivamente). Administração via instilação intratraqueal.	(LAM <i>et al.</i> , 2004)
SWCNTs	1 nm (Ø) 1 - 2 µm (l)	Camundongos machos	Formação de glaucomas quando CNT mais longo foi administrado. Administração oral via cânula de intubação de 50 - 1000 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.	(KOLOSNI AJ-TABI <i>et al.</i> , 2010)

Tabela 1 - Principais aspectos de trabalhos para avaliação da toxicidade dos CNTs *in vivo* relatados na literatura.

(continuação)

Amostra	Características	Modelo	Comentários	Referência
SWCNT	2 - 3 $\mu\text{m}$ (l) - CNT curto 20 - 80 $\mu\text{m}$ (l) - CNT longo	Ratos machos	Maior absorção de eritropoetina nas células quando CNTs curtos foram empregados como carreadores. Administração via incisão abdominal de uma suspensão contendo 100 IU $\text{kg}^{-1}$ de eritropoetina e 10 mg de CNT.	(ITO <i>et al.</i> , 2007)
SWCNT	0,8 - 1,2 nm ( $\emptyset$ )	Camundongos machos	Toxicidade aguda nos pulmões para 40 $\mu\text{g}$ , porém com efeito menos pronunciado quando comparado com MWCNT. Administração via aspiração faríngea.	(ERDELY <i>et al.</i> , 2009)
<i>SWCNT funcionalizado</i>				
COOH-SWCNT	1,0 nm ( $\emptyset$ ) 10 $\mu\text{m}$ (l)	Camundongos machos	Para as doses de 0,25, 0,5, and 0,75 $\text{mg kg}^{-1}$ , foi observado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e danos no DNA. Administração via injeção intraperitoneal.	(PATLOLLA <i>et al.</i> , 2016)
O-SWCNT	1,58 $\pm$ 0,20 nm ( $\emptyset$ ) 0,76 $\pm$ 0,70 $\mu\text{m}$ (l)	Embriões de camundongos fêmeas	Em concentrações acima de 100 ng/camundongo foram observados efeitos citotóxicos no desenvolvimento dos camundongos. Administração via intravenosa no plexo venoso retrobulbar.	(PIETROIU STI <i>et al.</i> , 2011)
DTPA-SWCNT	1 nm ( $\emptyset$ ) 300 - 1000 nm (l)	Camundongos fêmeas	Não foi observada a presença de doença renal na dose de 200 $\mu\text{L}$ . Não houve acúmulo do DTPA-SWCNT (diagnóstico por imagem $^{111}\text{In}$ ) em nenhum órgão do sistema reticuloendotelial (fígado e baço). Comparação com DTPA-MWCNT. Administração via injeção na cauda.	(SINGH <i>et al.</i> , 2006)
DOTA-SWCNT	1,1 nm ( $\emptyset$ ) 42 $\pm$ 17 nm (l)	Camundongos machos	Acúmulo de $^{86}\text{Y}$ -CNT no fígado, rim e baço. Rápida taxa de depuração no sangue, sendo o DOTA-SWCNT (0,012 mg) benéfico no uso de radionuclídeos de vida curta em diagnósticos. Administração via intravenosa e intraperitoneal.	(MCDEVITT <i>et al.</i> , 2007)
SWCNT conjugado com fosfolípídeo e ácido hialurônico	25 - 30 nm ( $\emptyset$ ) 1,5 $\pm$ 2 nm (l)	Camundongos Machos	Não houve alteração nas contagens de leucócitos ou aumento da liberação de enzimas hepáticas na dose de 100 $\mu\text{L}$ de 1 $\text{mg kg}^{-1}$ . Perspectivas em aplicações biomédicas. Administração via injeção intravenosa na cauda.	(DVASH <i>et al.</i> , 2013)

Tabela 1 - Principais aspectos de trabalhos para avaliação da toxicidade dos CNTs *in vivo* relatados na literatura.

(continuação)

Amostra	Características	Modelo	Comentários	Referência
COOH-SWCNT OH-SWCNT	2 - 3 nm (Ø) 30 - 50 nm (l)	Ratos machos	Com o uso do SWCNT foi observada a formação de agregados menores quando comparados com aqueles resultantes da administração de MWCNT, sendo estes facilmente dispersos no local. Administração de 4 mg de CNT via incisão na pele e no músculo esquelético (4 mm de profundidade).	(FRACZEK <i>et al.</i> , 2008)
COOH-SWCNT NH <sub>2</sub> -SWCNT	10 - 16 nm (Ø) 1 - 10 µm (l)	Camundongos machos	Observada maior toxicidade (apoptose e aumento de espécies reativas de oxigênio) quando SWCNT-NH <sub>2</sub> foi administrado. Comparação com MWCNTs funcionalizados. Administração de 4 mg kg <sup>-1</sup> de CNT via injeção intravenosa na cauda.	(MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2020)
<i>MWCNT não modificado</i>				
MWCNT	2,5 µm (l)	Ratos machos	Permanência do CNT nos pulmões dos ratos após 364 dias da administração das doses de 0,20 e 0,55 mg, indicando possível toxicidade. Administração via instilação intratraqueal.	(SHINOHARA <i>et al.</i> , 2016)
MWCNT	5,2 - 1,5 nm (Ø)- não tratado 5,1 - 2,1 nm (Ø)- cominuído 5,9 ± 0,05 µm (l)- não tratado 0,7 ± 0,07 µm (l)- cominuído	Ratos fêmeas	Foi observada inflamação nos pulmões para as doses de 0,5; 2 e 5 mg. Permanência do CNT (verificada através da concentração de Co, utilizado como catalisador no processo de síntese) nos pulmões mesmo após 60 dias da administração. Administração via instilação intratraqueal.	(MULLER <i>et al.</i> , 2005)
MWCNTs purificados	20 - 40 nm (Ø) 220 e 825 nm (l)	Ratos machos	Foram observadas respostas inflamatórias no tecido subcutâneo, sendo menos pronunciadas para o CNT de 220 nm de comprimento. Administração de 0,1 mg de CNT nas incisões na região torácica.	(SATO <i>et al.</i> , 2005)
MWCNT	20 - 30 nm (Ø) 5 - 50 µm (l)	Camundongos machos	Foram observados efeitos tóxicos no fígado para as doses de 60 e 100 mg kg <sup>-1</sup> . Administração via oral por gavagem.	(AWASTHI <i>et al.</i> , 2013)

Tabela 1 - Principais aspectos de trabalhos para avaliação da toxicidade dos CNTs *in vivo* relatados na literatura.

(continuação)

Amostra	Características	Modelo	Comentários	Referência
MWCNT	80 nm ( $\emptyset$ ) 10 - 20 $\mu$ m (l)	Camundongos machos	Toxicidade aguda nos pulmões para 40 $\mu$ g. Efeito mais pronunciado quando comparado com SWCNT. Administração via aspiração faríngea.	(ERDELY <i>et al.</i> , 2009)
MWCNT	100 - 150 nm ( $\emptyset$ ) 10 - 20 $\mu$ m (l)	Camundongos fêmeas	Foi observada a perda pronunciada de pelos e formação de calos nos camundongos tratados com CNT contendo maior concentração de Fe. Presença de Fe, mesmo em baixa concentração pode induzir a regeneração de espécies reativas de oxigênio. Administração de 1 mg de CNT na incisão subcutânea (1 cm).	(KOYAMA <i>et al.</i> , 2009)
MWCNTs	15 a 100 nm ( $\emptyset$ ) 0,5 a 56 $\mu$ m (l)	Camundongos fêmeas	Foi observada a eliminação dos CNTs mais curtos e a retenção dos CNTs mais longos, podendo levar a inflamação grave. Administração via injeção na cavidade pleural.	(MURPHY <i>et al.</i> , 2011)
MWCNT	5 - 20 nm ( $\emptyset$ ) 300 - 2000 nm (l)	Ratos machos	Com o uso do MWCNT foi observada a formação de agregados maiores quando comparados com aqueles resultantes da administração de SWCNT, permanecendo este no local da incisão. Administração de 4 mg de CNT via incisão na pele e no músculo esquelético (4 mm de profundidade).	(FRACZEK <i>et al.</i> , 2008)
MWCNTs	15 $\pm$ 5 nm( $\emptyset$ )- curto 20 - 100 nm ( $\emptyset$ )- longo 1 - 20 $\mu$ m (l)- curto 13 - 56 $\mu$ m (l) – longo	Camundongos fêmeas	Foi observada resposta inflamatória após 24 h da administração de 50 $\mu$ g de MWCNT longo (> 20 $\mu$ m de comprimento) e, após 7 dias, foi observada a formação de glaucoma. Administração via instilação intraperitoneal.	(POLAND <i>et al.</i> , 2008)
MWCNT	20 - 50 nm ( $\emptyset$ ) 0,5 - 2 $\mu$ m (l)	Ratos machos	Indução de apoptose de macrófagos alveolares dos pulmões para a dose de 100 $\mu$ g de MWCNT disperso em albumina. Administração via instilação intratraqueal.	(ELGRABLI <i>et al.</i> , 2008)
MWCNT	6 $\pm$ 2 nm ( $\emptyset$ ) 20 $\pm$ 10 $\mu$ m (l)	Camundongos fêmeas	Dose única de 40 $\mu$ g pode induzir resposta citotóxica e inflamatória nos pulmões. Administração via aspiração orofaríngea.	(HAN, ANDREWS e GAIROLA, 2010)



Tabela 1 - Principais aspectos de trabalhos para avaliação da toxicidade dos CNTs *in vivo* relatados na literatura.

(continuação)

Amostra	Características	Modelo	Comentários	Referência
MWCNT	5 -15 nm ( $\emptyset$ ) 0,1 - 10 $\mu$ m (l)	Ratos machos e fêmeas	Foi observado aumento de peso e inflamação nos pulmões. Administração via inalação de 0,1; 0,5 e 2,5 mg m <sup>-3</sup> CNT.	(MA-HOCK <i>et al.</i> , 2009)
MWCNT	49 $\pm$ 13,4 nm ( $\emptyset$ ) 3,86 $\mu$ m (l)	Camundongos machos	Inflamação e danos nos pulmões mesmo após 56 dias de exposição (40 $\mu$ g). Administração via inalação de 10 a 80 $\mu$ g de CNT.	(PORTER <i>et al.</i> , 2010)
MWCNT	10 - 20 nm ( $\emptyset$ ) 5 - 50 $\mu$ m (l)	Camundongos machos	Maior toxicidade no fígado em relação ao MWCNT funcionalizado. Administração via injeção intravenosa de 10 e 60 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.	(JI <i>et al.</i> , 2009)
MWCNT	10 - 20 nm ( $\emptyset$ ) < 1 $\mu$ m (l)	Camundongos machos	Indução mais pronunciada de toxicidade no fígado para doses de 10 e 60 mg kg <sup>-1</sup> . Comparação com Polietilenoglicol-MWCNT. Administração via injeção intravenosa.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)
MWCNTs	10 nm ( $\emptyset$ ) e 0,14 - 1,7 $\mu$ m (l) - MWCNTs puros e impuros  100 nm ( $\emptyset$ ) 0,16 - 1,8 $\mu$ m (l)-MWCNTs puros e impuros	Camundongos machos	Foi observado que MWCNTs com características diferentes (tamanho e pureza), causam danos de graus variados nas vias respiratórias mitocondriais e aumento das espécies reativas de oxigênio em diferentes partes do cérebro dos ratos. Administração via exposição por inalação de 5 mg m <sup>-3</sup> de MWCNTs.	(SAMIEI <i>et al.</i> , 2020)
<i>MWCNT funcionalizado</i>				
COOH, PEG, NH <sub>2</sub> , PEI-MWCNT	200 - 400 nm 1500 - 2500 nm (PEI) ( $\emptyset$ ) 200 - 580 nm (l)	Camundongos machos	Foram observadas diferentes respostas nos efeitos fibrogênicos nos pulmões na dose de 2 mg kg <sup>-1</sup> , sendo o efeito mais pronunciado na administração do PEI-MWCNT. Administração via aspiração orofaríngea.	(LI <i>et al.</i> , 2013)
COOH-MWCNT	15 - 30 nm ( $\emptyset$ ) 15 - 20 $\mu$ m (l)	Camundongos machos	Indução de hepatotoxicidade nas doses de 0,25 a 0,75 mg kg <sup>-1</sup> . Administração via injeção intraperitoneal.	(PATLOLLA, BERRY e TCHOUNWOU, 2011)

Tabela 1 - Principais aspectos de trabalhos para avaliação da toxicidade dos CNTs *in vivo* relatados na literatura.

(conclusão)

Amostra	Características	Modelo	Comentários	Referência
GLUCO-MWCNT	20 - 40 nm (Ø) Dezenas µm (l)	Camundongos fêmeas	Boa biocompatibilidade da suspensão de 300 µL de CNT (concentração não informada). Administração via injeção intraperitoneal.	(GUO <i>et al.</i> , 2007)
DTPA-MWCNT	30 - 38 nm (Ø) 0,5 - 2 µm (l)	Camundongos fêmeas	Não foi observada a presença de doença renal na dose de 200 µL. Não houve acúmulo do DTPA-MWCNT (diagnóstico por imagem <sup>111</sup> In) em nenhum órgão do sistema reticuloendotelial (fígado e baço). Comparação com DTPA-SWCNT. Administração via injeção na cauda.	(SINGH <i>et al.</i> , 2006)
<sup>14</sup> C-aurina-MWCNT	10 - 20 nm (Ø) 10 - 600 nm (l)	Camundongos machos	Acúmulo do composto no fígado. Foi observada toxicidade aguda baixa no fígado para a dose de 10 µg. Administração intravenosa.	(DENG <i>et al.</i> , 2007)
Polietilenoglicol-MWCNT	10 - 20 nm (Ø) < 1 µm (l)	Camundongos machos	Indução menos pronunciada de toxicidade no fígado para doses de 10 e 60 mg kg <sup>-1</sup> . Comparação com MWCNT não modificado. Administração via injeção intravenosa.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)
COOH-MWCNT	10 - 20 nm (Ø) 5 - 50 µm (l)	Camundongos machos	Baixa toxicidade no fígado em relação ao MWCNT não funcionalizado. Administração via injeção intravenosa de 10 e 60 mg kg <sup>-1</sup> de CNT.	(JI <i>et al.</i> , 2009)
COOH-MWCNT NH <sub>2</sub> -MWCNT	10 - 16 nm (Ø) 1 - 10 µm (l)	Camundongos machos	Observada maior toxicidade (apoptose e aumento de espécies reativas de oxigênio) quando MWCNT-NH <sub>2</sub> foi administrado. Administração de 4 mg kg <sup>-1</sup> de CNT via injeção intravenosa na cauda.	(MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2020)

Ø: diâmetro; l: comprimento; GLUCO: glucosamina; PEG: polietilenoglicol; DTPA: ácido dietilenotriaminopentacético; PEI: polieterimida; COOH: carboxilato; NH<sub>2</sub>: amina; DOTA: ácido 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra-il)tetra-acético.

É possível constatar a diversidade das características dos CNTs utilizados nos estudos de avaliação da toxicidade e, conseqüentemente, em alguns casos, respostas contraditórias dos possíveis efeitos tóxicos. Em relação à contribuição das impurezas metálicas que possam ser inseridas no processo de síntese do CNTs, somente poucos estudos avaliaram possíveis efeitos tóxicos. Lam et al., avaliaram a toxicidade nos pulmões de camundongos tratados com três tipos de SWCNTs obtidos por diferentes processos de síntese e contendo concentrações variadas de impurezas metálicas (Fe, Ni e Y). Como resposta, foi observada inflamação peribrônquica e necrose nos pulmões, após 90 dias da administração de 0,1 e 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de CNT. Houve a morte de 5 camundongos, de um total de 9, submetidos à dose máxima de CNT (maior concentração de Ni e Y, 26 e 5%, respectivamente) (LAM *et al.*, 2004).

Muller *et al.* avaliaram o efeito tóxico no sistema respiratório de ratos fêmeas, tratados com MWCNTs, submetidos ou não a um processo de cominuição por 6 h, contendo 0,95% de Co como catalisador. No caso em que o MWCNT foi cominuído, este como característica tubos de menor comprimento. De maneira geral, independente da dose (0,5, 2 e 5 mg) e do CNT, foi observada inflamação nos pulmões. O acúmulo e a biopersistência (0, 28 e 60 dias) dos CNTs foram verificados através da digestão dos pulmões por decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, com uma mistura de HNO<sub>3</sub> e HCl, seguida da determinação da concentração de Co por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). Como resultado, de maneira indireta, foi observada a presença de CNT nos pulmões, mesmo após 60 dias da administração, permanecendo 81% e 36% da concentração total de Co (em relação a concentração presente nos CNTs administrados) para o MWCNT não cominuído e cominuído, respectivamente (MULLER *et al.*, 2005).

Em outro trabalho, Koyama *et al.* investigaram a influência da presença de impurezas metálicas em MWCNTs e o seu efeito no sistema imunológico de camundongos fêmeas. Os autores relataram perda pronunciada de pelos e formação de calos na incisão subcutânea dos animais tratados com CNT contendo maior concentração de Fe, enquanto que os MWCNTs submetidos ao tratamento térmico de 2800 °C, demonstraram boa biocompatibilidade. Ainda, foi verificado que MWCNTs contendo Fe mesmo em baixa concentração (80 µg g<sup>-1</sup>), podem induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (KOYAMA *et al.*, 2009).

Recentemente, Samiei *et al.*, verificaram que MWCNTs com características diferentes (tamanho e pureza), causam danos de graus variados nas vias respiratórias mitocondriais e aumento das espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*, ROS) em diferentes partes do cérebro dos ratos. Neste caso, os autores destacam que MWCNTs de diâmetro e comprimento maior e contendo impurezas, como Co (0,12%), Fe (0,16%), Mo (0,12%) e Mg (0,13%), potencializam os efeitos tóxicos quando comparados com aqueles causados por MWCNTs puros e de tamanho menor (SAMIEI *et al.*, 2020).

É importante destacar que os trabalhos citados acima, exceto o desenvolvido por Muller *et al.*, relacionam o potencial efeito tóxico das impurezas metálicas presentes nos CNTs, apenas inferindo a concentração destas no CNT e não no órgão a ser analisado. Ainda, ressalta-se que os métodos de preparo de amostras empregados para decomposição dos CNTs e posterior determinação dos elementos, como, por exemplo, a fusão ou simplesmente extração ácida, são considerados inadequados uma vez que não possibilitam a decomposição completa podendo representar resultados subestimados.

A maior parte dos trabalhos avaliam o potencial efeito tóxico em relação ao tamanho, funcionalização e ao tipo de CNT. Nestes trabalhos, os autores inferem que efeitos de toxicidade mais pronunciados, foram observados quando CNTs de maior tamanho, não modificados e de paredes múltiplas foram empregados (ERDELY *et al.*, 2009; FRACZEK *et al.*, 2008; ITO *et al.*, 2007; JI *et al.*, 2009; KOLOSNAJ-TABI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2013; MOHAMMADI *et al.*, 2020; MURPHY *et al.*, 2011; PIETROIUSTI *et al.*, 2011; POLAND *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010). De maneira geral, CNTs de comprimento maior tendem a ter menor interação com as células, dificultando a eliminação destes por mecanismos de fagocitose e, conseqüentemente, o acúmulo do material. Quanto ao tipo de CNT, os SWCNTs, normalmente, são menos tóxicos devido ao menor tamanho (diâmetro entre 0,6 a 2,4 nm) e levam à formação de pequenos agregados de mais fácil eliminação, enquanto que os MWCNTs (diâmetro variando entre 2,5 a 100 nm) formam agregados maiores. Cabe destacar também que a modificação da superfície através da funcionalização facilita a solubilidade do CNT em meio aquoso, aumentando a dispersibilidade e diminuindo a formação de agregados.

Além dos efeitos tóxicos avaliados por parâmetros bioquímicos que incluem a produção de ROS e, geralmente, marcadores para monitorar lesões hepáticas e

lesões renais, estudos relacionados à presença dos CNTs em órgãos de animais também têm sido conduzidos. Neste caso, a finalidade é avaliar, além da toxicidade, onde os CNTs atuam ou se concentram, visando aplicações futuras dos CNTs como carreadores de fármacos e no tratamento de câncer (fototerapia), por exemplo.

Nesse sentido, poucos trabalhos voltados à investigação da presença de CNTs em órgãos específicos de animais foram relatados (CHERUKURI *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008; MCDEVITT *et al.*, 2007; SHINOHARA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2007). Dentre as estratégias mais utilizadas, destaca-se a marcação de CNTs através de radionuclídeos para posterior obtenção de imagens *in vivo*, empregando para isso, técnicas como a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (do inglês, *Single Photon Emission Computed Tomography*, SPECT), a tomografia por emissão de pósitrons (do inglês, *Positron Emission Tomography*, PET) (MCDEVITT *et al.*, 2007), a microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscopy*, TEM) (DENG *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2007) e a cintilografia (GUO *et al.*, 2007). No entanto, apesar dos resultados promissores com o uso destas técnicas, têm-se como desvantagens o relativo alto custo dos equipamentos, bem como a alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas dos CNTs modificados com marcador (LIU *et al.*, 2008; TAMURA *et al.*, 2011). Outro fator que deve ser levado em consideração é a forma de administração do CNT (intravenosa, oral, pulmonar e administração dérmica), uma vez que esta pode estar relacionada com a atuação ou acúmulo dos CNTs em órgãos específicos.

Com o objetivo de minimizar os problemas inerentes ao uso de marcadores, Tamura *et al.* propuseram um método direto para determinar a presença de MWCNTs em pulmões de ratos tratados via instilação intratraqueal. O método baseia-se na combustão do carbono presente no MWCNT gerando CO<sub>2</sub> e posteriormente detectado por infravermelho não dispersivo. Interferências oriundas do carbono presente no tecido dos pulmões, são removidas previamente por digestão ácida em sistema aberto, seguida da combustão por via seca em forno tipo mufla e pré-aquecimento *in situ* (TAMURA *et al.*, 2011). Posteriormente, Shinohara *et al.* também demonstraram a aplicabilidade deste método para verificar a presença de MWCNTs no fígado, pulmão e cérebro de ratos. Dentre os órgãos analisados, foi observada a permanência do CNT nos pulmões dos ratos após 364 dias da administração de doses de 0,20 e 0,55 mg de CNT, indicando possível toxicidade

(SHINOHARA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, está sendo dada ênfase para estudos relacionados à verificação da distribuição espacial dos elementos (bioimageamento). A obtenção de bioimagens dos órgãos dos animais é uma forma de verificar o acúmulo do composto administrado em determinada região ou espaço dos mesmos, bem como mapear possíveis lesões e compreender as rotas de exposição. Para isso, diversas técnicas têm sido propostas, dentre elas a ablação com laser combinada com a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS). Apesar disso, a LA-ICP-MS ainda não foi empregada para estudos de bioimageamento em tecidos de ratos submetidos a tratamentos com CNTs.

Diante do exposto, é possível observar que, apesar dos esforços para mensurar o possível efeito tóxico dos CNTs, de acordo com os trabalhos publicados, muitos questionamentos e respostas contraditórias são encontrados na literatura. No que diz respeito à presença de CNTs nos órgãos, a estratégia indireta de determinar a concentração dos metais, principalmente aqueles utilizados como catalisadores no processo de síntese, pode ser considerada promissora. Além disso, há a carência de estudos voltados para a obtenção de bioimagens empregando a LA-ICP-MS.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM CNTS E EM TECIDOS BIOLÓGICOS

É importante destacar que a estratégia indireta de determinar a concentração dos contaminantes inorgânicos dos CNTs nos órgãos dos animais e, posteriormente, inferir a presença do CNT, apesar de ser considerada simples e promissora, requer atenção especial no que diz respeito à adequabilidade do método de preparo de amostra e da técnica de determinação. Isso se faz necessário em função das diferenças nas características de ambas as matrizes, sendo os CNTs considerados de difícil decomposição, enquanto que para os tecidos dos animais o desafio é a pequena quantidade de amostra. Dessa forma, é desejável que o método de preparo de amostra atenda aos requisitos para ambas as situações: diluição mínima já que a quantidade de amostra é baixa e eficiência na decomposição do CNT.

A determinação de contaminantes inorgânicos em CNTs é, de fato, considerada um desafio analítico, uma vez que estes materiais apresentam elevada estabilidade química e resistência à oxidação por ácidos concentrados, mesmo sob

elevada temperatura e pressão. Isso dificulta sua decomposição por métodos convencionais, tais como a decomposição por via úmida. Conseqüentemente, a aplicabilidade de técnicas espectrométricas baseadas em nebulização convencional de soluções como sistema de introdução da amostra no atomizador ou fonte de ionização, alternativa mais comum em grande parte dos laboratórios de controle de qualidade, também é dificultada.

Para a determinação de contaminantes inorgânicos em CNTs, a maior parte dos poucos trabalhos publicados propõe o uso de técnicas espectrométricas baseadas em plasma, como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Tais técnicas destacam-se pela possibilidade de determinação de elementos em baixas concentrações, devido, principalmente, aos baixos limites de detecção obtidos, ampla faixa linear e capacidade multielementar. Entretanto, apesar destas técnicas possuírem uma série de vantagens, é fundamental que se tenha atenção especial durante a determinação, uma vez que ambas são suscetíveis à interferências espectrais e não espectrais.

As principais interferências não espectrais estão relacionadas com propriedades físicas que causam mudanças no transporte da amostra até o plasma tais como a densidade, viscosidade e tensão superficial (presença de carbono nos digeridos) (GRINDLAY *et al.*, 2008; LECLERCQ *et al.*, 2015). Ainda, a presença de carbono nos digeridos finais pode afetar a ionização de alguns elementos no plasma durante as determinações e/ou contribuir para interferências espectrais poliatômicas (em ICP-MS), causando resultados subestimados ou superestimados para alguns elementos (GRAS, HERNANDIS e MORA, 2002). Na técnica de ICP-OES, devido à complexidade do espectro gerado (somatório da emissão de radiação das espécies presentes naturalmente no plasma e outras introduzidas com a amostra) pode haver a sobreposição de linhas espectrais. Dessa forma, é de extrema importância a utilização de um método de decomposição eficiente, proporcionando digeridos finais com baixos teores de carbono em solução e ausência de sólidos dissolvidos, que podem causar entupimento e deposição.

Na etapa de decomposição, em função da dificuldade da matriz, os métodos mais utilizados para CNTs são a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD), a decomposição em tubo de Carius e a decomposição por via seca (AYOUNI-DEROUCHE *et al.*, 2014; GE *et al.*, 2008; GRINBERG *et al.*, 2015;

LIM, BAIRI e FONG, 2017; MELLO *et al.*, 2011; MORTARI *et al.*, 2010; PATOLE *et al.*, 2016; RESANO *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2010; ZEISLER *et al.*, 2011). Dentre os métodos disponíveis, é possível constatar a predominância do uso da decomposição por via úmida, apesar de a maior parte dos autores relatar a dificuldade de decomposição, mesmo para massas de CNTs relativamente pequenas, como 5 mg (LIM, BAIRI e FONG, 2017; YANG *et al.*, 2010), 20 mg (GE *et al.*, 2008), 30 mg (PATOLE *et al.*, 2016), 50 mg (MELLO *et al.*, 2011) e 100 mg (MORTARI *et al.*, 2010), com a presença de resíduos remanescentes nos digeridos finais, mesmo com aplicação de elevada temperatura e pressão durante a decomposição

Alternativamente, a fim de superar os problemas relacionados à massa de CNTs a ser decomposta, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foi proposta para a decomposição de CNTs e posterior determinação de Co, Cr, Fe, Hg, Mo, Ni, La e Pb por ICP-MS e de halogênios por cromatografia de íons (IC) e ICP-MS (GRINBERG *et al.*, 2015; MORTARI *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2010). Destaca-se que, no trabalho desenvolvido por Grinberg *et al.*, somente 25 mg de SWCNT foram decompostos utilizando 6 mL de uma mistura de HNO<sub>3</sub>+HCl (3+1) como solução absorvedora. Dentre os analitos, foi observada dificuldade na recuperação para Cr, o que foi justificado pelos autores, como sendo consequência de este elemento estar presente como um composto de difícil solubilização (GRINBERG *et al.*, 2015). A viabilidade de utilização da MIC para posterior determinação de contaminantes inorgânicos utilizados como catalisadores (por exemplo, Al, Co, Cr, Fe, La, Mo e Ni), juntamente com contaminantes inorgânicos em baixa concentração, como As, Cd e Pb, foi investigada por Krzyzaniak, S. R (KRZYZANIAK, 2016). Neste caso, foram necessários 15 min de refluxo, uma mistura de HNO<sub>3</sub>+HCl na proporção 3+1 como solução absorvedora, para a decomposição de 100 mg de CNT. É importante ressaltar que a utilização de 100 mg de CNT foi a massa estabelecida devido à influência da massa de amostra na recuperação de Al, Cr, Fe e Mg, sendo possível, a utilização de massas de até 500 mg de CNT para os demais analitos.

Recentemente, Krzyzaniak *et al.* propuseram um método baseado no emprego de um sistema de decomposição baseado na tecnologia da câmara única de reação assistida por radiação micro-ondas (Ultrawave<sup>®</sup>, Single Reaction Chamber, Milestone), para posterior determinação de contaminantes inorgânicos (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Fe, La, Mg, Mo, Ni, Pb e Zn) por ICP-OES e por ICP-MS (KRZYZANIAK *et al.*, 2019). Neste trabalho, foi possível decompor massas de CNTs



relativamente altas (275 mg), sendo considerada a maior já relatada na literatura, utilizando 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% como solução de decomposição. Cabe destacar que tais condições só foram possíveis devido ao sistema empregado, que permite a decomposição na pressão máxima de 160 bar e temperatura de 270 °C.

No que diz respeito aos métodos de decomposição aplicados à amostras de tecidos biológicos, destaca-se a utilização da decomposição por via úmida com ácido oxidante concentrado (comumente HNO<sub>3</sub>), misturas de ácidos oxidantes ou uma mistura de ácido com peróxido de hidrogênio. A decomposição pode ser feita em sistemas abertos ou fechados, com aquecimento convencional ou por radiação micro-ondas. A decomposição em sistema aberto e aquecimento em bloco digestor, é a mais difundida entre os laboratórios principalmente pela elevada frequência analítica que possibilita e pela simplicidade, sendo particularmente adequada para quantidades de amostra pequenas (poucos mg) onde se adicionam poucos mililitros de reagentes (BARIN *et al.*, 2016). No entanto, uma vez que o sistema opera à temperatura ambiente, a escolha do ácido deve ser feita em função de sua temperatura de ebulição. Quando o ácido nítrico é utilizado, por exemplo, a temperatura não deve exceder 122 °C, o que é insuficiente para a decomposição de amostras de matriz mais complexa, como os CNTs. Além disso, há risco de perdas de analitos por volatilização e/ou contaminação, bem como a obtenção de digeridos finais com teores elevados de carbono em solução (em relação aos obtidos empregando sistema fechado) (BARIN *et al.*, 2016).

A fim de contornar essas limitações, atualmente, a decomposição de tecidos biológicos em sistemas fechados assistida por radiação micro-ondas tem sido preferencialmente utilizada. A eficiência de decomposição da amostra (menores valores de carbono em solução) é garantida pela ação dos ácidos, que tem um aumento no seu ponto de ebulição devido ao aumento da pressão (MORAES *et al.*, 2016). Apesar da eficiente decomposição de tecidos biológicos, a frequência analítica pode não ser adequada para trabalhos como os de Koyama, Lam, Muller, Samiei e seus colaboradores (KOYAMA *et al.*, 2009; LAM *et al.*, 2004; MULLER *et al.*, 2005; SAMIEI *et al.*, 2020), que analisaram um número significativo de amostras. Além disso, normalmente é preciso utilizar um volume mínimo de reagente, dependendo do fabricante, que pode ser elevado demais quando se tem poucos mg de amostra, levando à diluições excessivas.

Nos últimos anos, a preocupação e a busca por métodos considerados mais “verdes” levou, dentre outras mudanças, ao desenvolvimento de métodos que empregam menores quantidades de reagentes e, conseqüentemente, possibilitam menores volumes de resíduos gerados. Nessa linha, diversos trabalhos foram desenvolvidos para a decomposição de tecidos biológicos empregando soluções diluídas de  $\text{HNO}_3$  (1 a 2 mol  $\text{L}^{-1}$ ) juntamente com um reagente auxiliar ( $\text{O}_2$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), necessário para a regeneração do  $\text{HNO}_3$  (BIZZI *et al.*, 2014; BIZZI *et al.*, 2010; BIZZI *et al.*, 2014; GONZALEZ *et al.*, 2009). Observa-se, porém, que as condições empregadas para decomposição de tecidos biológicos, tais como sistemas que operam à temperatura ambiente e permitem trabalhar em temperaturas e pressões reduzidas, não são adequadas para a decomposição de CNTs.

## 2.5 MAPEAMENTO DE ELEMENTOS USANDO ABLAÇÃO POR LASER COMBINADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (LA-ICP-MS)

A obtenção de bioimagens de tecidos biológicos, neste caso de órgãos dos animais, é uma forma de verificar o acúmulo de alguma substância/material ou elemento administrado ou de elementos essenciais, em determinada região ou espaços dos mesmos. Também, permite mapear possíveis lesões e compreender as rotas de exposição (WEHE *et al.*, 2015). As bioimagens podem ser obtidas por técnicas analíticas como a espectrometria de massa de íon secundário (do inglês, *Secondary Ion Mass Spectrometry*, SIMS) (MAI *et al.*, 2006), a fluorescência de raios-X (do inglês, *X-Ray Fluorescence*, XRF) (PUNSHON *et al.*, 2005), a micro fluorescência de raios-X (do inglês, *Micro-X-Ray Fluorescence*,  $\mu\text{XRF}$ ) (DESOUZA *et al.*, 2013) e a LA-ICP-MS (POZEBON *et al.*, 2014). Dentre as técnicas de bioimagem, a escolha vai depender da sensibilidade, seletividade e resolução espacial necessária.

A combinação da ablação por laser (LA) com a técnica de ICP-MS, trouxe inúmeras vantagens, destacando-se, principalmente, a elevada sensibilidade e possibilidade de análise direta de amostras sólidas (F. DURRANT, 1999). Para análise por LA-ICP-MS, a amostra é introduzida em uma câmara de ablação purgada com gás inerte (Ar ou He) e, em seguida, o feixe de radiação laser (normalmente cristal de Nd:YAG) é incidido sobre a amostra (GÜNTHER e

HATTENDORF, 2005). Quando a irradiação é suficientemente energética, a amostra será ablada, formando vapor, partículas e aglomerados que são transportados até o plasma do equipamento de ICP-MS. Este funciona como uma fonte de ionização adicional, onde as partículas geradas na ablação são vaporizadas, atomizadas e ionizadas. A análise pode ser feita diretamente na amostra *in natura*, sem qualquer preparo prévio ou, dependendo da aplicação, a amostra pode ser seccionada ou fatiada, geralmente com espessura da ordem de 10 a 500  $\mu\text{m}$ , e fixada em um suporte.

A técnica tem passado por crescentes desenvolvimentos para ampliar sua aplicação. Um dos desafios é que durante o processo de ablação as partículas de uma mesma amostra podem variar em tamanho e geometria, afetando a eficiência de transporte das mesmas da câmara de ablação até o plasma. Ambos os efeitos contribuem para a variação do sinal do analito, uma vez que a eficiência de vaporização, atomização e ionização dependem da quantidade de partículas que chegam até o plasma e do tamanho das mesmas (LIMBECK *et al.*, 2015). Esses efeitos são conjuntamente chamados de fracionamento, e são muito dependentes da matriz da amostra e do elemento que é determinado (MILISZKIEWICZ, WALAS e TOBIASZ, 2015).

Uma das estratégias para minimizar e/ou corrigir interferências é o uso de um padrão interno (PI). Idealmente, o PI a ser escolhido deve atender alguns requisitos, como: estar presente na amostra, ser distribuído homogeneamente, estar na mesma faixa de concentração do analito, ter razão massa/carga ( $m/z$ ) próxima à do analito e que o processo de ablação e ionização no plasma seja semelhante ao do analito. Dentre as opções, o  $^{13}\text{C}$ , embora não atenda a todos os requisitos, é o PI mais utilizado para análise de materiais botânicos e biológicos pelo fato de ser um dos principais constituintes dos tecidos e ter uma distribuição relativamente homogênea (F. DURRANT, 1999; LIMBECK *et al.*, 2015).

Adicionalmente, é importante destacar também que existem diversas estratégias a serem adotadas para minimizar os efeitos de fracionamento elementar, sendo que a escolha de uma em detrimento da outra, depende do objetivo da análise e do tipo de amostra a ser analisada (GÜNTHER e HATTENDORF, 2005; POZEBON, DRESSLER e SCHEFFLER, 2017). Quando se objetiva avaliar qualitativamente a distribuição e translocação de elementos em tecidos biológicos, por exemplo, a estratégia da padronização interna com  $^{13}\text{C}$ , citada anteriormente,

mostra-se adequada. Entretanto, para análises quantitativas destacam-se como estratégias de calibração os procedimentos que fazem o uso de *i)* diferentes materiais de referência certificados, com matriz semelhante ou não às amostras; *ii)* um único material de referência com adição de quantidades crescentes dos analitos ou *iii)* amostras previamente caracterizadas quanto à composição elementar e enriquecidas com quantidades crescentes dos elementos a serem investigados (HANC *et al.*, 2014).

A aplicação da técnica de LA-ICP-MS para análises qualitativas e semi-quantitativas de tecidos animais para verificação da absorção de fármacos, nanopartículas (NPs) (NP-Au, NP-Ag, por exemplo), estudos de acúmulo e distribuição de metais, bem como estratégias utilizadas para estas finalidades, têm sido descrita com êxito em artigos de revisão recentes (POZEBON, DRESSLER e SCHEFFLER, 2017; POZEBON *et al.*, 2014). Apesar da aplicabilidade da LA-ICP-MS em estudos envolvendo nanopartículas, não foram encontrados trabalhos relacionados ao uso da técnica para análise de tecidos com CNTs.

Dessa forma, a fim de demonstrar a aplicabilidade da LA-ICP-MS para análise de biodistribuição de NPs em tecidos de animais, na Tabela 2 estão resumidas particularidades de trabalhos encontrados na literatura.

Tabela 2 - Bioimagens de NPs em tecidos de animais obtidas por LA-ICP-MS.

(continua)

Nanopartícula	Características	Modelo	Comentários	Referência
Gd	Nanocomplexo de Gd (fórmula não especificada)	Ratos machos	Tecidos: cérebro. Administração de 4 $\mu$ L da formulação do nanocomplexo. Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 266 nm, frequência de 10 Hz. Análise qualitativa de biodistribuição sem o uso de PI. A biodistribuição do Gd no cérebro coincidiu com as imagens obtidas por ressonância magnética. A distribuição do Fe por LA-ICP-MS mostra regiões de possível hemorragia que não foram verificadas por ressonância magnética.	(PUGH <i>et al.</i> , 2012)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Gd dopado com NP-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (13 nm)	Camundongos machos	Tecidos: tumor (perna). Administração de 1 mg de Gd dopado com NP-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> via injeção intramuscular. Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 213 nm, frequência de 10 Hz. Análise qualitativa de biodistribuição sem o uso de PI. Após o tratamento de uma camada de tecido tumoral por hipotermia de fluido magnético, foi observado que a distribuição de Gd foi similar a do Fe. A distribuição de C, P, S e Zn revelou que o efeito do tratamento com hipotermia depende da difusão do fluido magnético no tecido.	(HSIEH <i>et al.</i> , 2011)
Au	10 nm	Camundongos machos	Tecidos: cérebro. Após eutanásia, as NPs-Au foram adicionadas sobre as camadas do cérebro. Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG. Análise qualitativa com normalização. NP-Au foi utilizada como marcador para avaliar a co-localização de Fe em todo o cérebro do camundongo. Na análise de biodistribuição de Fe, foi observado que este estava presente em regiões com potencial de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Parkinson.	(PAUL <i>et al.</i> , 2015)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	NPs-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> dopadas com Eu <sup>3+</sup>	Camundongos	Tecido: fígado e coração com aorta. Antes da eutanásia (3 h) foi feita a administração de 500 $\mu$ M Fe kg <sup>-1</sup> de camundongo. Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 213 nm, frequência de 20 Hz. Análise quantitativa com padrões de NPs-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> dopadas com Eu <sup>3+</sup> adicionadas em tecido de fígado de camundongos. NPs-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> dopadas com Eu <sup>3+</sup> foram testadas para verificar a aplicabilidade destas em substituição ao pigmento azul da prússia. A LA-ICP-MS possibilitou a análise específica e quantitativa de Fe nos tecidos.	(SCHARLACH <i>et al.</i> , 2016)

Tabela 2 - Bioimagens de NPs em tecidos de animais obtidas por LA-ICP-MS.

(continuação)

Nanopartícula	Características	Modelo	Comentários	Referência
La <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	15 a 30 nm	Ratos machos	Osso fêmur. Administração por via oral (gavagem) de 1, 10 e 100 mg kg <sup>-1</sup> de La <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 266 nm, frequência de 20 Hz. Análise qualitativa usando Ca como PI. Foi investigado o acúmulo de La e a influência deste na distribuição de Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Na, Pb, Sr e Zn. O acúmulo de La foi observado somente na superfície do osso e foi observada influência maior na distribuição de Mg.	(DRESSLER <i>et al.</i> , 2019)
Au	80 nm	Camundongos Fêmeas	Tecidos: coração, pulmão, baço, fígado e rim. Administração via injeção intravenosa de 57 mg kg <sup>-1</sup> de NPs-Au. Coleta dos tecidos após 1, 3, 8 e 24 h após a administração. Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 213 nm, frequência de 1 Hz. Análise quantitativa empregando NPs-Au em rim de porco. Empregando a técnica de LA-ICP-MS de partícula única (SP) foi verificado que, dentre os tecidos investigados, houve um acúmulo maior de NPs-Au no fígado após 8 h da administração. Na análise quantitativa da distribuição do tamanho foi verificado que as NPs não se aglomeraram, permanecendo em aproximadamente 80 nm.	(LI <i>et al.</i> , 2017)
Ag	50 nm	Ratos fêmeas	Tecidos: pulmão, rim, fígado e baço. Administração via injeção intratraqueal de 37,5 a 300 µg NPs-Ag pulmão <sup>-1</sup> . Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 213 nm, frequência de 10 Hz. Análise quantitativa empregando padrões de AgNO <sub>3</sub> em tecido de fígado. Foi observado que em doses maiores que 75 µg NPs-Ag pulmão <sup>-1</sup> houve o acúmulo de Ag em locais específicos dos demais órgãos investigados.	(WIEMANN <i>et al.</i> , 2017)

Tabela 2 - Bioimagens de NPs em tecidos de animais obtidas por LA-ICP-MS.

(continuação)

Nanopartícula	Características	Modelo	Comentários	Referência
Quantum dots (QDs) Cd/Se	Núcleo composto por Cd/Se/Te, recoberto com ZnS e modificado com grupos -COOH. QDs de 13 nm.	Camundongos machos	Tecidos: pulmão, músculos, fígado e baço. Administração via instilação intratraqueal de 60 µg de QDs. Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 213 nm, frequência de 20 Hz. Análise qualitativa e quantitativa empregando padrões de Cd em tecido de rim. Pela análise de biodistribuição foi observado que os QDs permaceram somente nos pulmões dos animais. Também foi verificada a biodistribuição de C, P, S, Fe, Cu, Zn, Se e Te no pulmão, sendo observado um aumento da concentração de Cu, provavelmente, devido à respostas do sistema imunológico induzidas pelos QDs.	(HSIEH <i>et al.</i> , 2013)
CeO <sub>2</sub>	30-50 nm	Camundongos machos	Tecidos: baço e fígado. Administração via injeção intraperitoneal de 4 mg kg <sup>-1</sup> de CeO <sub>2</sub> todos os dias por 7 dias e 0,08 mg kg <sup>-1</sup> de CeO <sub>2</sub> todos os dias por 28 dias. Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 213 nm, frequência de 20 Hz. Análise quantitativa empregando padrões de Ce, Cu e Zn em gelatina. Na análise de biodistribuição do Ce, complementada pelas distribuições de Cu e Zn, foi observado o acúmulo de Ce em regiões específicas dos órgãos investigados. Possível toxicidade das NPs-CeO <sub>2</sub> no fígado dos camundongos submetidos ao tratamento de 28 dias.	(CHEN <i>et al.</i> , 2019)
Gd	NPs lipossômicas de Gd ligadas a PEG	Camundongos fêmeas	Tecidos: rim e tumor. Administração via injeção única na cauda de 200 µL de solução lipossômica (contendo 0,724 µm de Gd). Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 266 nm, frequência de 10 Hz. Análise qualitativa sem o uso de PI. Foi verificada a presença de Gd em maior proporção nas regiões de maior vascularização do tecido tumoral. A presença de Gd nos rins também foi confirmada.	(KAMALY <i>et al.</i> , 2010)

Tabela 2 - Bioimagens de NPs em tecidos de animais obtidas por LA-ICP-MS.

(conclusão)

Nanopartícula	Características	Modelo	Comentários	Referência
Y, Tm, Gd e Yb	NPs-Y, Tm, Gd e Yb ligadas a PEG. (PEG-UCNPs)	Camundongos fêmeas	Tecidos: coração, baço, fígado, pulmões e rim. Administração via injeção intravenosa de 150 $\mu$ L de PEG-UCNPs (contendo 15 mg Y kg <sup>-1</sup> ). Coleta dos tecidos após 1 h, 6 h, 24 h, 7 e 30 dias após a administração. Condições experimentais: sistema de laser de Nd:YAG, 213 nm, frequência de 20 Hz. Análise qualitativa sem o uso de PI. Os PEG-UCNPs foram distribuídos principalmente no fígado e baço, com níveis mais baixos sendo observado nos rins, coração e pulmões. Foi feita a análise de biodistribuição do Cu, Fe e Zn no fígado e no baço, sendo verificado que o fígado é o órgão de depuração primário pela distribuição de Cu.	(LI <i>et al.</i> , 2017)



Com base nos trabalhos citados na Tabela 2, é possível afirmar que a LA-ICP-MS tem sido majoritariamente empregada na obtenção de bioimagens para análise qualitativa de biodistribuição dos elementos (DRESSLER *et al.*, 2019; HSIEH *et al.*, 2013; HSIEH *et al.*, 2011; KAMALY *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2017; PAUL *et al.*, 2015; PUGH *et al.*, 2012). Na maioria dos trabalhos citados na Tabela 2 não foi usado PI, sendo a bioimagem obtida apenas pela intensidade do sinal bruto. Ainda, na análise qualitativa somente alguns poucos trabalhos mencionam problemas de fracionamento e fazem o uso de PI a fim de minimizá-los (DRESSLER *et al.*, 2019; PAUL *et al.*, 2015). Para a análise quantitativa, a estratégia de calibração empregando matriz similar a da amostra com adição de soluções de referência com diferentes concentrações dos analitos tem sido a mais utilizada (CHEN *et al.*, 2019; HSIEH *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017; WIEMANN *et al.*, 2017). Nestes trabalhos, os autores mencionam as dificuldades em analisar nanomaterias, principalmente devido à heterogeneidade das NPs em relação ao tamanho das mesmas e, ainda, destacam a carência de padrões, necessários para calibração. De maneira geral, é possível constatar a adequabilidade da técnica de LA-ICP-MS para análise de biodistribuição de NPs em tecidos de animais, possibilitando a verificação do local onde estas atuam ou se concentram e, em alguns trabalhos específicos, como estas influenciam na distribuição de outros elementos essenciais, como Cu, Fe e Zn, por exemplo.

Diante do exposto, e tendo em vista as divergências e dificuldades na mensuração de possíveis efeitos tóxicos dos CNTs, fica ressaltada a importância do presente estudo.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

*Neste capítulo são descritos a instrumentação, os reagentes, os materiais e as amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. Além disso, são descritos os procedimentos e métodos utilizados, com ênfase no método de decomposição avaliado e na aquisição de imagens por LA-ICP-MS.*

### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para a decomposição dos tecidos, fluidos e pelos dos animais por digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC), foi utilizado um forno de micro-ondas (MultiWave 7000<sup>®</sup>, Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Áustria, [www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com)), equipado com dezoito frascos de quartzo, com capacidade individual de 18 mL. A câmara foi operada com pressão de argônio (40 bar), possibilitando a decomposição na pressão máxima de 160 bar e temperatura que pode chegar a até 270 °C. A Figura 2 mostra o forno de micro-ondas utilizado.

Figura 2 - Forno de micro-ondas (MultiWave 7000<sup>®</sup>, Anton Paar).



O procedimento de digestão ácida por aquecimento convencional foi feito usando um bloco de aquecimento (modelo DK 42, Velp Scientífica, Itália) equipado com frascos de vidro com 1,8 e 24,4 cm de diâmetro e altura, respectivamente, o qual permite programação de temperatura.

A determinação dos contaminantes inorgânicos contidos nos CNTs e nos tecidos, fluidos e pelos dos animais foi feita através de um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Spectro Ciros CCD<sup>®</sup>, Spectro Analytical Instruments, Alemanha, [www.spectro.com](http://www.spectro.com)), equipado com câmara

de nebulização de duplo passo (Scott, Spectro Analytical Instruments), nebulizador do tipo “*cross-flow*” (Spectro Analytical Instruments) e tocha com tubo injetor de quartzo, com 2,5 mm de diâmetro interno (Spectro EOP Quartz Torch, Glass Expansion, Austrália, [www.geicp.com](http://www.geicp.com)). Este mesmo equipamento também foi utilizado para a determinação de carbono dos digeridos finais obtidos após a decomposição das amostras por MAWD-PDC. As linhas de emissão foram escolhidas em função da sensibilidade e, quando possível, ausência de interferências.

A determinação de contaminantes inorgânicos em baixa concentração, como As, Cd e Pb foi feita com um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRC II, Perkin Elmer Sciex, Thornhill, Canadá, [www.perkinelmer.com.br](http://www.perkinelmer.com.br)), equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard, Golden, EUA, [www.meinhard.com](http://www.meinhard.com)), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion Inc., West Meulborne, Austrália, [www.geicp.com](http://www.geicp.com)) e tocha com tubo injetor de quartzo, com 2 mm de diâmetro interno. As determinações por ICP-OES e por ICP-MS foram feitas utilizando argônio de alta pureza (99,998% de pureza, White Martins, Brasil, [www.whitemartins.com.br](http://www.whitemartins.com.br)). Na Tabela 3, são mostradas as condições operacionais para a determinação elementar por ICP-OES e ICP-MS.

Tabela 3 - Condições operacionais para a determinação elementar por ICP-OES e por ICP-MS.

Parâmetro	ICP-OES	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência, W	1400	1300
Vazão do gás principal, L min <sup>-1</sup>	12,0	15
Vazão do gás auxiliar, L min <sup>-1</sup>	1,0	1,2
Vazão do gás nebulizador, L min <sup>-1</sup>	1,0	1,08
Câmara de nebulização	Duplo passo	Ciclônica
Nebulizador	<i>Cross-flow</i>	Concêntrico
Cone de amostragem e <i>skimmer</i>	-	Pt
Linha de emissão, nm	Al 393,153; As 189,042; Ca 396,847; Co 238,892; Cu 324,754; Cd 214,438; Cr 205,552; Fe 259,941; La 408,672; Mo 202,095; Mg 280,270; Mn 259,373; Ni 221,648; Pb 168,215; V 292,464; Zn 213,856; C* 193,030; Y* 371,029	-
Isótopos monitorados, m/z	-	<sup>75</sup> As, <sup>59</sup> Co, <sup>63</sup> Cu, <sup>111</sup> Cd, <sup>52</sup> Cr, <sup>139</sup> La, <sup>98</sup> Mo, <sup>55</sup> Mn, <sup>60</sup> Ni, <sup>208</sup> Pb, <sup>51</sup> V, <sup>64</sup> Zn

\* determinação de carbono em solução.

Para a obtenção das bioimagens foi usada a LA-ICP-MS. O sistema LA contém uma fonte de laser do tipo Nd:YAG, operando no comprimento de onda de 266 nm (modelo LSX-266, Cetac Technologies, USA). A fonte de excitação do cristal de Nd:YAG é constituída por uma lâmpada de arco de xenônio mantida em 605 V, 72 W e pulso de 20 Hz. A energia do laser pode ser ajustada de 0 a 100%, sendo que a energia nominal do feixe a 100% corresponde a 15 mJ e o tempo da duração do pulso do laser é inferior a 6 ns. O sistema possui ainda uma câmera CCD com resolução de até 2  $\mu$ m, que permite a visualização da superfície da amostra. A amostra é inserida em uma câmara de ablação, medindo aproximadamente 50 mm de diâmetro e 50 mm de altura (volume de aproximadamente 80 mL), a qual tem movimento em três dimensões (x, y e z). O controle de todas as funções do laser é feito pelo *software* DigiLaz G2 (versão 4.1.2.1940, fornecido pelo fabricante do

sistema de laser), que é executado em um computador associado ao sistema. As condições operacionais do sistema LA-ICP-MS foram adaptadas de Nunes et al. e estão citadas na Tabela 4 (NUNES *et al.*, 2016).

Tabela 4 - Condições operacionais do laser para a obtenção de biomagens de tecido animal por LA-ICP-MS.

Parâmetro	Condição
Gás de arraste (Ar), L min <sup>-1</sup>	1,30
Diâmetro do feixe, µm	100
Velocidade de varredura, µm s <sup>-1</sup>	150
Frequência do pulso de laser, Hz	20
Energia*, %	15

\* A energia de 100% corresponde a 15 mJ.

As imagens de distribuição dos elementos foram obtidas através da intensidade dos sinais gerados pelo equipamento de ICP-MS. Para isso, os dados foram exportados em formato .xls e, posteriormente, processados pelo programa RStudio (versão X).

Todas as pesagens foram feitas em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu do Brasil, Brasil, [www.shimadzu.com.br](http://www.shimadzu.com.br)), com resolução de 0,001 g e carga máxima de 220 g. A secagem dos CNTs foi feita em uma estufa convencional com circulação de ar (modelo 400/2ND, Nova Ética, Brasil, [www.novaetica.com.br](http://www.novaetica.com.br)).

Para a homogeneização das suspensões de CNTs administradas nos animais, foi utilizado um banho ultrassom multifrequência (modelo Transsonic TI-H-5, Elma, Alemanha, [www.elma-ultrasonic.co.nz](http://www.elma-ultrasonic.co.nz)), com potência efetiva de 100 W e frequência de 25/45 kHz.

A determinação da acidez residual nos digeridos foi feita por titulação em meio aquoso, utilizando um titulador automático (modelo Titrand 836, Metrohm, Herisau, Suíça, [www.metrohm.com](http://www.metrohm.com)), equipado com módulo de agitação magnética (modelo 803 Ti Stand, Metrohm), uma bureta de 20 mL (modelo Dosino 800, Metrohm) e um eletrodo de pH de vidro combinado, para medição de pH em meio aquoso (modelo 6.0262.100, Metrohm).

Para a avaliação histológica foi utilizado um microscópio (OLYMPUS CX21 microscópio, OLYMPUS câmera). A análise foi feita no Laboratório de Patologia e Biologia oral da UFSM.

A avaliação e discussão dos resultados foi baseada em testes estatísticos utilizando o *software* GraphPad InStat, versão 3.0, 1997 (GraphPad InStat Software, San Diego, Califórnia, EUA). Para a comparação de médias foi utilizado o teste *t-student* ou, quando pertinente, a análise de variância (ANOVA), ambos com nível de confiança de 95%. A avaliação dos testes bioquímicos foi feita empregando o *software* GraphPad Prism 7.

## 3.2 ANIMAIS USADOS NO ESTUDO

Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas adultas, nulíparas e não-grávidas e ratos *Wistar* machos adultos, pesando entre 190 e 230 g, com 60 dias de idade. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria e alojados separadamente em gaiolas de aço inoxidável, mantidos em condição padrão em um ambiente com temperatura controlada ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e com um ciclo de 12 horas claro/escuro. As dietas, tanto sólida quanto hídrica, foram fornecidas *ad libitum*. Antes do início dos experimentos, os animais passaram por um período de adaptação de 7 a 14 dias no ambiente do biotério. Para a execução do trabalho todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Santa Maria (número do protocolo: 4250170317), em projeto coordenado pelo Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler e conforme orientações do grupo de pesquisa do Laboratório Enzitox, do Departamento de Bioquímica da UFSM.

Baço, cérebro, coração, fígado, pâncreas, pulmão, rim, fezes, pelos e sangue foram coletados para decomposição e posterior determinação dos contaminantes inorgânicos, aqueles contidos nos CNTs, por ICP-OES e por ICP-MS. Além disso, a análise qualitativa da distribuição desses metais foi feita no baço, fígado, pulmão e rim. O sangue, coletado por punção cardíaca, também foi coletado para a análise bioquímica.

## 3.3 ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL EM RATOS

### 3.3.1 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi feito de acordo com a norma OECD 425,



(OECD, 2008) o qual consiste na administração por vial oral (gavagem), utilizando sonda orofágica, de dosagens com concentrações crescentes do material em estudo (nesse caso, CNT), nos animais. Para este teste foram utilizadas 5 ratas fêmeas *Wistar* (aproximadamente 220 g cada), sendo que 1 rata foi utilizada para o controle, ou seja, recebeu somente água purificada, sem a presença de CNT; as demais ratas pertenceram ao grupo de dose letal. Neste caso, cada uma das quatro ratas foi tratada com a dose de 5 mg kg<sup>-1</sup> corpóreo, 50 mg kg<sup>-1</sup>, 300 mg kg<sup>-1</sup> e 2000 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. As doses (5 a 2000 mg kg<sup>-1</sup> corpóreo de CNT, aproximadamente 4,5 mL de suspensão) foram preparadas em água purificada e sonicadas durante 5 min em, banho de ultrassom. A administração foi feita por um período de 24 h entre as dosagens a fim de verificar a mortalidade ou não dos animais após a administração dos CNTs.

Após a administração, os animais foram observados durante 15 dias, sendo monitorado o aparecimento de possíveis sintomas associados à intoxicação, como tremores, convulsões, diarreia ou salivação. Na ausência de mortalidade e de sinais de intoxicação, os animais foram pesados e submetidos à eutanásia para estudos necroscópicos. O baço, o coração e o fígado foram coletados para estudos histológicos.

### 3.3.2 Toxicidade crônica

Neste estudo, foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos, os quais foram distribuídos aleatoriamente (n=10) em quatro grupos: *i*) grupo 1, controle; *ii*) grupo 2, administração de 1 mg kg<sup>-1</sup> de CNT; *iii*) grupo 3, administração de 10 mg kg<sup>-1</sup> de CNT e *iv*) grupo 4, administração de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT.

Os animais receberam os CNTs por gavagem, na dose de 1, 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de corpóreo, uma vez por dia, durante 31 dias, 5 dias por semana. No grupo controle, os animais receberam veículo (água purificada), em dose única. Todas as doses foram administradas diariamente entre as 14 e 15 horas, em volume igual a 1,0 mL kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo.

Após o tratamento, os animais foram pesados e em seguida anestesiados com halotano (1-bromo-1-cloro-2,2,2-trifluoroetano) para a eutanásia. No momento da eutanásia, o baço, o cérebro, o coração, o fígado, o pâncreas, o pulmão, o rim, as fezes e os pelos foram coletados, pesados, transferidos para frascos de

polipropileno e armazenados sob refrigeração a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sangue, coletado por punção cardíaca, foi utilizado para a análise bioquímica e para o procedimento de decomposição, sendo que a alíquota destinada para decomposição foi acondicionada em tubos Eppendorf e mantida sob refrigeração. Os tecidos e pelos dos animais foram seccionados e homogeneizados, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, antes do procedimento de decomposição.

### 3.3.3 Outras avaliações bioquímicas

O sangue, coletado através da punção cardíaca, foi transferido para tubos sem anticoagulante e, em seguida, centrifugado a  $2500\text{ g}$  por  $15\text{ min}$ . Logo após, o soro foi separado e congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise. As análises realizadas incluíram creatinina, uréia, gama glutamil transpeptidase, transaminase oxalacética e transaminase pirúvica.

## 3.4 REAGENTES E AMOSTRAS

Em todos os experimentos, a água utilizada passou por um processo de destilação, seguida de deionização e posterior purificação em uma coluna de troca iônica, empregando um sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Milli-Q<sup>®</sup> Ultrapure Water Purification Systems, Gradient System, Millipore, EUA, [www.millipore.com](http://www.millipore.com)), com resistividade final de  $18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}$ . Ácido nítrico concentrado P.A (65%,  $1,4\text{ kg L}^{-1}$ ,  $14,4\text{ mol L}^{-1}$ , Merck, Alemanha, [www.merck.de](http://www.merck.de)) foi utilizado para a decomposição por via úmida, o qual foi previamente bidestilado abaixo de seu ponto de ebulição, em destilador de quartzo (modelo duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália, [www.milestonesci.com](http://www.milestonesci.com)). Uma solução de peróxido de hidrogênio P.A (30%,  $1,14\text{ kg L}^{-1}$ , Merck, Alemanha, [www.merck.de](http://www.merck.de)) também foi utilizada para a decomposição por via úmida. Ao longo do texto, esta solução e o ácido nítrico  $14,4\text{ mol L}^{-1}$  serão denominados simplesmente como  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$  concentrado, respectivamente.

Para a determinação elementar as soluções de calibração foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque multielementar (SPC33MS, PlasmaCAL ICP-AES & ICP-MS Standard, SCP Science, Canadá, [www.scpscience.com](http://www.scpscience.com)), na concentração de  $10\text{ mg L}^{-1}$ , em  $\text{HNO}_3$  5% (v/v), na faixa de  $2,5$  a  $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  e de  $0,01$

a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , para as determinações por ICP-OES e por ICP-MS, respectivamente. Para a determinação do carbono nas soluções dos digeridos, ácido cítrico P.A (Sigma-Aldrich, EUA, [www.sigmaaldrich.com.br](http://www.sigmaaldrich.com.br)) foi utilizado para a preparação das soluções de calibração, diluídas em água. Ainda, foi feita a adição de ítrio (Assurance, Spex CertiPrep<sup>®</sup>,  $1001,5 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{HNO}_3$   $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ , EUA, [www.spexcsp.com](http://www.spexcsp.com)) como padrão interno ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) nas soluções de calibração e amostras. Para a determinação da acidez residual nos digeridos finais, a titulação em meio aquoso foi feita utilizando uma solução de KOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), a qual foi preparada através da dissolução do reagente (Merck) em água e foi submetida a padronização com biftalato de potássio (Merck).

A avaliação da influência da massa de tecido animal decomposta, foi feita utilizando amostras de fígado bovino e frango, adquiridas no comércio local, as quais foram usadas como modelo, simulando a matriz dos tecidos. A exatidão do método de digestão das amostras de fígado bovino e frango e a influência da massa a ser decomposta, foram feitas utilizando uma amostra de referência de fígado bovino produzida no próprio laboratório.

Uma amostra de CNT de parede múltipla funcionalizada com grupos hidroxilas (MWCNT-OH), recebida como doação, foi utilizada neste trabalho. Esta possui como características: 95% de pureza, partículas com 50 - 80 nm de diâmetro externo e 10 - 20  $\mu\text{m}$  de comprimento. Para simplificação, o MWCNT-OH será denominado CNT ao longo do texto. A ração para roedores (Puro Lab 22PB, [www.purotrato.com.br/produtos/Puro-Lab-22PB](http://www.purotrato.com.br/produtos/Puro-Lab-22PB)) utilizada na dieta sólida dos ratos foi adquirida no comércio local.

### 3.5 PROCEDIMENTOS

#### 3.5.1 Descontaminação de vidrarias e materiais

Todas as vidrarias e materiais comuns de laboratório utilizados neste trabalho foram lavados e descontaminados por imersão em  $\text{HNO}_3$  10% (v/v) por, pelo menos, 24 horas e enxaguados com água antes do uso.

Os frascos de vidro utilizados na digestão ácida por aquecimento convencional foram descontaminados através da adição de 6 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e aquecimento em bloco de aquecimento por 1 h a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , enquanto

que os frascos de quartzo utilizados para a MAWD-PDC, foram descontaminados com 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e aquecimento em forno micro-ondas por 25 min, a 250 °C, com pressurização a 30 bar.

### **3.5.2 Avaliação histológica**

Para avaliação histológica, os órgãos dos ratos eutanasiados (baço, coração, fígado e rim) foram coletados e acondicionados em uma solução tampão de formaldeído (10% v/v) durante 24 h. Após a desidratação dos órgãos, foi adicionada parafina e, em seguida, o material foi seccionado em fatias de 6 micrômetros de espessura utilizando um micrótomo manual. Esse procedimento foi feito no Laboratório de Patologia e Biologia Oral da UFSM pela sua equipe de colaboradores.

### **3.5.3 Determinação elementar em tecidos, fluidos e pelos de ratos tratados com CNTs após decomposição por via úmida**

#### *3.5.3.1 Digestão ácida por aquecimento convencional empregando bloco digestor*

A viabilidade da digestão ácida das amostras dos ratos e CNTs por aquecimento convencional em sistema aberto como estratégia de preparo de amostra, foi primeiramente avaliada, empregando um bloco digestor. Foram utilizados 4 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% como solução digestora. Foi feita a decomposição de 500 mg em replicata única (n=1) e em triplicatas (de, aproximadamente, 167 mg cada) para frango e fígado bovino. A exatidão do método de digestão das amostras de fígado bovino e frango e a influência da massa a ser decomposta, foram avaliadas utilizando a amostra de referência de fígado bovino produzida no próprio laboratório.

Para avaliar a decomposição dos CNTs, foram utilizadas massas correspondentes àquelas administradas nos animais, sendo de, aproximadamente, 8 mg, 19 mg e 38 mg, para as doses de 1 mg kg<sup>-1</sup>, 10 mg kg<sup>-1</sup> e 100 mg kg<sup>-1</sup> de massa corpórea, respectivamente. A avaliação da exatidão foi feita pela comparação dos resultados obtidos empregando a digestão ácida por aquecimento convencional com aqueles obtidos pela digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em

câmara única de reação (MAWD-SRC).

O programa de aquecimento utilizado foi de 120 °C por 5 horas e, ao final, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno (50 mL) e avolumados com água a 20 mL. A determinação dos elementos investigados nos digeridos finais foi feita por ICP-OES e por ICP-MS.

### 3.5.3.2 *Digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC)*

O procedimento de decomposição dos CNTs, dos tecidos, fluidos e pelos dos ratos por MAWD-PDC foi desenvolvido a partir das condições experimentais otimizadas por Krzyzaniak *et al.* (KRZYZANIAK *et al.*, 2019). Para este procedimento, 250 mg de amostra foram transferidos para o interior do frasco de decomposição e foram adicionados 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os frascos foram fechados, alocados no rotor e este foi inserido em um compartimento apropriado na cavidade do forno de micro-ondas. A câmara reacional de PTFE foi previamente preenchida com 120 mL de água e 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. Após, o rotor foi inserido na cavidade do forno e o sistema foi fechado. Em seguida, o sistema foi pressurizado com 40 bar de argônio e foi aplicado o programa de irradiação mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Programa de irradiação utilizado para a decomposição de CNTs, tecidos, fluidos e pelos de ratos por MAWD-PDC.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)
<i>i</i>	10	180
<i>ii</i>	15	180
<i>iii</i>	5	270
<i>iv</i>	35	270

Após o término do programa de irradiação, o resfriamento foi feito por circulação de um líquido refrigerante (etilenoglicol). A temperatura mínima de despressurização, bem como a taxa de despressurização, foram de 50 °C e 2 bar min<sup>-1</sup>, respectivamente. Ao final, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno (50 mL) e avolumados com água a 20 mL.

Cabe destacar que este método utilizado foi originalmente desenvolvido por

Krzyzaniak *et al.*, para a decomposição de CNTs em um sistema similar, nas mesmas condições operacionais de temperatura e pressão em câmara pressurizada de outro fabricante (UltraWAVE®, Single Reaction Chamber, Milestone). Dessa forma, tendo em vista a decomposição dos tecidos, fluidos e pelos dos animais possivelmente contendo CNT e levando em consideração a baixa disponibilidade de massa de alguns órgãos, como, por exemplo, o baço, o pulmão e o rim, foi feita uma avaliação da influência da massa a ser decomposta.

Assim sendo, foram utilizadas amostras de fígado bovino e frango, adquiridas em comércio local. Dessa forma, foi feita a decomposição de 500 mg em replicata única (n=1) e em triplicatas, de aproximadamente 167 mg cada. O programa de irradiação utilizado foi o descrito na Tabela 5 e a solução de decomposição foi 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A fim de verificar a exatidão do método de decomposição para digestão dos tecidos animais e a influência da massa a ser decomposta, foi utilizado um material de referência de fígado bovino produzido no próprio laboratório, enquanto que a avaliação da exatidão do método para digestão dos CNTs, foi feita comparando-se os resultados obtidos pela MAWD-PDC com aqueles obtidos por MAWD-SRC. A determinação dos contaminantes inorgânicos nos digeridos finais foi feita por ICP-OES e por ICP-MS.

#### **3.5.4 Determinação de carbono e acidez residual nos digeridos**

A determinação do teor de carbono nas soluções após digestão foi feita por ICP-OES. As soluções de referência foram preparadas a partir da dissolução do ácido cítrico em água. Como padrão interno, ítrio foi adicionado às amostras e padrões, a uma concentração final igual a 1 mg L<sup>-1</sup>. Antes das determinações, uma alíquota da amostra contendo o padrão interno foi purgada com argônio por 2 min para a remoção do CO<sub>2</sub> dissolvido na solução.

A determinação de acidez residual nos digeridos obtidos após a decomposição foi feita por titulação potenciométrica em meio aquoso. Para isto, uma solução de KOH previamente padronizada foi utilizada como titulante e um volume de 25 a 100 µL de amostra foi adicionado em um frasco de vidro contendo 20 mL de água. Após a homogeneização por agitação magnética, a titulação foi iniciada e o ponto de equivalência foi determinado automaticamente.

### 3.5.5 Obtenção de bioimagens por LA-ICP-MS

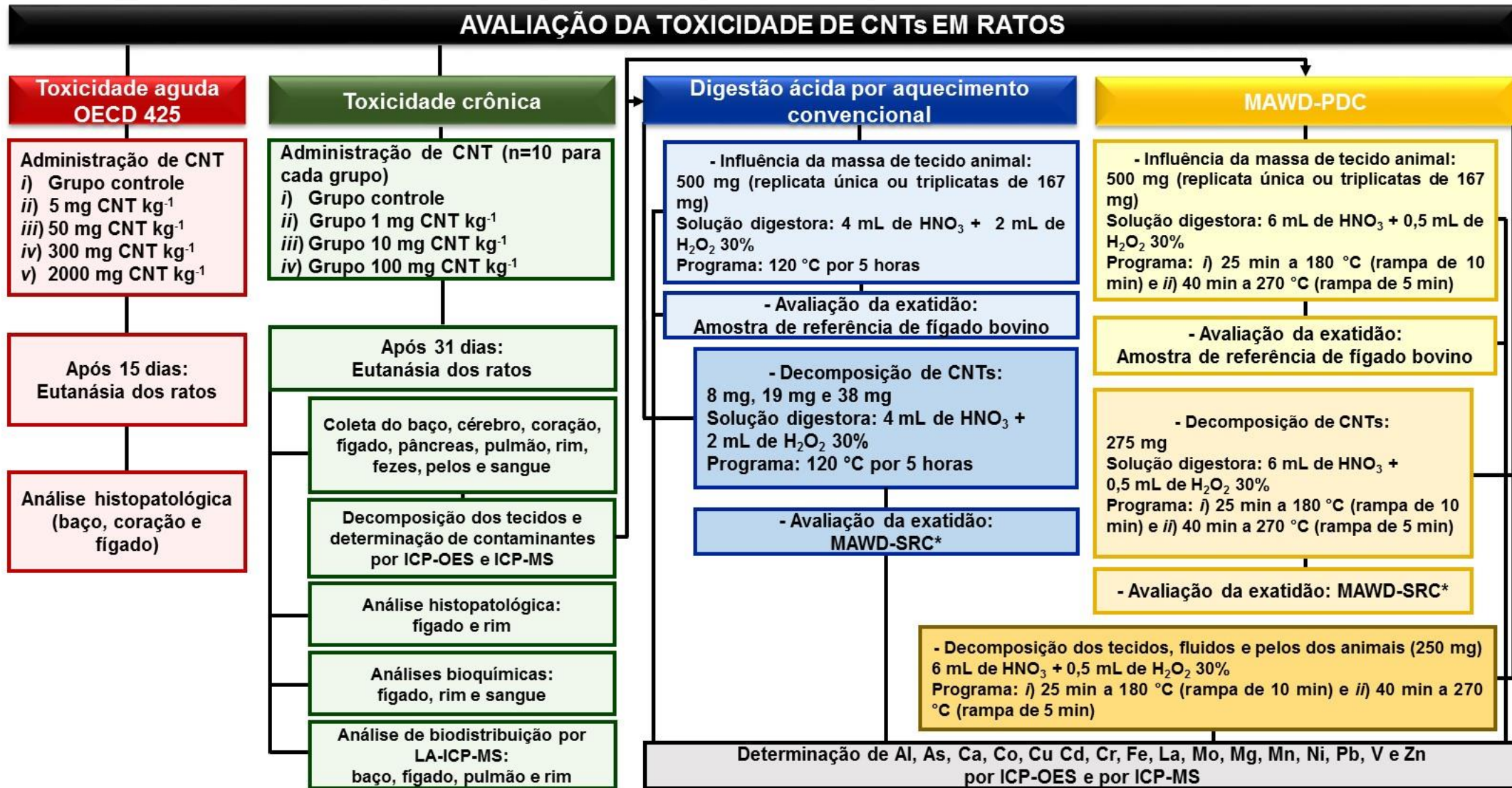
A análise de biodistribuição por LA-ICP-MS foi feita no baço, fígado, pulmão e rim. É importante destacar que a coleta dos órgãos acima citados foi feita para três ratos (n=3) de cada grupo. Dessa forma, os tecidos passaram por um processo de desidratação em uma solução tampão de formaldeído a 10% (v/v). Após este processo, foi adicionada parafina para seccionar os tecidos em fatias de 30 micrômetros de espessura, utilizando um micrótomo manual. Em seguida, estas foram fixadas em lâminas de vidro e armazenadas em um recipiente fechado sob temperatura ambiente, para posterior análise.

As condições operacionais utilizadas para a obtenção das bioimagens por LA-ICP-MS estão descritas na Tabela 4. Para obtenção das imagens, múltiplas linhas foram ablatadas, sendo que o número de linhas variou para cada tecido, mas sempre com espaçamento de 10  $\mu\text{m}$  entre cada linha e diâmetro de feixe do laser de 100  $\mu\text{m}$ . Foi utilizado  $^{13}\text{C}$  para a normalização do sinal analítico e o processamento dos dados para obtenção das bioimagens foi feito empregando o programa RStudio.

## 3.6 RESUMO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

O fluxograma da Figura 3 resume os parâmetros avaliados e descritos nesta seção, os quais serão discutidos no Capítulo 4 – *Resultados e Discussão*.

Figura 3 - Fluxograma representativo dos procedimentos e parâmetros avaliados.

\* método utilizado como referência (KRZYZANIAK *et al.*, 2019).



#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

*Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para contribuir com a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dos CNTs em tecidos, fluidos e pelos de ratos. Para um melhor entendimento das avaliações feitas, os resultados serão apresentados como: (i) estudo de toxicidade oral aguda; (ii) estudo de toxicidade crônica; (iii) avaliação do método de MAWD-PDC para decomposição de tecidos biológicos com CNTs e (iv) análise de biodistribuição dos elementos por LA-ICP-MS. Para complementar o estudo, foram feitas análises bioquímicas, cujos resultados são apresentados no Apêndice.*

#### 4.1 APRESENTAÇÃO E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Como a proposta do trabalho exigia a obtenção dos tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs, inicialmente, foi necessária a submissão de uma proposta ao Comitê de Ética Animal da UFSM. Este aprovou a execução dos procedimentos com os animais (número do protocolo: 4250170317). A proposta foi coordenada pelo Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler e seguiu as orientações do grupo de pesquisa do laboratório Enzitox do Departamento de Bioquímica da UFSM. Primeiramente, foi sugerido o teste de toxicidade oral aguda, uma vez que há poucos trabalhos publicados envolvendo estudos de toxicidade oral aguda em ratos tratados com CNTs. Ainda, este se fez necessário, tendo em vista as diferenças nas características dos CNTs e, conseqüentemente, as respostas contraditórias dos seus possíveis efeitos tóxicos, necessitando assim, mensurar a toxicidade do CNT utilizado neste estudo.

Destaca-se também, conforme demonstra a Tabela 1, que apenas um estudo investigou o efeito de CNT funcionalizado com  $-OH$  (CNT-OH), como o deste estudo. No trabalho de Fraczek *et al.*, foi estudada a biocompatibilidade de SWCNTs funcionalizados com grupos  $-OH$  e  $-COOH$  e MWCNTs puros, via incisão na pele e no musculo esquelético de ratos. Com o uso do SWCNT foi observada a formação de agregados menores, quando comparados com aqueles resultantes da administração de MWCNT, sendo estes facilmente dispersos e eliminados do local. Segundo os autores, isso foi uma provável consequência do processo de funcionalização (FRACZEK *et al.*, 2008). No entanto, ressalta-se que os efeitos oriundos da administração dos CNTs foi verificado apenas com a análise histológica da região do tecido, carecendo, assim, de outros ensaios complementares.

Após o estudo de toxicidade oral aguda e análise histológica, a proposta foi novamente ressubmetida para avaliação e definição das doses a serem utilizadas no estudo de toxicidade crônica.

##### 4.1.1 Estudo de toxicidade oral aguda

O estudo da dose letal é de suma importância em investigações sobre bioacumulação, uma vez que é necessário o conhecimento da dose máxima que

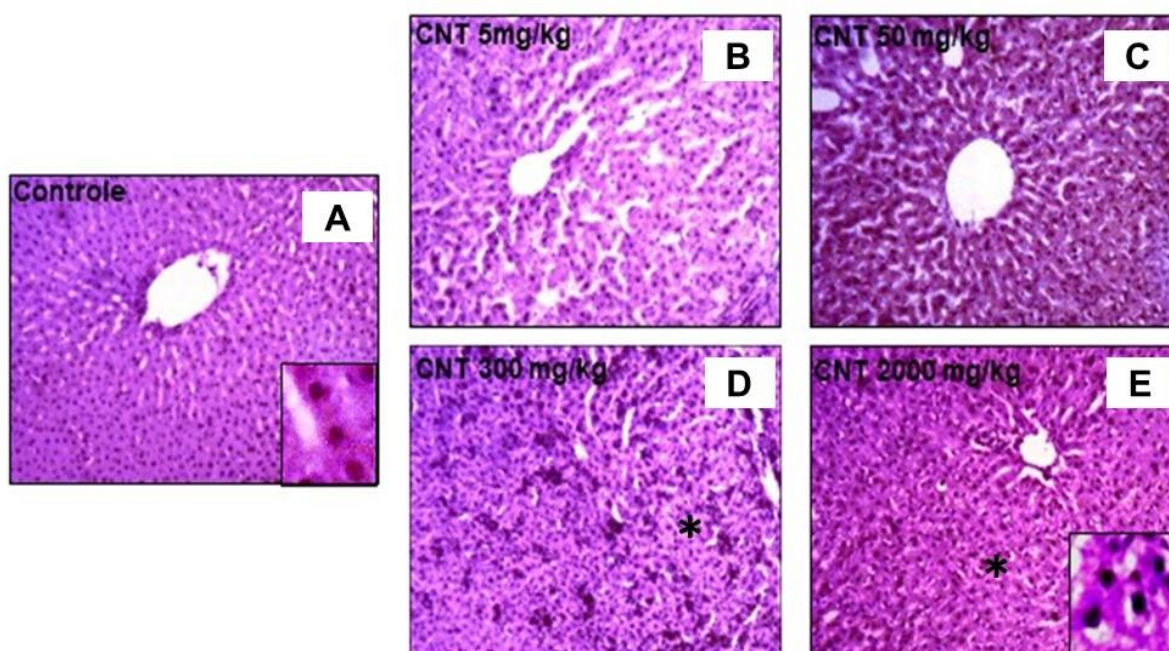
pode ser administrada, sem que ocorra a morte do animal.

Após a administração da dose máxima de  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  por peso corpóreo, os animais foram monitorados durante 15 dias e não foram observadas alterações comportamentais, sintomas de intoxicação ou mortalidade. Dessa forma, os animais foram pesados e em seguida sofreram eutanásia. O baço, o fígado e o coração foram coletados e acondicionados em uma solução de formaldeído tamponada, para posterior análise histológica. Foi feita a comparação entre a massa corpórea dos animais antes e após o tratamento e não foi observada influência na massa corpórea, quando administradas diferentes dosagens de CNTs.

#### 4.1.1.1 Análise histopatológica em estudo de toxicidade aguda

A análise histológica foi feita no fígado, no baço e no coração, 15 dias após a exposição dos ratos à dose aguda de CNT. A Figura 4, mostra a imagem obtida na análise histológica do fígado.

Figura 4 - Imagens microscópicas da análise histológica do fígado de ratas submetidas ao estudo de toxicidade aguda. (A) Grupo controle, (B) CNT  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , (C) CNT  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , (D) CNT  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  e (E) CNT  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$ . (H&E 10X – Detalhes 40X).



De acordo com a Figura 4, é possível admitir que o fígado do rato controle e do rato submetido à administração de 5 mg kg<sup>-1</sup> de CNT apresentaram histologia semelhante. No entanto, no caso do fígado dos animais expostos às doses de 300 mg kg<sup>-1</sup> e 2000 mg kg<sup>-1</sup> de CNT, pode ser observada a degeneração hidrópica do órgão, caracterizada pela presença de hepatócitos amplos, com um citoplasma claro, caracterizado pela presença de pequenos vacúolos pálidos e um núcleo normal em posição central, marcado na figura com asterisco (\*). As análises histológicas do baço e do coração apresentaram histologia normal para todas as doses administradas.

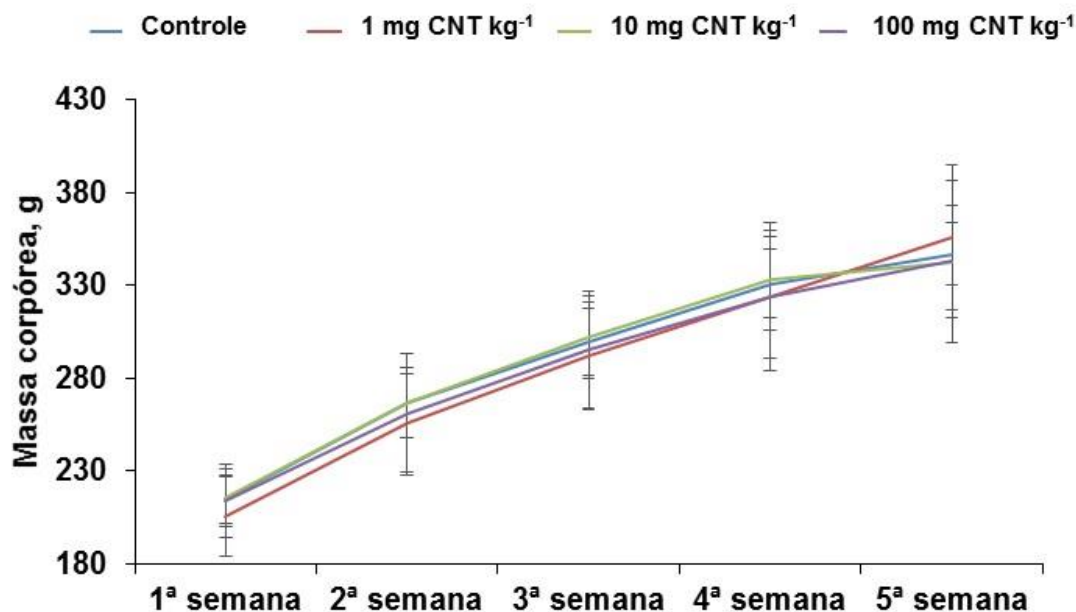
Considerando as lesões hepáticas observadas no fígado dos animais tratados com 300 mg kg<sup>-1</sup> e 2000 mg kg<sup>-1</sup> de CNT e, visando o bem estar e a segurança dos animais, optou-se por continuar os estudos de toxicidade com dose repetida, administrando doses inferiores a 300 mg kg<sup>-1</sup> de CNT. No entanto, cabe mencionar que, com base nos resultados obtidos nas análises de intoxicação oral aguda e histológica, é possível inferir que a DL50 estimada para administração oral de CNTs em ratos é superior a 2000 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo.

#### **4.1.2 Estudo de toxicidade crônica**

O estudo de toxicidade crônica com dose repetida durante 31 dias foi realizado com o intuito de avaliar em qual órgão ocorre o acúmulo dos contaminantes inorgânicos contidos nos CNTs, bem como verificar possíveis alterações na concentração destes ou outros elementos nos órgãos estudados.

Para este estudo, foram administrados 300 µL de suspensão com 1, 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT disperso. Os animais do grupo controle foram tratados com 300 µL de água purificada, administrada da mesma forma que os CNTs nos animais dos grupos de tratamento, a fim de que todos fossem submetidos ao mesmo nível de estresse. No período do tratamento, os animais permaneceram sob observação diária e foram pesados semanalmente. Não foram observadas alterações físicas, como perda de pelo, secreção nas mucosas ou perda de peso. A variação da massa corpórea ao longo de cada semana de tratamento pode ser visualizada na Figura 5.

Figura 5 - Variação da massa corpórea dos ratos tratados com diferentes quantidades de CNT e do grupo controle por um período de 5 semanas (n=10).



Conforme pode ser observado na Figura 5, todos os animais tiveram um aumento de massa corporal no final do tratamento, o que é considerado natural tendo em vista que ratos de 60 a 120 dias estão no período jovem-adulto, ainda em fase de crescimento (OECD, 2008). Dessa forma, não foi observada diferença estatística significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ) no ganho de massa corpórea entre os grupos incluindo o grupo controle. No 32º dia, os animais foram pesados e submetidos à eutanásia. Em seguida, os órgãos foram coletados e armazenados para a sequência do estudo.

## 4.2 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM TECIDOS, FLUIDOS E PELOS DE RATOS TRATADOS COM CNTS

### 4.2.1 Avaliação do método de digestão ácida por aquecimento convencional em sistema aberto empregando bloco digestor

#### 4.2.1.1 Influência da massa de amostra utilizada para decomposição

Após a obtenção dos tecidos, fluidos e pelos dos animais, inicialmente, foi necessário avaliar a viabilidade da digestão ácida por aquecimento convencional em sistema aberto, empregando bloco digestor. Além de este ser o método de preparo de amostra mais difundido entre os laboratórios para decomposição de tecidos biológicos, seu uso é adequado em situações como a deste trabalho, por dois motivos principais: (i) o número de amostras a ser digerida é geralmente elevado (no presente trabalho eram 280 amostras) então é necessário que o método de preparo de amostra possibilite elevada frequência de decomposição e (ii) a pequena quantidade de amostra disponível é, em geral, pequena (10 a 500 mg), o que exige que a quantidade de reagentes seja também pequena (de  $\mu\text{L}$  a poucos mL) para evitar diluição. No que tange à quantidade de reagentes, sistemas de decomposição instrumentais, como os com aquecimento com micro-ondas, são comumente inviáveis já que costumam exigir volumes de líquido mínimos da ordem de 5 a 10 mL e não possibilitam frequências de decomposição tão elevadas quanto aquelas obtidas com uso de blocos digestores. O bloco digestor utilizado nesse trabalho dispõe de 42 posições enquanto que o forno de micro-ondas possibilita, no máximo, 18 frascos. Dessa forma, foi feita a avaliação da influência da massa a ser decomposta e, para isso, foram utilizadas amostras de fígado bovino e frango, adquiridas em comércio local, já que não era possível consumir as amostras do estudo nesta etapa do trabalho.

A massa de amostra escolhida para esta avaliação foi selecionada levando-se em consideração a massa média mínima (aproximadamente 500 mg) de tecido animal, como o baço, o pulmão e o rim, obtida após a eutanásia, apesar de essa ser menor para outros órgãos, fluidos ou pelos dos ratos. Assim, para o procedimento de digestão ácida por via úmida em sistema aberto, foi feita a decomposição de 500 mg em replicata única ( $n=1$ ) e da mesma massa total, dividida em triplicata ( $n=3$ , com aproximadamente 167 mg cada) para fígado bovino e frango. Este procedimento foi feito com o intuito de avaliar a necessidade de decompor a massa total de alguns órgãos, estratégia comumente utilizada para estudos desta natureza, ou, de sua divisão em massas menores, para trabalhar com replicatas, avaliando o efeito disso sobre a exatidão e precisão dos resultados, considerando o sistema aberto utilizado. Além disso, devido à pequena quantidade de amostra de tecidos e dos fluidos dos animais disponível, houve preocupação em não utilizar de uma vez só toda a quantidade de amostra disponível para a digestão, uma vez que, se porventura,

fosse necessário repetir o procedimento, haveria quantidade suficiente para tal.

A exatidão do método de digestão e a influência da massa a ser decomposta, foram avaliadas utilizando uma amostra de referência de fígado bovino, produzida no próprio laboratório, juntamente com amostras de fígado e frango (similar a um estudo de recuperação de spike). Destaca-se que esta amostra de referência foi utilizada, tendo em vista a indisponibilidade de material de referência certificado de matriz similar aos tecidos dos animais utilizados no presente estudo. Os resultados para as amostras de fígado bovino e frango puras ou enriquecidas com a amostra de referência (AR) estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados obtidos por ICP-OES<sup>a</sup> e por ICP-MS<sup>b</sup> para contaminantes inorgânicos em fígado bovino e frango após digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor (valores em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão).

Analitos	Fígado bovino				Frango			
	500 mg (n=1)	Recuperação (%) para fígado + AR <sup>c</sup>	167 mg (n=3)	Recuperação (%) para fígado + AR <sup>d</sup>	500 mg (n=1)	Recuperação (%) para frango + AR <sup>c</sup>	167 mg (n=3)	Recuperação (%) para frango + AR <sup>d</sup>
Al <sup>a</sup>	< 4,78	-	< 15	-	< 4,78	-	< 15	-
As <sup>b</sup>	< 0,008	-	< 0,024	-	0,022	-	0,023 $\pm$ 0,005	-
Ca <sup>a</sup>	42,8	110	< 93	99	40,9	115	< 93	97
Cd <sup>b</sup>	0,077	115	0,075 $\pm$ 0,006	120	< 0,002	114	< 0,007	123
Co <sup>b</sup>	0,082	115	0,083 $\pm$ 0,005	120	< 0,005	118	< 0,015	129
Cr <sup>b</sup>	< 0,585	-	< 1,83	-	< 0,585	-	< 1,83	-
Cu <sup>b</sup>	43,9	100	44,3 $\pm$ 3,5	102	0,195	109	< 0,250	107
Fe <sup>a</sup>	76,1	105	73,4 $\pm$ 7,1	103	3,60	105	3,54 $\pm$ 0,40	106
La <sup>b</sup>	< 0,003	-	< 0,008	-	< 0,003	-	< 0,008	-
Mg <sup>a</sup>	205	115	210 $\pm$ 13	112	350	119	366 $\pm$ 32	113
Mn <sup>b</sup>	3,80	114	3,55 $\pm$ 0,40	114	0,145	101	< 0,160	99
Mo <sup>b</sup>	0,380	-	0,342 $\pm$ 0,040	-	< 0,035	-	< 0,109	-
Ni <sup>b</sup>	< 0,189	-	< 0,591	-	< 0,189	-	< 0,591	-
Pb <sup>b</sup>	< 0,014	-	< 0,044	-	< 0,014	-	< 0,044	-
V <sup>b</sup>	< 0,017	-	< 0,052	-	< 0,017	-	< 0,052	-
Zn <sup>a</sup>	29,5	-	28,7 $\pm$ 3,1	-	5,18	-	4,99 $\pm$ 0,44	-
C (mg L <sup>-1</sup> )	754	2268	231 $\pm$ 9	1089 $\pm$ 162	669	2502	341 $\pm$ 5	1065 $\pm$ 119

AR: amostra de referência, contendo 133  $\pm$  3  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ca; 0,140  $\pm$  0,003  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd; 0,359  $\pm$  0,025  $\mu\text{g g}^{-1}$  Co; 220  $\pm$  2  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu; 202  $\pm$  2  $\mu\text{g g}^{-1}$  Fe; 503  $\pm$  2  $\mu\text{g g}^{-1}$  Mg; 7,17  $\pm$  0,06  $\mu\text{g g}^{-1}$  Mn. <sup>c</sup> 500 mg de fígado bovino/frango e 500 mg de AR (n=1); <sup>d</sup> 167 mg de fígado bovino/frango e 200 mg de AR (n=3). Condições experimentais: digestão empregando bloco digestor, 4 mL de HNO<sub>3</sub> 14,4 mol L<sup>-1</sup> + 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%; Programa utilizado: 120 °C por 5 horas.



Como mostrado na Tabela 6, na digestão de aproximadamente 500 mg (n=1) de fígado bovino os resultados obtidos para Co, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn e Zn foram concordantes com aqueles obtidos na digestão da mesma massa de amostra, mas dividida em triplicata, 167 mg (n=3). Para Ca só foi possível a quantificação empregando 500 mg de fígado bovino no procedimento de digestão. Para Al, As, Cr, La, Ni, Pb e V, as concentrações dos mesmos ficaram abaixo do limite de quantificação (do inglês, *Limit of Quantification*, LOQ) para ambas as massas avaliadas.

Em relação aos resultados obtidos com o frango, para 500 mg (n=1), foi possível observar que houve concordância para As, Fe, Mg e Zn, quando comparado com os obtidos com triplicatas de 167 mg cada. Ainda, observou-se que, a quantificação de Ca, Cu e Mn só foi possível quando 500 mg de amostra foram utilizados, enquanto que para os demais elementos, independente da massa, os resultados ficaram abaixo do LOQ. Na avaliação da exatidão do método para ambas as massas (replicata única de 500 mg e triplicatas de 167 mg) de amostra, foram obtidas recuperações quantitativas para Ca, Co, Cu, Cd, Fe, Mg e Mn. A avaliação da eficiência de decomposição foi feita com base no teor de carbono em solução, sendo obtidos valores da ordem de 350 a 750 mg L<sup>-1</sup> na digestão de 167 mg (n=3) e 500 mg (n=1), para fígado bovino e/ou frango, respectivamente. Esse resultado indica que o carbono presente nos digeridos não devem resultar em problemas na determinação dos analitos por ICP-OES ou ICP-MS (BIZZI *et al.*, 2014).

Dessa forma, foi possível concluir que a digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor é adequada para a decomposição de tecidos animais, como fígado bovino e frango, e posterior determinação dos analitos por ICP-OES e ICP-MS. No que diz respeito à massa de amostra, foi possível observar que houve concordância nos resultados obtidos empregando replicata única de 500 mg com aqueles obtidos com triplicatas de 167 mg cada. Assim, pode-se inferir que é possível utilizar massas menores que 500 mg mantendo a representatividade dos resultados com a digestão em replicata única (n=1), porém, é possível que alguns analitos resultem em valores abaixo do LOQ.

#### 4.2.1.2 Avaliação da eficiência de decomposição de CNTs

Após a verificação da adequabilidade do método da digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor para decomposição dos tecidos dos animais, foi verificada a viabilidade deste método para decomposição dos CNTs. Este procedimento foi feito com o objetivo de verificar se a digestão seria eficiente também para a decomposição dos CNTs, caso ocorresse, o acúmulo de CNT em algum tecido, fluido ou pelos dos animais e, conseqüentemente, os analitos ali contidos seriam adequadamente quantificados. Isso se faz necessário pois é sabido que há dificuldade para decomposição de CNTs, mesmo para pequenas massas de amostra e sob condições drásticas. Para isso, foram utilizadas massas correspondentes àquelas administradas nos animais, considerando 380 g como massa média de peso corporal dos ratos na 5ª semana. Assim, as massa foram de, aproximadamente, 8 mg, 19 mg e 38 mg de CNT, para as doses de 1 mg kg<sup>-1</sup>, 10 mg kg<sup>-1</sup> e 100 mg kg<sup>-1</sup> de massa corpórea, respectivamente. A avaliação da exatidão foi feita pela comparação dos resultados obtidos empregando a digestão ácida por aquecimento convencional com aqueles obtidos pelo método de referência (MAWD-SRC) (KRZYZANIAK *et al.*, 2019).

Os digeridos obtidos, independente da massa utilizada, visualmente, apresentaram resíduos remanescentes de CNT em solução. Destaca-se que, neste caso, a eficiência de decomposição foi mensurada pela presença de resíduos remanescente de CNT, apenas pelo aspecto visual dos digeridos, sendo esta a mesma estratégia utilizada em estudos prévios (KRZYZANIAK, 2016; KRZYZANIAK *et al.*, 2019). Nos trabalhos desenvolvidos previamente, foi demonstrada a dificuldade em mensurar a eficiência de decomposição de CNTs em três estratégias investigadas: *i*) através da determinação do carbono em solução, parâmetro comumente utilizado para avaliação da eficiência de decomposição de matrizes orgânicas; *ii*) baseando-se na diferença de massa de CNT inicialmente utilizada para a decomposição, com relação a massa de CNT remanescente nos digeridos finais e, ainda, *iii*) determinando a massa de resíduo remanescente nos digeridos por filtração a vácuo. Os autores atribuíram a ineficiência da determinação do carbono em solução, provavelmente, por não terem sido formados intermediários de degradação solúveis, enquanto que nas demais estratégias foram obtidos resultados imprecisos (KRZYZANIAK, 2016; KRZYZANIAK *et al.*, 2019).

Cabe destacar que, para a determinação dos analitos por ICP-OES e ICP-MS, os digeridos foram previamente filtrados, utilizando uma membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . Os resultados obtidos para as três massas de CNT avaliadas e os valores de referência estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados obtidos por ICP-OES<sup>a</sup> e por ICP-MS<sup>b</sup> para contaminantes inorgânicos em CNT (valores em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=3, média  $\pm$  desvio padrão).

Analitos	Massa de CNT <sup>c</sup>			Referência <sup>d</sup>
	8 mg	19 mg	38 mg	
Al <sup>a</sup>	< 710	< 300	< 150	84,4 $\pm$ 5,3
As <sup>b</sup>	< 0,405	< 0,170	0,146 $\pm$ 0,015	0,265 $\pm$ 0,020
Ca <sup>a</sup>	< 1660	< 700	< 350	283 $\pm$ 28
Cd <sup>b</sup>	< 0,132	< 0,056	< 0,028	<0,007
Co <sup>a</sup>	12,9 $\pm$ 1,1	12,0 $\pm$ 1,2	10,9 $\pm$ 1,0	22,2 $\pm$ 2,0
Cr <sup>a</sup>	6,40 $\pm$ 0,59	7,52 $\pm$ 0,81	8,16 $\pm$ 0,80	11,8 $\pm$ 1,0
Cu <sup>b</sup>	< 1,89	<0,797	< 398	0,336 $\pm$ 0,030
Fe <sup>a</sup>	< 59	44,7 $\pm$ 16,0	49,5 $\pm$ 5,0	83,3 $\pm$ 8,2
La <sup>a</sup>	14,6 $\pm$ 1,2	16,7 $\pm$ 1,5	12,3 $\pm$ 1,0	21,8 $\pm$ 1,6
Mg <sup>a</sup>	< 183	< 77	47,0 $\pm$ 3,5	45,0 $\pm$ 2,6
Mn <sup>b</sup>	< 2,35	1,12 $\pm$ 0,10	0,928 $\pm$ 0,080	1,90 $\pm$ 0,12
Mo <sup>a</sup>	5,90 $\pm$ 0,40	5,72 $\pm$ 0,50	5,79 $\pm$ 0,49	7,93 $\pm$ 0,51
Ni <sup>a</sup>	7787 $\pm$ 700	7112 $\pm$ 645	6847 $\pm$ 550	21212 $\pm$ 1820
Pb <sup>a</sup>	13,4 $\pm$ 1,0	17,6 $\pm$ 1,5	16,9 $\pm$ 1,2	58,8 $\pm$ 3,0
V <sup>b</sup>	< 0,800	< 0,337	< 0,168	0,098 $\pm$ 0,010
Zn <sup>a</sup>	65,6 $\pm$ 7,0	43,1 $\pm$ 5,1	39,2 $\pm$ 4,2	126 $\pm$ 11

<sup>c</sup> Digestão empregando bloco digestor, 4 mL de HNO<sub>3</sub> 14,4 mol L<sup>-1</sup> + 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%; 120 °C por 5 horas;

<sup>d</sup> Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação: 275 mg, 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado + 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 65 min + 40 min de arrefecimento.

Como mostrado na Tabela 7, foi possível observar que, para todas as massas de CNT avaliadas, os resultados obtidos para todos os analitos, exceto para Mg, para 38 mg de CNT, foram inferiores e apresentaram diferença (ANOVA) quando comparados com os valores de referência. A recuperação não quantitativa dos elementos pode estar associada à maneira com que estes podem estar presentes

no CNT e às condições de decomposição atingidas em sistema aberto, principalmente, a limitação da temperatura. Neste sentido, estudos têm relatado que os contaminantes metálicos podem estar presos à superfície ou quimicamente ligados à estrutura dos CNTs (KRZYZANIAK *et al.*, 2019; MORTARI *et al.*, 2010; PUMERA, 2007). Assim, em não havendo decomposição, a recuperação é incompleta.

Diversos trabalhos publicados também relatam a ineficiência de decomposição de CNTs, mesmo para massas relativamente baixas, como 5 mg (YANG *et al.*, 2010), 20 mg (GE *et al.*, 2008), 30 mg (PATOLE *et al.*, 2016) e 50 mg (MELLO *et al.*, 2011). No trabalho desenvolvido por Yang *et al.*, os autores relataram a ineficiência de decomposição por via úmida, para apenas 5 mg de amostra, com aquecimento por radiação micro-ondas em sistema fechado a 185 °C, por 45 min, com 2 mL de HNO<sub>3</sub> + 4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como solução digestora. Além do método de digestão por via úmida, os autores investigaram o emprego de métodos de extração utilizando 25 mL de água e HNO<sub>3</sub> 1% como solução extratora, por 1 h em banho ultrassom. Os resultados obtidos foram sempre inferiores aqueles obtidos por análise por ativação neutrônica, com aproximadamente 80% de concordância. Ainda, foram obtidos resultados superestimados com o uso da ICP-MS, o que foi atribuído à decomposição ineficiente da amostra e consequente presença de carbono no plasma, levando ao aumento do sinal analítico (YANG *et al.*, 2010).

Ge *et al.* investigaram a decomposição de CNTs em sistemas classificados de baixa e alta pressão. Para isso, 10 a 20 mg de CNTs foram submetidos, inicialmente, a um procedimento de digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor, por 8 h a 120 °C com 4 mL de uma mistura 3:1 HNO<sub>3</sub> concentrado/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No sistema de alta pressão, 10 a 20 mg de CNTs e, aproximadamente, 10 mL de uma mistura 3:1 HNO<sub>3</sub> concentrado/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram submetidos à digestão ácida em sistema fechado com aquecimento por micro-ondas a 180 °C por mais de 12 h. Independente do sistema avaliado, os autores relataram a presença de CNT não decomposto em solução (GE *et al.*, 2008). Adicionalmente, Mello *et al.*, também relataram a ineficiência de decomposição de 50 mg de CNTs submetidos a digestão por via úmida em sistema fechado com radiação micro-ondas, empregando um forno de micro-ondas que opera a pressão e temperatura máxima de 80 bar e 280 °C, respectivamente, por 1 h, com 6 mL de

HNO<sub>3</sub> concentrado como solução digestora (MELLO *et al.*, 2011).

Com base nos trabalhos relatados foi possível observar que as condições experimentais utilizadas pelos autores, exceto aquelas empregadas por Ge *et al.*, que utiliza sistema de baixa pressão, podem ser consideradas mais drásticas que as empregadas no presente trabalho, considerando a decomposição em sistema aberto.

No que diz respeito aos trabalhos relatados, que avaliaram possíveis efeitos tóxicos proveniente das impurezas metálicas dos CNTs em ratos submetidos a tratamentos com este nanomaterial, é importante destacar que a maior parte dos poucos trabalhos relaciona o potencial efeito tóxico das impurezas, apenas inferindo a concentração destas no CNT e não com base em avaliação no órgão dos ratos em estudo. Uma das principais limitações e fonte de erros em avaliações é que os métodos de preparo de amostras empregados para decomposição dos CNTs e posterior determinação dos elementos são considerados inadequados pois não possibilitam a decomposição completa do CNT. Assim, podem levar a resultados incorretos, subestimados, que levam à interpretações equivocadas.

Dessa forma, para assegurar a recuperação quantitativa de todos os analitos, a decomposição completa do CNT é de fundamental importância, o que também contribui para minimizar problemas na etapa de determinação e evitar uma etapa adicional de filtração. Essa decomposição completa do CNT não foi obtida com o uso do bloco digestor, por ser um sistema aberto. Assim, foi possível inferir que o método de digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor, avaliado neste trabalho, foi adequado somente para a decomposição de tecidos animais, mas não se aplicou ao objetivo do estudo que tinha como objetivo a decomposição de tecidos, fluidos e pelos dos animais, contendo CNTs. Por isso, seu uso, apesar de comum em trabalhos deste tipo, não é recomendado nesta situação.

#### **4.2.2 Avaliação da digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC)**

#### **4.2.3 Influência da massa de amostra utilizada na decomposição**

Uma vez demonstrada a inviabilidade do método de digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor, foi feita a avaliação do método de

digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC), para decomposição dos tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs. O procedimento de decomposição por MAWD-PDC foi avaliado a partir das condições experimentais otimizadas em trabalho prévio (KRZYZANIAK *et al.*, 2019). Cabe destacar que o trabalho desenvolvido previamente, foi originalmente proposto para a decomposição de CNTs em um sistema similar, denominado digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC), nas mesmas condições operacionais (270 °C de temperatura e 160 bar de pressão) e em câmara pressurizada, porém, de outro fabricante (UltraWAVE<sup>®</sup>, Single Reaction Chamber, Milestone). Salienta-se também que tais condições são consideradas como o diferencial destes sistemas para a decomposição de amostras resistentes, uma vez que, ao permitir pressões de até 160 bar, possibilita que temperaturas tão elevadas quanto 270 °C sejam atingidas. Naquele trabalho, foi possível decompor massas de CNTs relativamente altas (275 mg), sendo considerada a maior já relatada na literatura, utilizando 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% como solução de decomposição.

No presente trabalho, inicialmente, foi feita a mesma avaliação da influência da massa a ser decomposta, avaliada para o procedimento de digestão ácida por aquecimento convencional em sistema aberto empregando bloco digestor. Para isso, foi feita a decomposição de 500 mg em replicata única (n=1) e da mesma massa total, mas em triplicatas de aproximadamente 167 mg cada, para fígado bovino e frango. A exatidão do método para digestão de fígado bovino e frango, também foi avaliada utilizando a amostra de referência de fígado bovino, juntamente com as amostras (spike). Os resultados estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados obtidos por ICP-OES<sup>a</sup> e por ICP-MS<sup>b</sup> para metais em fígado bovino e frango após digestão por via úmida assistida por micro-ondas em uma cavidade de digestão pressurizada (MAWD-PDC) (valores em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão).

Analitos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Fígado bovino				Frango			
	500 mg (n=1)	Recuperação (%) para fígado + AR <sup>c</sup>	167 mg (n=3)	Recuperação (%) para fígado + AR <sup>d</sup>	500 mg (n=1)	Recuperação (%) para frango + AR <sup>c</sup>	167 mg (n=3)	Recuperação (%) para frango + AR <sup>d</sup>
Al <sup>a</sup>	< 2,11	-	< 6,58	-	< 2,11	-	< 6,58	-
As <sup>b</sup>	< 0,002	-	< 0,006	-	0,019	-	0,019 $\pm$ 0,002	-
Ca <sup>a</sup>	46,4	104	50,7 $\pm$ 8,2	122	38,0	90	38,6 $\pm$ 5,0	127
Cd <sup>b</sup>	0,075	85	0,074 $\pm$ 0,004	102	< 0,001	90	< 0,002	101
Co <sup>b</sup>	0,077	94	0,081 $\pm$ 0,005	110	0,004	99	< 0,006	121
Cr <sup>b</sup>	< 0,239	-	< 0,746	-	< 0,239	-	< 0,746	-
Cu <sup>a</sup>	44,9	100	45,3 $\pm$ 3,1	101	0,202	100	< 0,220	103
Fe <sup>a</sup>	78,2	99	75,6 $\pm$ 4,3	103	3,80	98	4,00 $\pm$ 0,40	107
La <sup>b</sup>	< 0,012	-	< 0,036	-	< 0,012	-	< 0,036	-
Mg <sup>a</sup>	209	112	215 $\pm$ 19	114	359	102	354 $\pm$ 22	115
Mn <sup>b</sup>	3,80	80	4,06 $\pm$ 0,30	101	0,150	95	0,145 $\pm$ 0,020	109
Mo <sup>b</sup>	0,346	-	0,359 $\pm$ 0,019	-	0,030	-	< 0,066	-
Ni <sup>b</sup>	< 0,103	-	< 0,321	-	< 0,103	-	< 0,321	-
Pb <sup>b</sup>	< 0,006	-	< 0,020	-	< 0,006	-	< 0,020	-
V <sup>b</sup>	0,012	-	0,012 $\pm$ 0,001	-	0,003	-	< 0,005	-
Zn <sup>a</sup>	29,1	-	29,5 $\pm$ 2,3	-	5,20	-	5,15 $\pm$ 0,50	-
C (mg L <sup>-1</sup> )	40	157	10,0 $\pm$ 1,5	85,5 $\pm$ 10,0	44	189	20,0 $\pm$ 2,0	66,6 $\pm$ 7,0

AR: amostra de referência, contendo 133  $\pm$  3  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ca; 0,140  $\pm$  0,003  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd; 0,359  $\pm$  0,025  $\mu\text{g g}^{-1}$  Co; 220  $\pm$  2  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu; 202  $\pm$  2  $\mu\text{g g}^{-1}$  Fe; 503  $\pm$  2  $\mu\text{g g}^{-1}$  Mg; 7,17  $\pm$  0,06  $\mu\text{g g}^{-1}$  Mn. <sup>c</sup> 500 mg de fígado/frango e 500 mg de AR (n=1); <sup>d</sup> 160 mg de fígado/frango e 200 mg de AR (n=3). Condições experimentais: 6 mL de HNO<sub>3</sub> 14,4 mol L<sup>-1</sup> + 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%; Programa de irradiação constituído de *i*) 25 min a 180 °C (10 min de rampa) e *ii*) 40 min a 270 °C (5 min de rampa).

Na Tabela 8, foi possível observar que para 500 mg (n=1) de fígado bovino as concentrações de Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, V e Zn foram concordantes com aquelas obtidas na digestão em triplicata (n=3, com 167 mg cada). Os demais elementos como, Al, As, Cr, La, Ni e Pb ficaram abaixo do LOQ para ambas as massas avaliadas. Na digestão de 500 mg de frango, foi possível observar que houve concordância para As, Ca, Fe, Mg, Mn e Zn quando comparados com os obtidos com 167 mg (n=3). Observou-se também que, a quantificação de Co, Cu, Mo e V só foi possível quando a massa de 500 mg foi utilizada, enquanto os demais elementos, independente da massa avaliada, ficaram abaixo do LOQ. É importante destacar que os LOQs obtidos empregando a MAWD-PDC como método de digestão foram menores que aqueles obtidos quando foi utilizada a digestão ácida por aquecimento convencional em sistema aberto empregando bloco digestor. Isso decorre do fato de aquele procedimento ocorrer em um sistema aberto, que o torna mais suscetível à contaminação.

Na avaliação da eficiência de decomposição foram obtidos valores de carbono em solução inferiores a 50 mg L<sup>-1</sup> para qualquer amostra em qualquer condição nesse sistema. Comparando-se os valores de carbono em solução dos digeridos obtidos por MAWD-PDC, observou-se que estes são significativamente menores que aqueles obtidos utilizando a digestão ácida por aquecimento convencional em sistema aberto empregando bloco digestor. Isso está associado às condições operacionais do sistema de MAWD-PDC, que permite temperaturas de até 270 °C, possibilitando a eliminação da matriz orgânica presente na amostra de forma eficiente. Obtendo-se digeridos finais com baixos teores de carbono em solução, conseqüentemente, minimizando interferências na etapa de determinação. Para a avaliação da exatidão do método para ambas as massas, enriquecida com uma amostra de referência de fígado bovino, foram obtidos valores de recuperação compreendidos entre 94 a 122% e 90 a 127% para Ca, Co, Cu, Cd, Fe, Mg e Mn utilizando fígado bovino e frango, respectivamente.

Dessa forma, o método da MAWD-PDC foi considerado adequado para a decomposição de tecidos animais, como fígado bovino e frango, e posterior determinação dos contaminantes inorgânicos por ICP-OES e ICP-MS, uma vez que possibilitou a utilização de massas menores que 500 mg, mantendo a representatividade dos resultados com a digestão de replicata única (n=1) em relação aos resultados obtidos empregando triplicatas de 167 mg. Ainda, utilizando



as condições experimentais, tais como 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% como solução de decomposição e um programa de irradiação de 65 min (40 min a 270 °C), foram obtidos digeridos finais com baixos teores de carbono em solução e compatíveis com as técnicas de determinação como a ICP-OES e a ICP-MS, mesmo usando 1 g de tecido biológico (500 mg de fígado ou frango + 500 mg de amostra de referência).

#### **4.2.4 Avaliação da eficiência de decomposição de CNTs**

Apesar da comprovada adequabilidade da decomposição de CNTs no trabalho desenvolvido previamente, empregando um sistema similar, foi feita a decomposição de CNTs utilizando a MAWD-PDC e posterior determinação dos metais por ICP-OES e ICP-MS. Destaca-se que, neste caso, a avaliação da exatidão do método utilizado no presente trabalho, foi feita através da comparação dos resultados obtidos empregando a MAWD-PDC com aqueles obtidos por MAWD-SRC, no trabalho prévio. Esta comparação foi feita tendo em vista que, em ambos os trabalhos, foi utilizado o mesmo CNT. Dessa forma, pode-se conhecer a concentração dos contaminantes inorgânicos presentes no CNT administrado nos ratos, para que se possa inferir onde os CNTs se concentram, a partir da determinação dos mesmos nos tecidos de ratos tratados e não tratados.

Para isso, neste experimento, 275 mg de CNT foram submetidos a MAWD-PDC, utilizando 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% como solução de decomposição e um programa constituído de *i*) 25 min a 180 °C (10 min de rampa) e *ii*) 40 min a 270 °C (5 min de rampa). Utilizando estas condições, foi observada a completa decomposição dos CNTs, não sendo necessária uma etapa prévia de filtração antes da determinação. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados obtidos por ICP-OES<sup>a</sup> e por ICP-MS<sup>b</sup> para contaminantes inorgânicos em CNT após MAWD-PDC (valores em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

Analitos	MAWD-PDC	Referência <sup>c</sup>
Al <sup>a</sup>	86,0 $\pm$ 8,0	84,4 $\pm$ 5,3
As <sup>b</sup>	0,275 $\pm$ 0,026	0,265 $\pm$ 0,020
Ca <sup>a</sup>	295 $\pm$ 27	283 $\pm$ 28
Cd <sup>b</sup>	< 0,001	<0,007
Co <sup>a</sup>	21,9 $\pm$ 1,9	22,2 $\pm$ 2,0
Cr <sup>a</sup>	11,5 $\pm$ 1,1	11,8 $\pm$ 1,0
Cu <sup>b</sup>	0,340 $\pm$ 0,031	0,336 $\pm$ 0,030
Fe <sup>a</sup>	85,6 $\pm$ 7,5	83,3 $\pm$ 8,2
La <sup>a</sup>	20,4 $\pm$ 1,8	21,8 $\pm$ 1,6
Mg <sup>a</sup>	47,0 $\pm$ 3,0	45,0 $\pm$ 2,6
Mn <sup>a</sup>	1,87 $\pm$ 0,15	1,90 $\pm$ 0,12
Mo <sup>a</sup>	7,80 $\pm$ 0,57	7,93 $\pm$ 0,51
Ni <sup>a</sup>	20020 $\pm$ 2000	21212 $\pm$ 1820
Pb <sup>a</sup>	56,5 $\pm$ 3,5	58,8 $\pm$ 3,0
V <sup>b</sup>	0,100 $\pm$ 0,009	0,098 $\pm$ 0,010
Zn <sup>a</sup>	121 $\pm$ 15	126 $\pm$ 11

<sup>c</sup> Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação. Condições experimentais: 275 mg de CNT, 6 mL de HNO<sub>3</sub> 14,4 mol L<sup>-1</sup> + 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%; Programa de irradiação: i) 25 min a 180 °C (10 min de rampa) e ii) 40 min a 270 °C (5 min de rampa).

Conforme mostrado na Tabela 9, os resultados obtidos utilizando 275 mg de CNT para decomposição por MAWD-PDC, não apresentaram diferença estatística significativa (teste t-student) quando comparados com aqueles obtidos por MAWD-SRC. Os valores obtidos através da decomposição por MAWD-PDC utilizando 275 mg de CNT foram utilizados como valores de referência. É importante destacar que a massa de CNT utilizada na decomposição, foi a mesma empregada na MAWD-SRC para fins de comparação. Assim, com base na avaliação da influência da massa de tecidos animal como fígado bovino e frango, e a eficiência da decomposição de CNT, neste caso demonstrada para uma massa de CNT superior, aproximadamente 7 vezes maior que a massa máxima de CNT administrada nos ratos (38 mg na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> massa corpórea), o método da MAWD-PCD foi

considerado adequado para a decomposição de tecidos, fluidos e pelos dos animais, contendo CNTs.

#### **4.2.5 Avaliação da decomposição dos tecidos, fluidos e pelos dos animais tratados com CNTs por MAWD-PDC**

Uma vez demonstrada a aplicabilidade da MAWD-PDC para decomposição de tecidos animais, como fígado bovino e frango, e a sua eficiência na decomposição de CNTs, esta foi aplicada para decomposição de tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs. Dessa forma, seguindo sugestão do Comitê de Ética Animal da UFSM, a obtenção das amostras utilizadas neste estudo foi feita após o término da avaliação da toxicidade crônica. Para a execução desta, foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos, distribuídos aleatoriamente (n=10), em quatro grupos: *i*) grupo 1, controle; *ii*) grupo 2, administração de 1 mg kg<sup>-1</sup> de CNT; *iii*) grupo 3, administração de 10 mg kg<sup>-1</sup> de CNT e *iv*) grupo 4, administração de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT.

Para a decomposição dos tecidos e fluidos dos animais foram utilizados 250 mg de amostra e para os pelos foram utilizados 150 mg, sendo decompostos em n=7, para cada grupo, com 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. O programa utilizado foi de *i*) 25 min a 180 °C (10 min de rampa) e *ii*) 40 min a 270 °C (5 min de rampa). Ressalta-se que a massa de pelos utilizada no procedimento de decomposição foi de, aproximadamente, 150 mg, por não ter sido feita a coleta de uma quantidade suficiente no momento da eutanásia. Os analitos foram determinados por ICP-OES e ICP-MS e os resultados estão mostrados nas Figuras 6 a 20.

As barras representam a média e a barra de erros representa o desvio padrão para a concentração de cada elemento em cada um dos grupos. Resultados que apresentam diferença estatística em relação aos demais estarão marcados com \*.

Figura 6 - Resultados obtidos para Al por ICP-OES nas fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n=7 para fezes, n=3 para pelos nos grupos controle, 1 e 10 mg kg<sup>-1</sup> e n=5 para o grupo 100 mg kg<sup>-1</sup>).

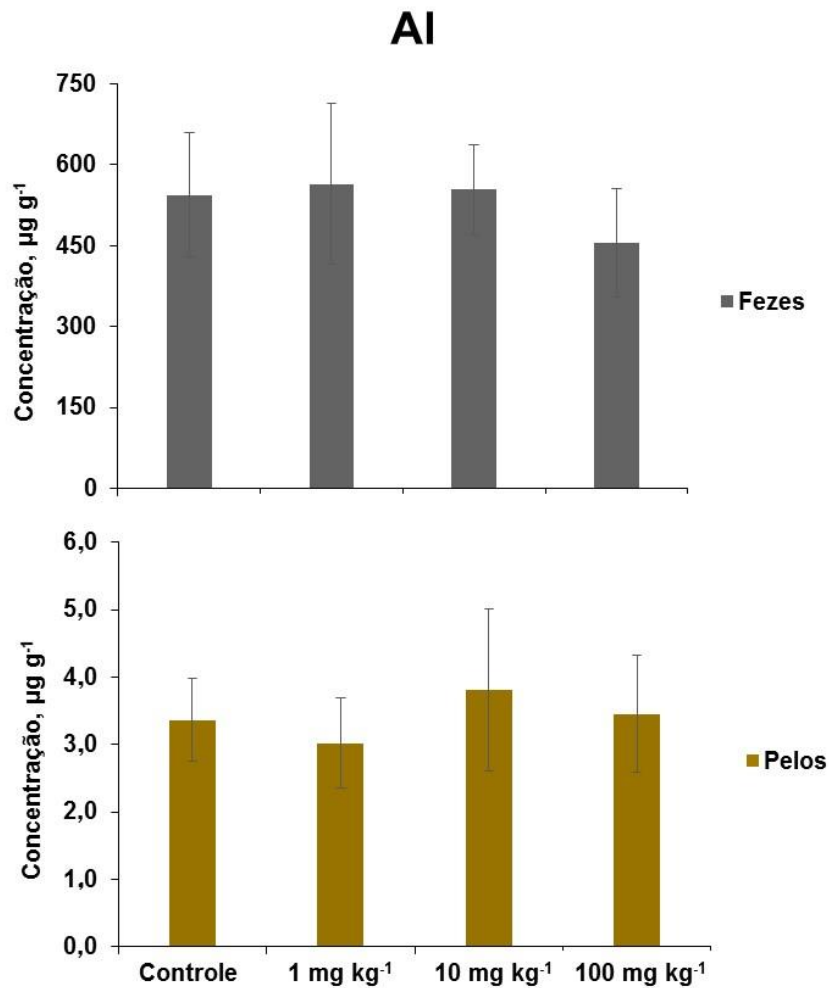


Figura 7 - Resultados obtidos para As por ICP-MS nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

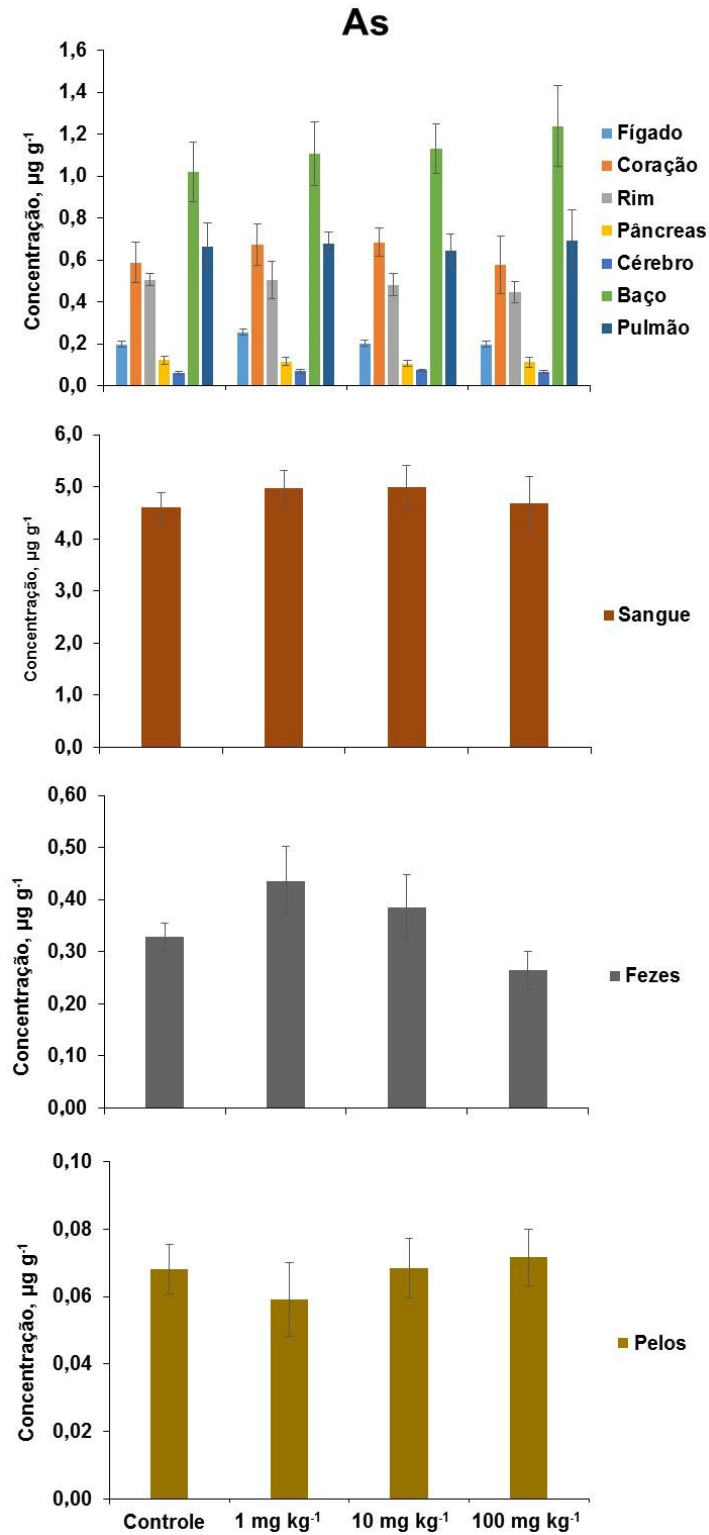


Figura 8 - Resultados obtidos para Ca por ICP-OES nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

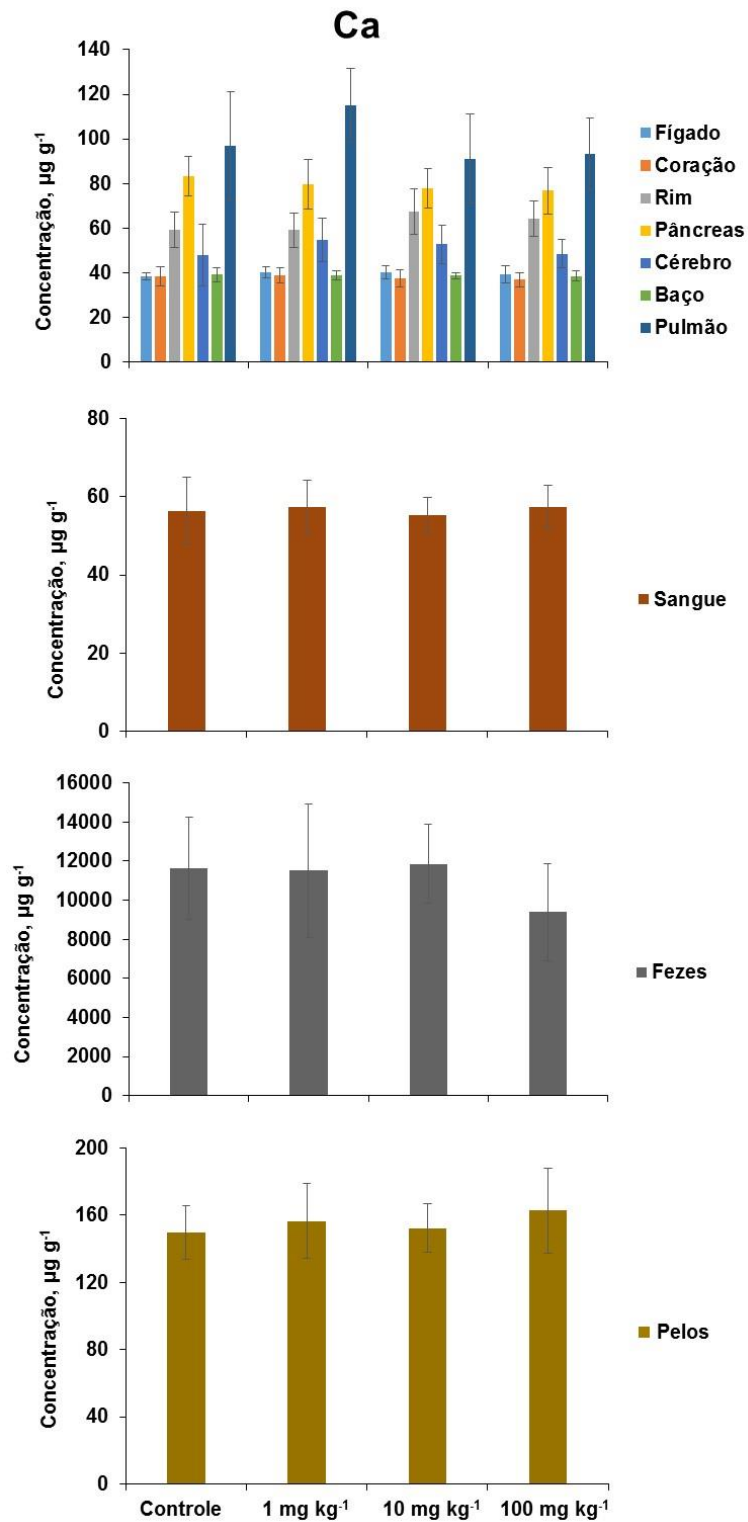


Figura 9 - Resultados obtidos para Cd por ICP-MS nas fezes de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

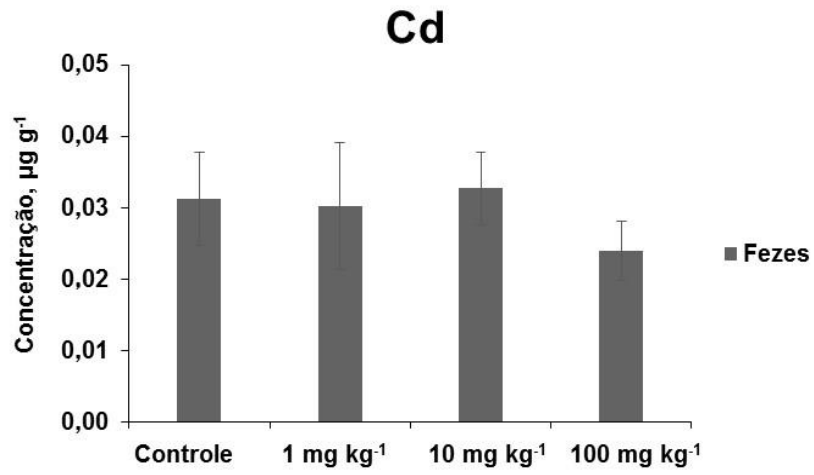


Figura 10 - Resultados obtidos para Co por ICP-MS nos tecidos, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNTs(n = 7).

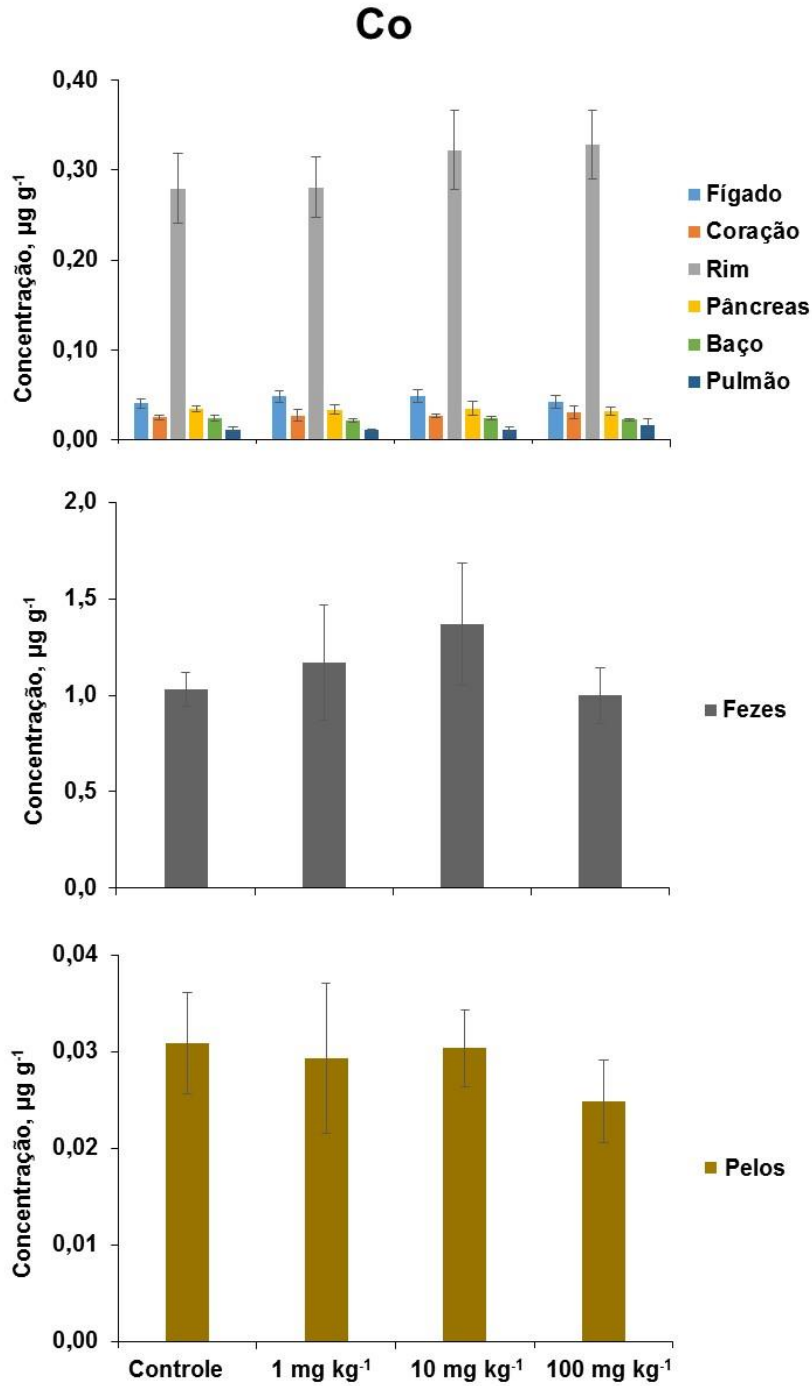




Figura 11 - Resultados obtidos para Cr por ICP-MS nas fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n=7 para fezes, n=6 para pelos nos grupos controle e 10 mg kg<sup>-1</sup>, n=5 para 1 mg kg<sup>-1</sup> e n=4 para o grupo 100 mg kg<sup>-1</sup>).

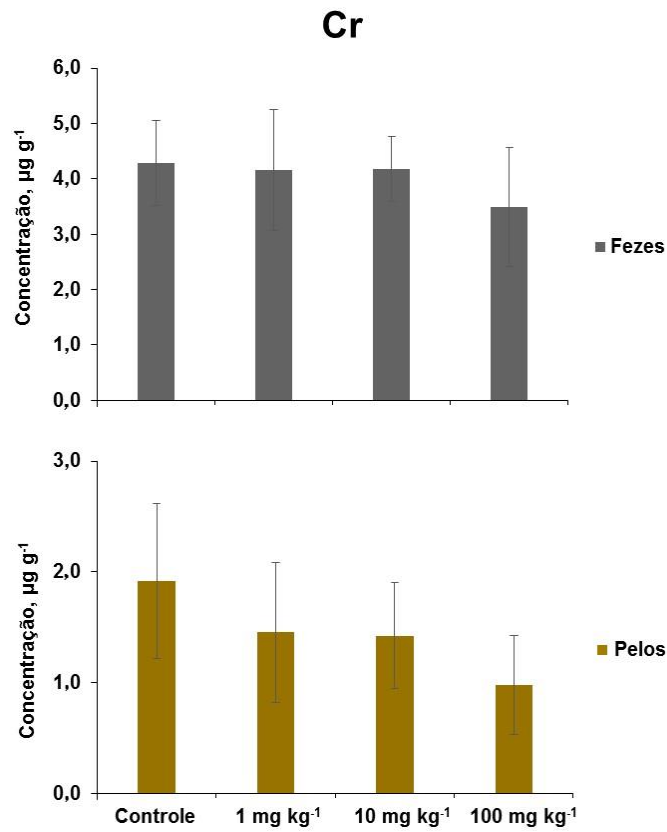


Figura 12 - Resultados obtidos para Cu por ICP-MS nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

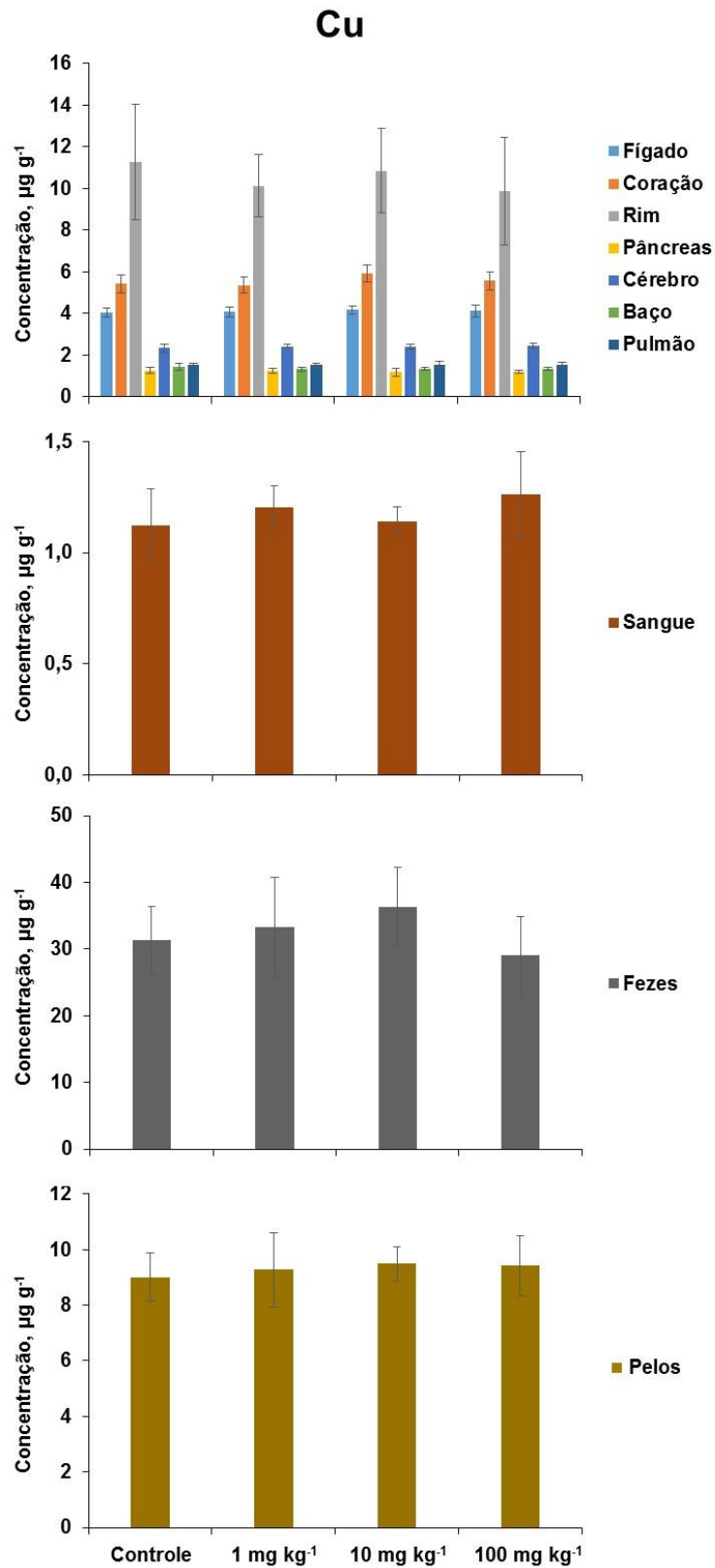


Figura 13 - Resultados obtidos para Fe por ICP-OES nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n=7).

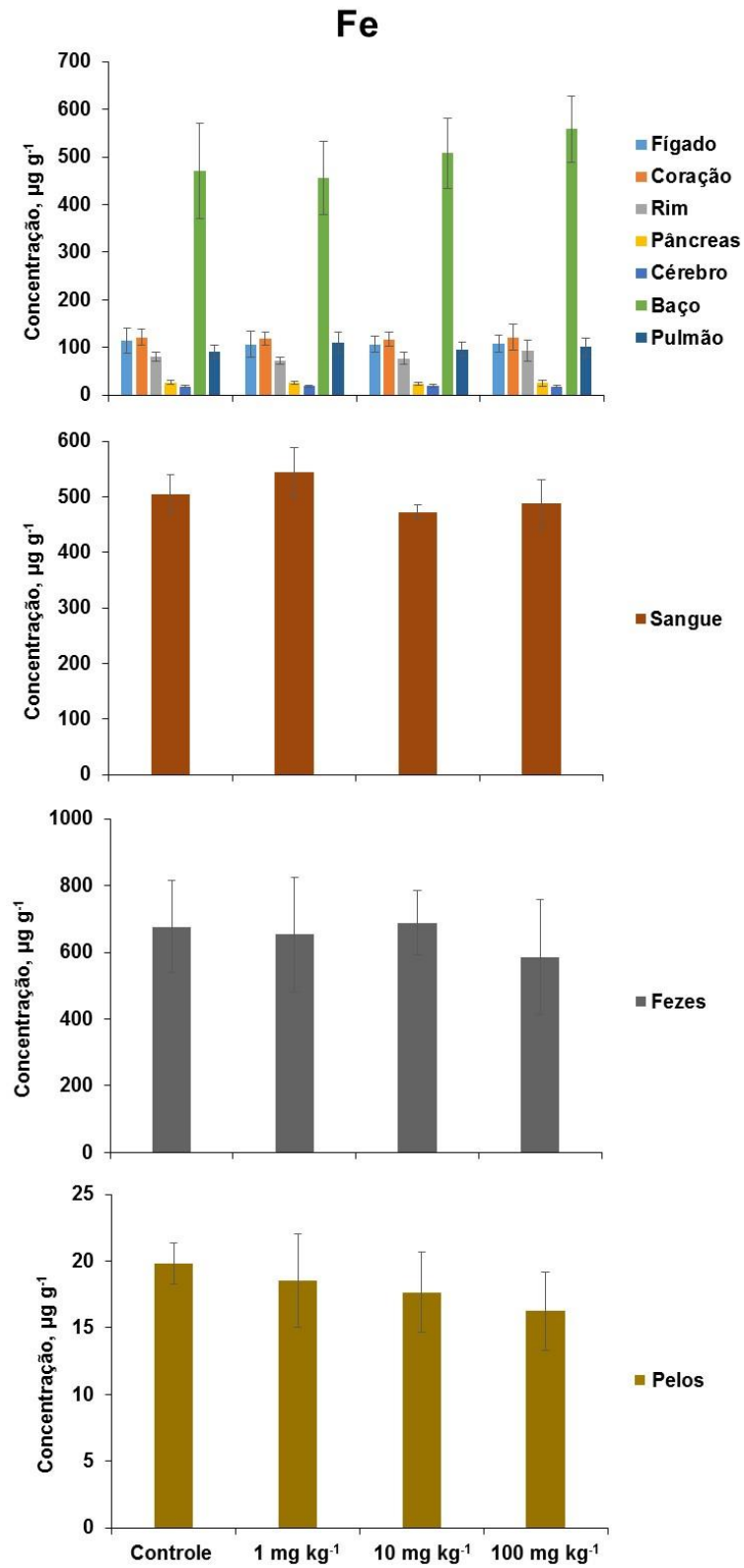


Figura 14 - Resultados obtidos para La por ICP-MS nas fezes de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

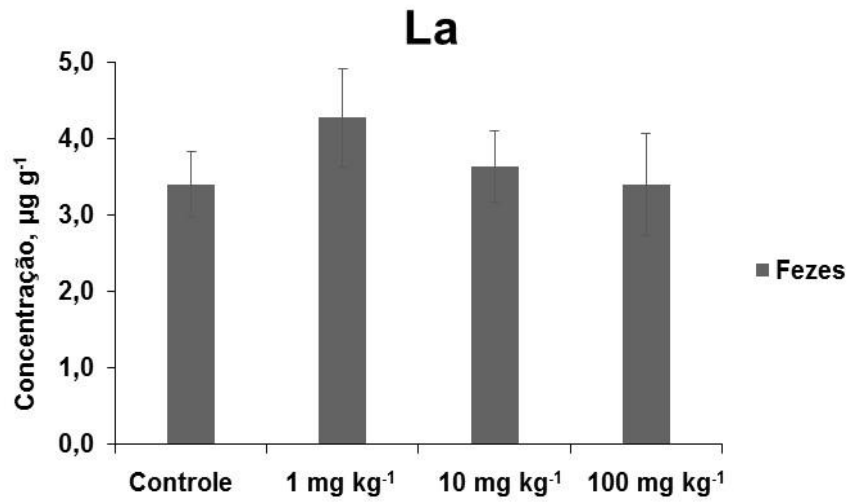


Figura 15 - Resultados obtidos para Mn por ICP-MS nos tecidos animais, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

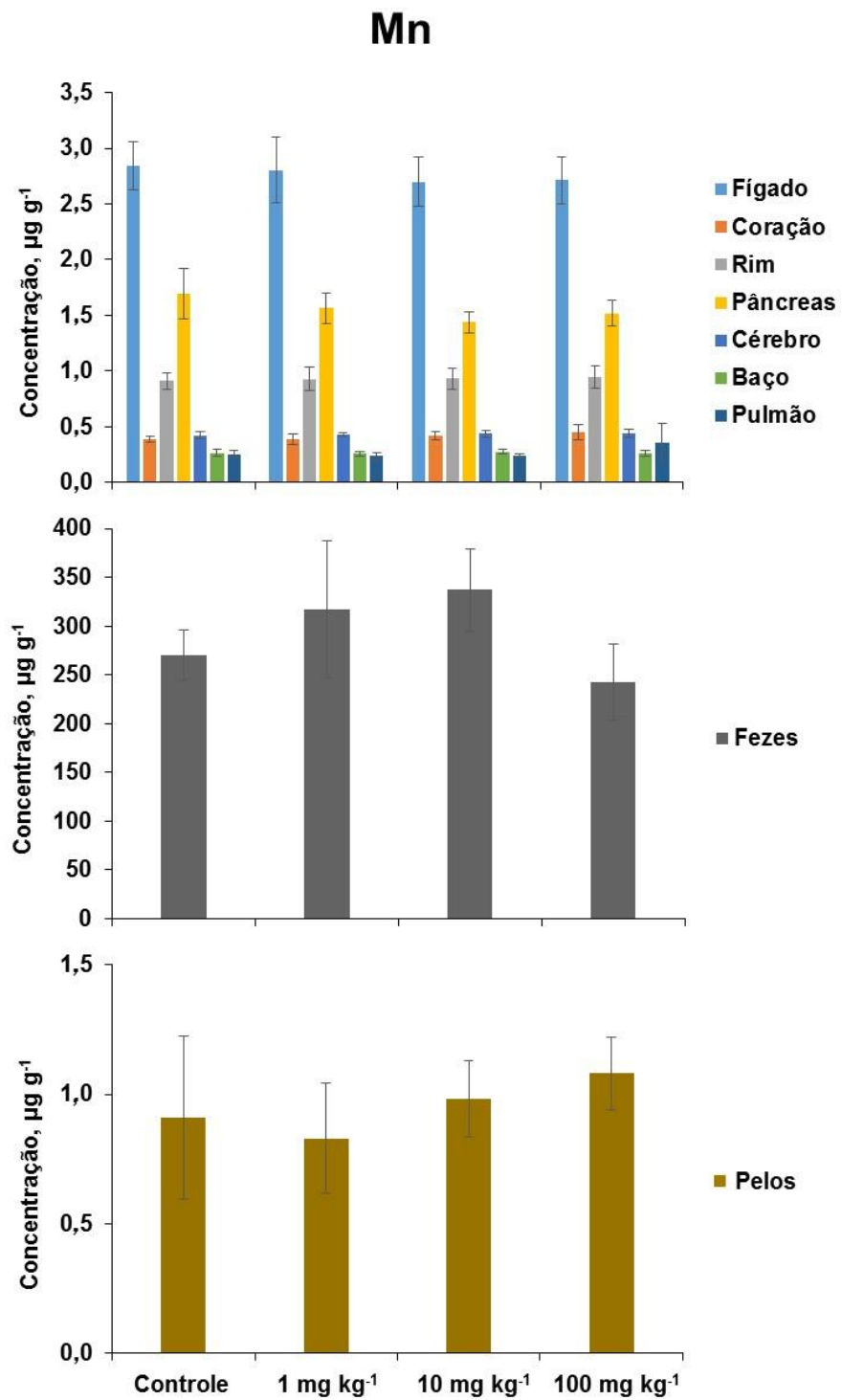


Figura 16 - Resultados obtidos para Mg por ICP-OES nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

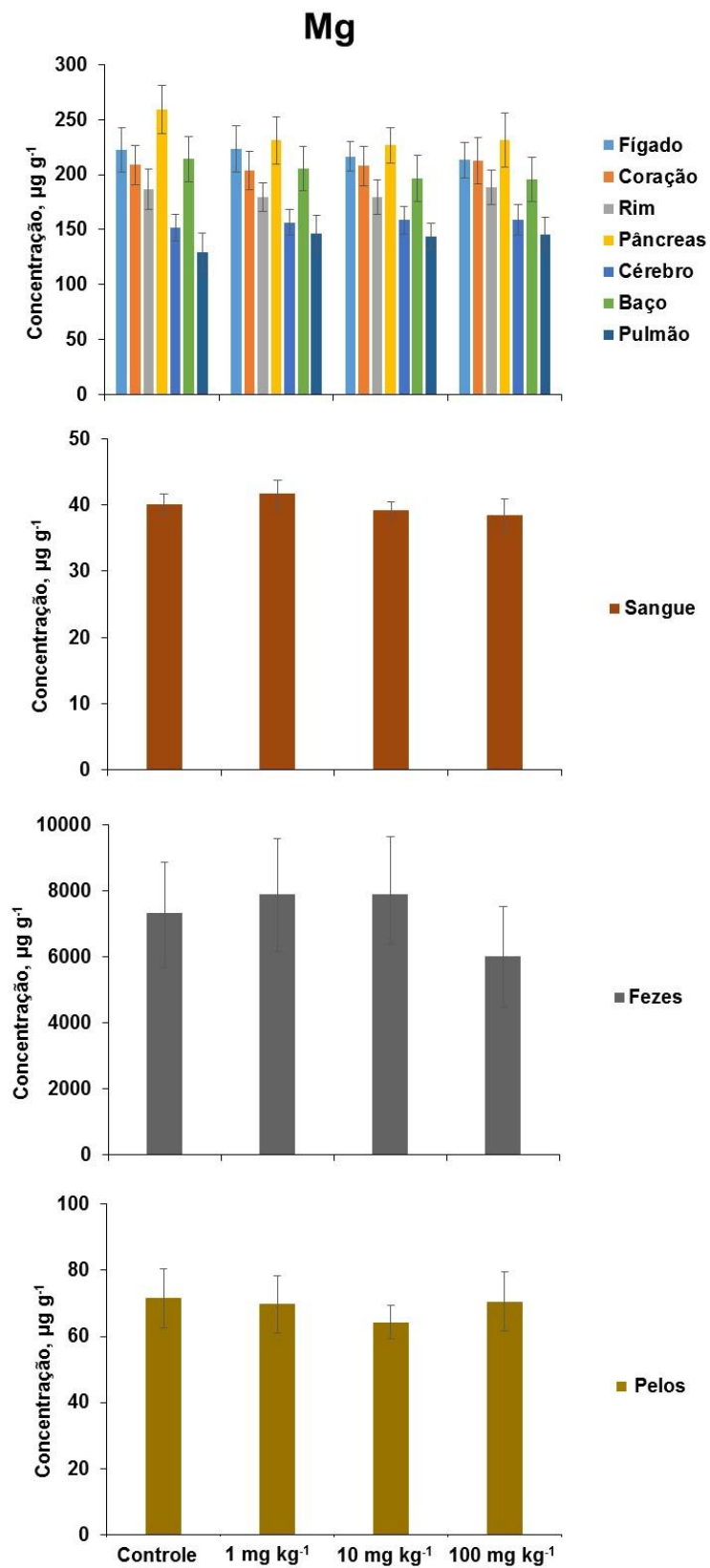


Figura 17 - Resultados obtidos para Mo por ICP-MS nos tecidos, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

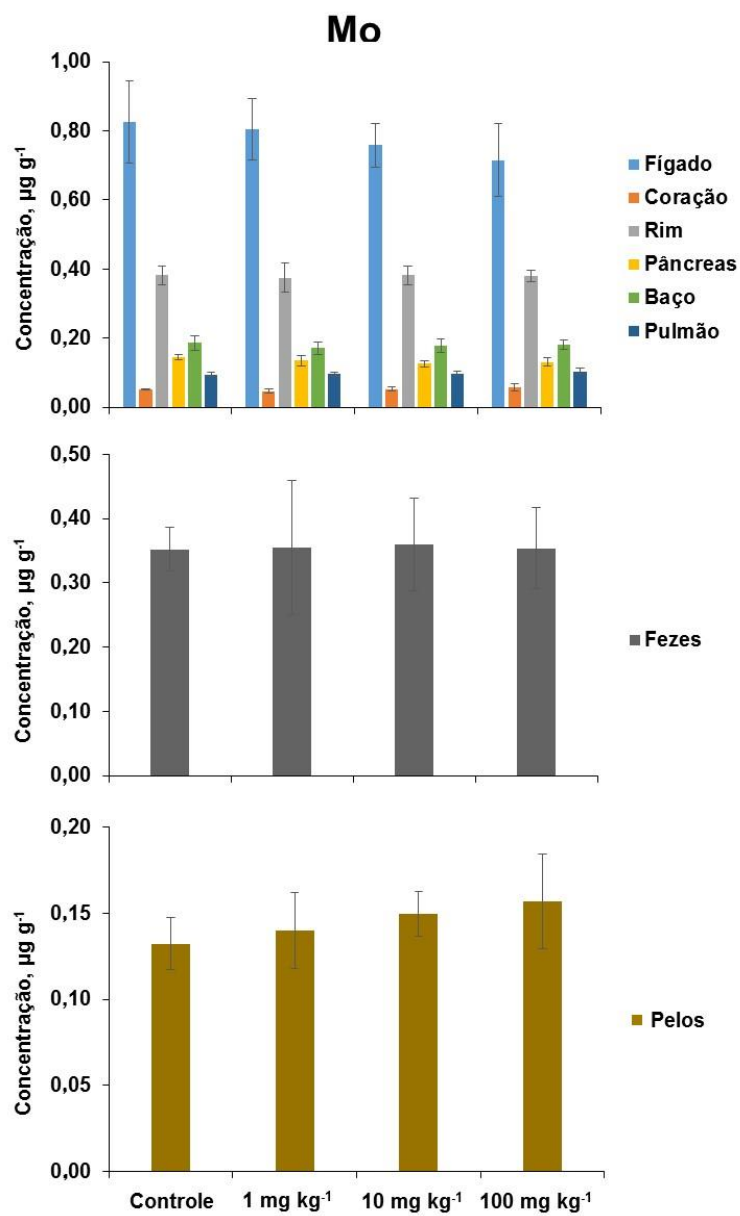


Figura 18 - Resultados obtidos para Pb por ICP-MS nas fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n=7 para fezes, n=7 para pelos no grupo controle e 10 mg kg<sup>-1</sup>, n=4 para 1 mg kg<sup>-1</sup> e n=5 para o grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup>).

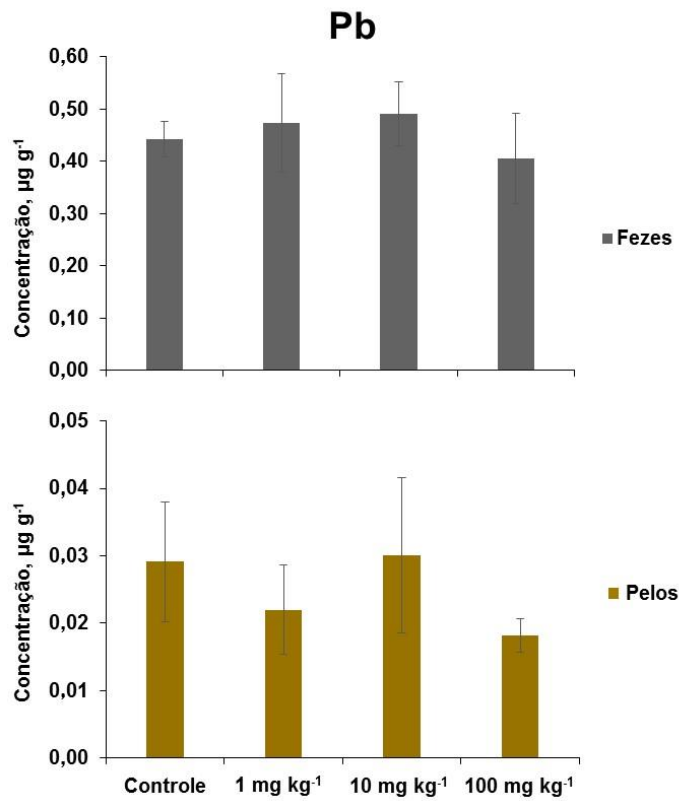




Figura 19 - Resultados obtidos para V por ICP-MS nos tecidos, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).

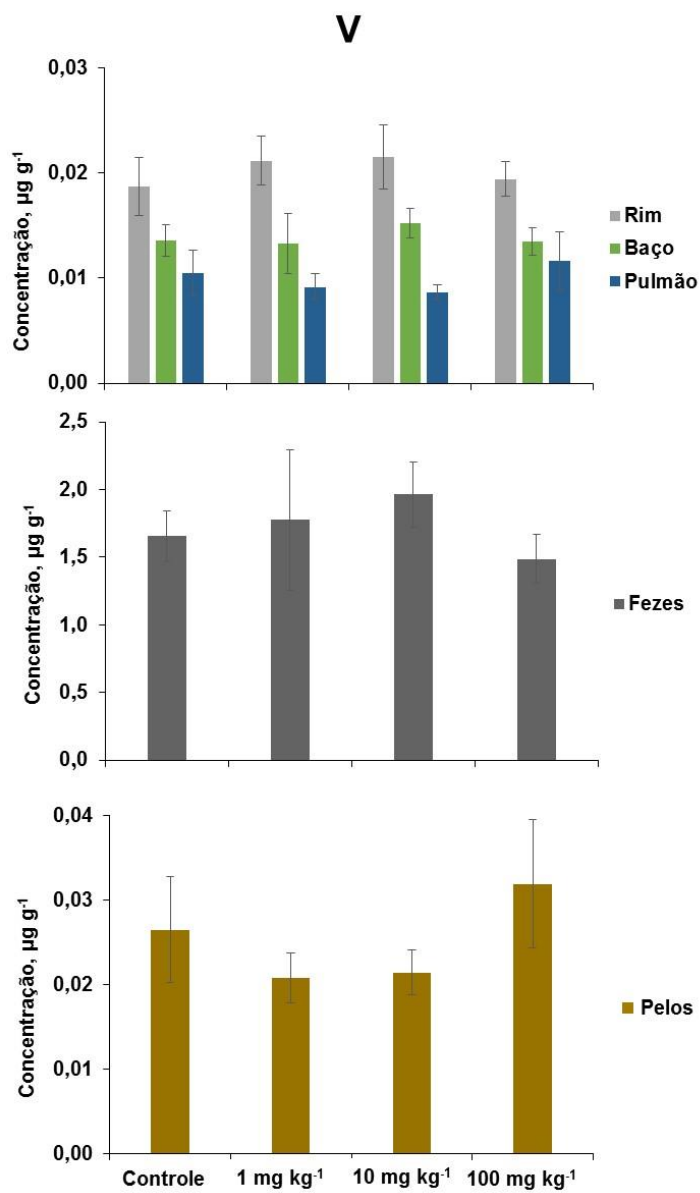
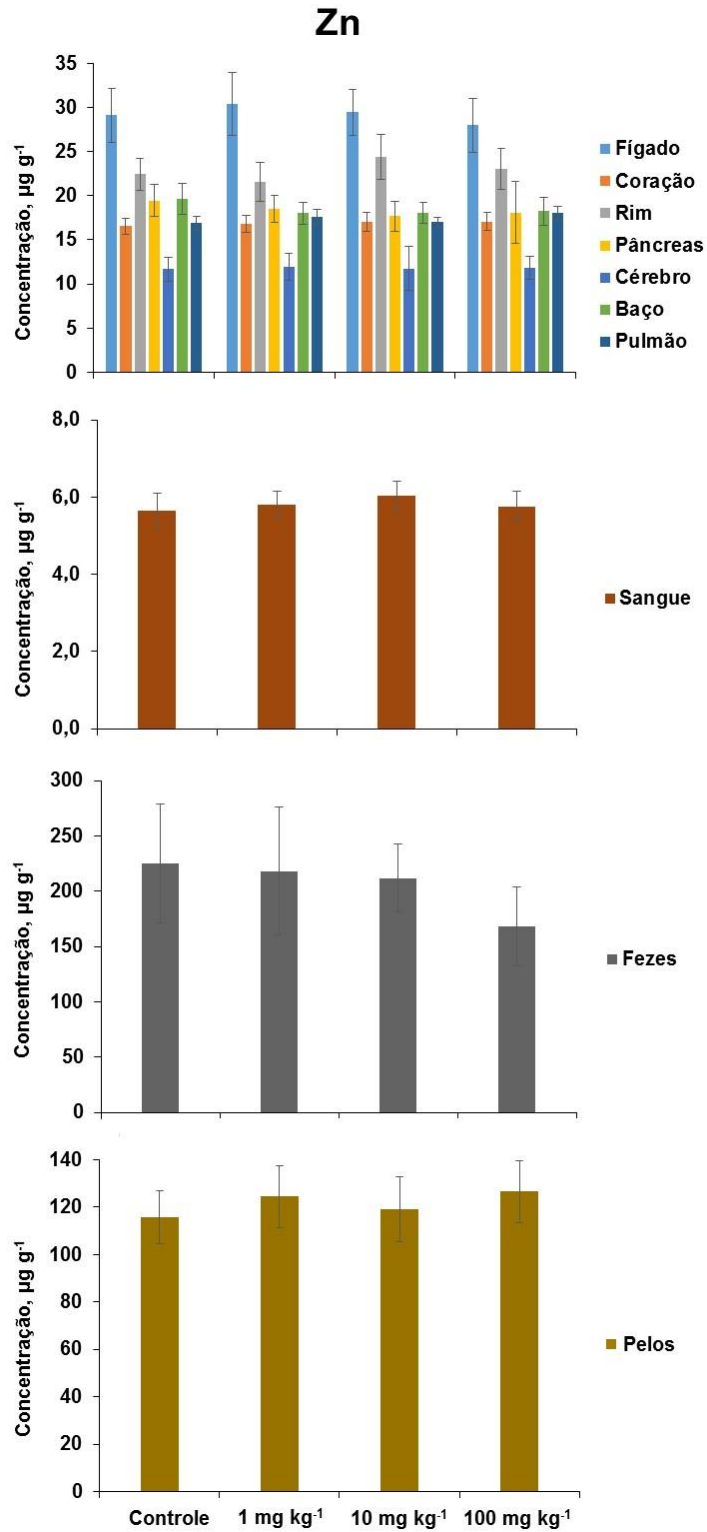


Figura 20 - Resultados obtidos para Zn por ICP-OES nos tecidos, fluidos e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNT (n = 7).



De acordo com as Figuras 7, 8, 12, 13, 16 e 20, foi possível observar que não houve diferença (ANOVA) nos resultados obtidos para As, Ca, Cu, Fe, Mg e Zn nos tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos aos tratamentos com 1, 10 ou 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT em relação aqueles obtidos para o grupo controle. Dentre estes elementos, o Ca e o Mg são considerados macrominerais, sendo estes presentes em maior concentração nas fezes dos ratos. O Ca, por exemplo, ligado à proteína (Ca<sup>2+</sup>-ATPase) é essencial para manter o equilíbrio das funções neurais, uma vez que alterações na disponibilidade deste podem desencadear desordens no sistema nervoso central e sua deficiência em longo prazo é, possivelmente, um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de osteoporose. O Cu, o Fe e o Zn são considerados micronutrientes, sendo essenciais para o organismo em menor concentração. O Cu é co-fator de muitas enzimas, como, por exemplo, a superóxido dismutase, que possui a função de proteger o organismo contra agentes oxidantes e radicais livres (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005). Dentre os tecidos e fluidos analisados, observou-se maior concentração de Cu no rim e nas fezes.

O Fe é um elemento que desempenha diversas funções no organismo, desde o transporte do oxigênio dos pulmões aos tecidos até atuar como co-fator de algumas enzimas envolvidas no processo de conversão de nutrientes à energia, como a fosforilação oxidativa, por exemplo (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005). Porém, quando presente em excesso e não associado à proteínas, pode interagir com o oxigênio para formar intermediários com o potencial de danificar membranas celulares, ou ainda degradar o DNA. No presente trabalho, não houve diferença (ANOVA) na concentração de Fe nos resultados obtidos para os tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs em relação aqueles obtidos para o grupo controle. Entretanto, esse resultado indica apenas que não houve alteração na absorção de Fe, ou alterações devido à absorção de outros elementos, causados pela exposição aguda ou crônica a elementos não-essenciais, mas não relaciona a contribuição deste com a geração de espécies reativas de oxigênio, sendo esta verificada através de análises bioquímicas. Os resultados das análises bioquímicas feitas neste trabalho, por simplificação, estão colocados como Apêndice B.

Koyama *et al.* investigaram a influência da presença de Fe em CNTs de paredes múltiplas e o seu efeito no sistema imunológico de camundongos fêmeas. Os autores relataram perda pronunciada de pelos e formação de calos na incisão

subcutânea dos animais tratados com CNT contendo maior concentração de Fe, enquanto que os MWCNTs submetidos ao tratamento térmico de 2800 °C, demonstraram boa biocompatibilidade. Ainda, foi verificado que CNTs contendo Fe, mesmo em baixa concentração (80 µg g<sup>-1</sup>), podem induzir a geração de ROS (KOYAMA *et al.*, 2009).

Nas Figuras 6, 11 e 18, observou-se que Al, Cr e Pb foram quantificados apenas nas fezes e nos pelos dos animais, enquanto que nos tecidos e no sangue estes ficaram abaixo dos LOQs (2,23; 0,478; 0,013 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente). Os resultados obtidos na decomposição das fezes e pelos dos animais submetidos a tratamento com CNT, não apresentaram diferença (ANOVA) quando comparados com aqueles referentes ao grupo controle. Para obtenção da média da concentração de Al nos pelos, foi empregado n=3 para os animais pertencentes ao grupo controle, 1 e 10 mg kg<sup>-1</sup>, tendo em vista que quatro replicatas ficaram abaixo do LOQ (2,23 µg g<sup>-1</sup>), enquanto na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> foi utilizado n=5. Isto pode estar associado, provavelmente, à falta de representatividade amostral dos pelos dos animais. A coleta foi feita no momento da eutanásia através de um corte na região abdominal dos ratos, sendo os pelos removidos juntamente com uma camada de pele. Antes do procedimento de decomposição, foi feita a separação dos pelos e da pele dos animais e, em seguida, estes foram seccionados para uma melhor homogeneização. Apesar disso, verificou-se que a representatividade desse tipo de material possa não ter sido garantida.

Com respeito aos resultados para Cr e Pb nos pelos dos animais, observou-se, também, possível problema de representatividade amostral, demonstrada pelos altos valores de desvio padrão relativo, compreendidos entre 44 a 92% e 20 a 46% para Cr e Pb, respectivamente. No caso do Cr, para o cálculo da média da concentração, foi utilizado n=6 para os grupos controle e 10 mg kg<sup>-1</sup>, n=5 para o grupo 1 mg kg<sup>-1</sup> (sendo que neste grupo duas replicatas foram desconsideradas devido à possível contaminação, com valores para Cr superiores a 10 vezes a média do restante), e para o grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup>, foi utilizado n=4 (no qual uma replicata ficou abaixo do LOQ, 0,796 µg g<sup>-1</sup>, e duas replicatas, também, foram desconsideradas devido à possível contaminação). Para Pb, foram utilizadas quatro replicatas para a média da concentração do grupo de 1 mg kg<sup>-1</sup> (três replicatas ficaram abaixo do LOQ, 0,021 µg g<sup>-1</sup>), enquanto que, no grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> duas replicatas foram desconsideradas devido à possível contaminação, sendo

considerado, assim,  $n=5$ .

Elementos como Co, Mo e Mn também são considerados micronutrientes e desempenham funções específicas no organismo. O Co, por exemplo, é constituinte da cianocobalamina (vitamina B12) e é essencial para a função normal de todas as células, enquanto o Mo é constituinte de enzimas que catalisam as reações de oxidação e redução. O Mn está presente em diversas enzimas e é responsável pela formação de tecido conjuntivo e esquelético. No presente trabalho, nas Figuras 10, 15 e 17, os resultados obtidos para Co, Mn e Mo nos tecidos, fezes e pelos dos animais pertencentes aos grupos que receberam tratamento com CNT não apresentaram diferença (ANOVA) quando comparados com os obtidos para o grupo controle. Dentre os tecidos investigados, os resultados obtidos para Co e Mo no cérebro ficaram abaixo dos LOQs ( $0,008$  e  $0,041 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente). No sangue, independente do grupo dos animais, os resultados para Co, Mn e Mo foram menores que os LOQs ( $0,008$ ;  $0,069$  e  $0,041 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente).

Em relação a V, na Figura 19, observou-se a presença deste somente em alguns tecidos específicos como o baço, o rim e o pulmão, bem como nas fezes e nos pelos dos animais. Nos demais tecidos e no sangue, a concentração de V ficou abaixo do LOQ ( $0,008 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Nos casos em que foi possível a quantificação de V, os resultados obtidos na decomposição dos tecidos, fezes e pelos dos animais dos grupos tratados com CNT não apresentaram diferença (ANOVA) quando comparados com aqueles do grupo controle.

Elementos como o Cd e o La (Figura 9 e 14) estiveram presentes apenas na decomposição das fezes dos animais, não sendo observada diferença (ANOVA) nos resultados obtidos nos grupos tratados com CNT em relação ao grupo controle. Para os tecidos e pelos, os resultados ficaram abaixo dos LOQs, sendo de  $0,004$  e  $0,023 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente para os tecidos e de  $0,004$  e  $0,040 \mu\text{g g}^{-1}$ , para Cd e La, respectivamente para os pelos dos animais.

Com base nos resultados obtidos na Tabela 9, foi possível observar que, dentre os contaminantes inorgânicos presentes no CNT administrado nos animais, o Ni foi encontrado em maior concentração, aproximadamente 2%. Cabe destacar que este é o elemento em maior concentração no CNT utilizado e provavelmente foi o catalisador utilizado no processo de síntese. Os resultados obtidos para Ni estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados obtidos para Ni por ICP-MS nos tecidos, fezes e pelos de ratos submetidos a tratamentos com CNTs.

Amostra	Grupo	Replicatas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )							Média $\pm$ SD
Fígado	Controle	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,467	< 0,190	0,482	0,475 $\pm$ 0,011
	1 mg kg <sup>-1</sup>	0,576	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,201	< 0,190	< 0,190	0,388 $\pm$ 0,256
	10 mg kg <sup>-1</sup>	0,256	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,256
	100 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,902	0,902
Coração	Controle	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190
	1 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,503	0,366	< 0,190	0,435 $\pm$ 0,097
	10 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190
	100 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,300	0,478	< 0,190	< 0,190	0,389 $\pm$ 0,126
Pâncreas	Controle	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190
	1 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190
	10 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190
	100 mg kg <sup>-1</sup>	0,277	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,277
Pulmão	Controle	0,326	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,326
	1 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	0,202	< 0,190	< 0,190	0,191	< 0,190	< 0,190	0,197 $\pm$ 0,008
	10 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	< 0,190	< 0,190	< 0,190	0,363	< 0,190	< 0,190	0,363
	100 mg kg <sup>-1</sup>	< 0,190	< 0,190	0,908	0,237	3,23	1,57	0,280	1,24 $\pm$ 1,23
Fezes	Controle	3,85	4,38	4,35	3,65	4,25	6,74	4,50	4,54 $\pm$ 1,02
	1 mg kg <sup>-1</sup>	6,14	0,333	3,82	3,83	6,79	3,56	5,52	4,28 $\pm$ 2,15
	10 mg kg <sup>-1</sup>	6,31	6,81	7,76	5,27	6,27	9,27	3,92	6,52 $\pm$ 1,71
	100 mg kg <sup>-1</sup>	15,3	44,9	8,17	23,9	18,5	5,84	24,6	20,2 $\pm$ 13,1
Pelos	Controle	0,961	1,07	< 0,320	0,405	1,83	0,713	0,403	0,897 $\pm$ 0,535
	1 mg kg <sup>-1</sup>	0,925	1,56	0,450	< 0,320	0,684	0,440	< 0,320	0,813 $\pm$ 0,465
	10 mg kg <sup>-1</sup>	0,441	0,713	< 0,320	0,456	< 0,320	0,374	0,515	0,500 $\pm$ 0,129
	100 mg kg <sup>-1</sup>	0,978	< 0,320	0,443	< 0,320	0,461	1,98	< 0,320	0,964 $\pm$ 0,718

De acordo com a Tabela 10, foi possível observar a presença de Ni no fígado, no coração, no pâncreas e no pulmão, nas fezes e nos pelos dos animais. Nos demais tecidos (baço, rim e cérebro) e no sangue, a concentração de Ni ficou abaixo do LOQ ( $0,190 \mu\text{g g}^{-1}$ ). É importante destacar que, apesar da discrepância dos valores obtidos para a concentração de Ni, optou-se por apresentar a concentração que estivesse acima do LOQ, independente do RSD. Isto se faz necessário, particularmente no caso do Ni, tendo em vista que este estava presente em maior concentração e foi considerado o catalisador do processo de síntese do CNT. Ademais, mesmo com a flutuação, pode-se admitir que houve diferença para esse elemento.

No fígado dos animais do grupo controle e do grupo de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , apesar de cinco replicatas terem ficado abaixo do LOQ, para o cálculo da média da concentração foi utilizado  $n=2$ , obtendo-se, assim, desvio padrão relativo de 2,5 e 68%, respectivamente. Nos grupos de  $10$  e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , em seis replicatas de cada grupo, a concentração de Ni foi menor que o LOQ, sendo mostrado na tabela apenas a concentração para uma replicata,  $0,256$  e  $0,902 \mu\text{g g}^{-1}$  de Ni no fígado dos ratos tratados com  $10$  e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT, respectivamente. Com relação à presença de Ni no fígado dos animais do grupo controle, não se descarta que a contaminação possa ser considerada oriunda da alimentação, uma vez que foi observada a presença de Ni na composição da ração dos animais ( $2,17 \pm 0,13 \mu\text{g g}^{-1}$ , conforme o Apêndice A, que apresenta os resultados para os elementos na ração utilizada). Apesar de ter sido observada a presença de Ni na ração, foi observado aumento na concentração deste elemento no fígado dos animais do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , o que pode estar ligado à influência do CNT, que continha elevado teor de Ni. O fígado tem como uma das principais funções o armazenamento e biotransformação das substâncias que recebe, oriundas da alimentação ou da corrente sanguínea, dentre elas, as substâncias consideradas tóxicas para convertê-las em menos tóxicas (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005). Dessa forma, o fígado é o primeiro órgão a receber os CNTs e a análise deste é imprescindível, uma vez que é o órgão mais suscetível ao acúmulo de elementos quando a conversão e/ou eliminação das substâncias consideradas tóxicas não ocorre completamente. Devido a isso, em estudos de toxicidade, normalmente, são feitas análises histopatológicas ou bioquímicas, a fim de verificar possíveis lesões hepáticas oriundas desta interação. Este indicativo foi utilizado no presente estudo no teste de toxicidade oral

aguda (item 4.1.1.1 *Análise histopatológica em estudo de toxicidade aguda*) onde foram observadas pequenas lesões hepáticas no fígado de ratos tratados com 300 mg kg<sup>-1</sup> de CNT.

No coração dos animais pertencentes aos grupos de 1 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT, a concentração de Ni foi calculada com n=2, sendo que para os demais grupos os valores de concentração ficaram abaixo do LOQ (0,190 µg g<sup>-1</sup>). Na determinação de Ni no pulmão dos ratos pertencentes ao grupo controle e ao grupo de 10 mg kg<sup>-1</sup>, seis replicatas de cada grupo apresentaram valores menores que o LOQ. No grupo de 1 mg kg<sup>-1</sup>, duas replicatas foram consideradas para o cálculo da média e foi obtido RSD de 4%, enquanto que no grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup>, das sete replicatas, cinco obtiveram valores acima do LOQ. No entanto, a concentração de Ni variou de 0,237 a 3,23 µg g<sup>-1</sup>, tendo como média 1,24 ± 1,23 µg g<sup>-1</sup>, sendo obtido, neste caso, RSD de 99%. Observou-se também que, no pâncreas, somente uma replicata do grupo dos animais tratados com a dose maior de CNT (100 mg kg<sup>-1</sup>) teve a concentração de Ni maior que o LOQ. Os resultados obtidos para Ni nos pelos dos animais dos grupos do tratamento, não apresentaram diferença (ANOVA) quando comparados com aqueles obtidos no grupo controle. Porém, foram obtidos RSDs de 26 a 74%, sendo que uma replicata do grupo controle, duas replicatas do grupo de 1 e 10 mg kg<sup>-1</sup> e 3 replicatas do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> ficaram abaixo do LOQ (0,320 µg g<sup>-1</sup>, considerando 150 mg de massa utilizada na decomposição) corroborando assim, com a não representatividade amostral dos pelos dos animais.

No que diz respeito à concentração de Ni nas fezes dos ratos, foi possível observar que há diferença (ANOVA) nos resultados obtidos na decomposição das fezes dos animais tratados com 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT em relação aos animais do grupo controle e dos grupos de 1 e 10 mg kg<sup>-1</sup>. Para todos os grupos, a concentração de Ni foi calculada considerando n=7 e os RSDs variaram de 26 a 65%. A concentração de Ni nas fezes dos animais tratados com a maior dose de CNT (100 mg kg<sup>-1</sup>) variou de 5,84 a 44,9 µg g<sup>-1</sup>, obtendo-se um RSD de, aproximadamente 65%. É importante destacar que, o último tratamento dos animais com CNT, foi feito três dias antes da eutanásia e a coleta das fezes foi feita durante a execução da mesma. Neste período de intervalo, possivelmente, mais CNTs foram eliminados e, mesmo assim, com a coleta das fezes no momento da eutanásia, foi possível observar um aumento crescente da concentração de Ni à medida que a concentração das doses de CNT aumentou. Ainda, observou-se também diferença



na coloração das fezes, sendo que as do grupo controle tinham uma tonalidade marrom claro e aquelas oriundas dos animais tratados com  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT, tinha coloração preta. Dessa forma, embora não se possa mensurar com exatidão o quanto de CNT foi eliminado do organismo dos animais por evacuação, foi possível inferir que, de fato, uma quantidade significativa de CNT, considerando o aumento de, aproximadamente, 5 vezes a concentração de Ni nas fezes dos animais tratados com a dose de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , foi eliminada.

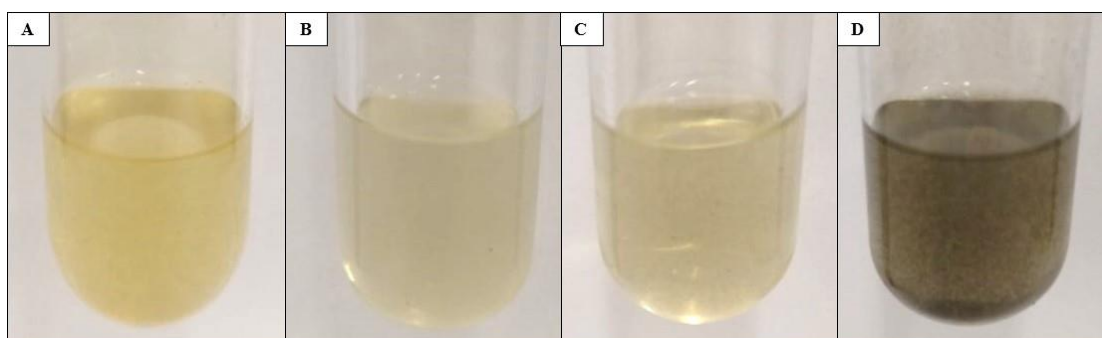
Lam *et al.* avaliaram a toxicidade de CNTs nos pulmões de camundongos tratados com três tipos de CNTs de paredes simples obtidos por diferentes processos de síntese e contendo concentrações variadas de impurezas metálicas (Fe, Ni e Y). No trabalho de Lam *et al.*, os CNTs foram administrados via instilação intratraqueal, de modo que foram inseridos dentro dos pulmões dos camundongos. Como resposta, independente das concentrações de impurezas metálicas presentes nos CNTs administrados, foi observada inflamação peribrônquica e necrose nos pulmões, após 90 dias da administração de  $0,1$  e  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT. Entretanto, houve a morte de 5 camundongos, de um total de 9, submetidos à dose máxima de CNT contendo a maior concentração de Ni e Y, 26 e 5%, respectivamente. Neste caso, os autores atribuíram a causa da morte à alta concentração de Ni, e estimaram o quanto de Ni poderia estar presente nos pulmões dos animais, baseando-se em um outro trabalho já relatado na literatura, onde todos os camundongos expostos a  $10 \text{ mg g}^{-3}$  de  $\text{Ni}_3\text{S}_2$  foram a óbito (LAM *et al.*, 2004). Embora não se possa fazer uma comparação entre o presente trabalho e o desenvolvido por Lam *et al.*, observa-se que a concentração de Ni presente no CNT utilizado pelos autores foi, aproximadamente, 13 vezes maior que aquela presente no CNT utilizado neste trabalho (2% de Ni).

De maneira geral, dentre os analitos, foram observadas diferenças nos resultados obtidos para Ni no fígado, coração, pulmão e nas fezes dos animais pertencentes aos grupos dos animais tratados com CNT em relação ao grupo controle. Apesar da discrepância nos valores obtidos para concentração de Ni, foi possível verificar que, mesmo em baixa concentração em relação aquela presente no CNT, houve a absorção em tecidos específicos de somente alguns poucos animais tratados com CNT. Este comportamento já era esperado, tendo em vista que ao se trabalhar com animais, podem ser observadas diferenças no metabolismo de cada rato e, conseqüentemente, na taxa de absorção e/ou eliminação de

elementos, oriundos da alimentação e/ou da exposição a substâncias tóxicas. Dessa forma, para que se tenha uma avaliação mais ampla, seria necessário um número maior de ratos ( $n > 10$  para cada grupo) submetidos ao estudo.

De acordo com os resultados apresentados nesta avaliação e considerando a presença de Ni em alguns tecidos específicos e nas fezes dos ratos (Tabela 10), foi feita a digestão dos mesmos em sistema aberto empregando bloco digestor. Conforme verificado na avaliação feita no item 4.2.1, a digestão neste tipo de sistema foi adequada somente para a decomposição de tecidos animais, mas não se aplicou ao objetivo do estudo que visava a decomposição de tecidos, fluidos e pelos dos animais, contendo CNTs. Dessa forma, a digestão dos tecidos e fezes dos ratos submetidos a tratamentos com CNTs foi feita para verificar, visualmente, a presença de CNT remanescente em solução. Para isso, o restante da massa (20 a 100 mg) de tecidos como fígado, coração, pulmão, pâncreas e fezes foi submetido ao procedimento de digestão em sistema aberto empregando bloco digestor (4 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 120 °C por 5 h). O aspecto dos digeridos das fezes que, visualmente, apresentaram CNT remanescente, estão mostrados na Figura 21.

Figura 21 - Aspecto dos digeridos após digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor, sendo A) e B) fezes de ratos tratados com  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT e C) E D) fezes de ratos tratados com  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.



Como mostra a Figura 21, foi possível observar a presença de um resíduo remanescente nos digeridos das fezes de ratos tratados com  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figuras

21A e 21B) e daqueles tratados com  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT (Figuras 21C e 21D). Dessa forma, tendo em vista que o sistema utilizado não possibilita a digestão de CNTs e de acordo com o aumento observado para a concentração de Ni nas fezes dos ratos à medida que a concentração das doses de CNT aumentou (Tabela 10), foi possível inferir a presença de CNT nas fezes dos ratos tratados com 10 e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . Assim, infere-se que a digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor serviria como estratégia qualitativa para verificar a provável presença de CNT, sendo que a confirmação pode ser feita com o emprego de técnicas de microscopia como a MEV, por exemplo.

É importante mencionar novamente que somente alguns poucos trabalhos relatados, relacionam a contribuição do efeito tóxico proveniente das impurezas metálicas, oriundas do processo de síntese dos CNTs, em ratos submetidos à tratamentos com os mesmos. Ainda, a maior parte dos poucos trabalhos faz essa relação apenas inferindo a concentração dos elementos no CNT e não no órgão analisado. Além disso, os métodos empregados para a decomposição dos CNTs não são adequados, podendo levar a resultados imprecisos. Dessa forma, considerando esses fatores e tendo em vista que as diferenças nas características dos CNTs (tipo, tamanho e pureza), bem como a forma de administração dos mesmos, podem causar efeitos adversos na toxicidade e alterar o local onde estes atuam ou se concentram, não é pertinente uma comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com os relatados na literatura. Somado a isto, destaca-se, também, que este é o primeiro trabalho que investigou, de maneira indireta, a presença de CNTs em diversos tecidos como, o baço, cérebro, coração, fígado, pâncreas, pulmão e rim, fluidos, como sangue e fezes, e pelos de ratos submetidos a tratamento com CNTs.

Com base na avaliação feita neste trabalho, foi possível inferir que o método de MAWD-PDC foi adequado para a decomposição de tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs para a posterior determinação elementar. Na Tabela 11 são apresentados alguns parâmetros inerentes ao método de MAWD-PDC utilizado neste trabalho.

Tabela 11 - Parâmetros do método de MAWD-PDC.

Parâmetro	MAWD-PDC	
Massa de amostra (mg)	250	
Reagentes	6 mL de HNO <sub>3</sub> 14,4 mol L <sup>-1</sup> + 0,5 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	
Programa de irradiação	i) 25 min a 180 °C (10 min de rampa); ii) 40 min a 270 °C (5 min de rampa) e iii) 40 min de resfriamento	
Número de replicatas por ciclo de decomposição	18	
Carbono em solução (mg L <sup>-1</sup> )	Tecidos: 51,9 ± 14,7; Fluidos: 58,9 ± 17,1; Pelos: 62,8 ± 20	
Acidez residual	Tecidos: 81,5 ± 8,0%; *3,50 mol L <sup>-1</sup> Fluidos: 75,8 ± 8,5%; *3,20 mol L <sup>-1</sup> Pelos: 80,6 ± 10,7%; *3,50 mol L <sup>-1</sup>	
Limite de quantificação (µg g <sup>-1</sup> )	ICP-OES	ICP-MS
Al	2,23	-
As	1,60	0,008
Ca	6,23	-
Cd	0,400	0,004
Co	0,680	0,008
Cr	0,400	0,478
Cu	0,409	0,133
Fe	1,19	-
La	0,891	0,023
Mg	1,04	-
Mn	0,400	0,069
Mo	0,400	0,041
Ni	0,407	0,190
Pb	4,00	0,013
V	1,40	0,008
Zn	2,12	1,21

\* concentração ácida dos digeridos finais, considerando o volume de HNO<sub>3</sub> (6 mL) utilizado no procedimento de digestão.

Conforme pode ser observado na Tabela 11, a MAWD-PDC foi aplicada para a decomposição de 250 mg de amostra e posterior determinação dos contaminantes inorgânicos por ICP-OES e ICP-MS. Destaca-se que a massa utilizada na decomposição, foi selecionada levando-se em consideração a pequena quantidade de tecidos e dos fluidos dos animais disponível para este estudo. Dessa forma, de acordo com a avaliação feita no item 4.2.3 *Influência da massa de amostra utilizada*

na decomposição, é possível utilizar massas de até 1 g (considerando 500 mg de tecido animal e 500 mg da amostra de referência de fígado bovino). Foi possível a decomposição de até 18 replicatas por ciclo, sendo considerada uma frequência analítica adequada para o objetivo do presente estudo, uma vez que o número de amostras digeridas era elevado (nessa situação eram 280 amostras). Assim, empregando 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% como solução de decomposição e um programa de irradiação de 65 min (40 min a 270 °C), foram obtidos digeridos finais com baixos teores de carbono em solução e acidez residual compatíveis com as técnicas de determinação, como a ICP-OES e a ICP-MS.

Com relação ao tempo necessário para a decomposição, observou-se que este é menor que o empregado por Ge *et al.*, mais de 12 h no sistema classificado de alta pressão, e similar àqueles utilizados por Mello *et al.*, e Mortari *et al.*, na decomposição de CNTs (GE *et al.*, 2008; MELLO *et al.*, 2011; MORTARI *et al.*, 2010). É importante mencionar que, no presente trabalho, os contaminantes inorgânicos investigados foram quantificados por ICP-OES e por ICP-MS e, quando possível a comparação, não foi observada diferença entre os resultados obtidos por ambas as técnicas. Assim, na Tabela 11 observa-se, ainda, que os LOQs, expressos em µg g<sup>-1</sup>, foram calculados para ambas as técnicas, a partir do desvio-padrão de 10 leituras do branco, multiplicado por 10 e acrescido das concentrações dos brancos, levando-se em consideração a massa de amostra decomposta (250 mg) e o volume final de solução (20 mL).

#### 4.3 ANÁLISE DE BIODISTRIBUIÇÃO POR LA-ICP-MS

A análise de biodistribuição por LA-ICP-MS foi feita no baço, fígado, pulmão e rim dos ratos do grupo controle e daqueles pertencentes ao grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup>. Estes foram escolhidos a fim de verificar uma possível diferença na distribuição dos elementos nos tecidos dos animais comparando o grupo controle com o grupo submetido à maior dose de CNT. O preparo dos tecidos para as lâminas foi feito de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.6 *Obtenção de imagens por LA-ICP-MS* e as condições operacionais para aquisição das bioimagens por LA-ICP-MS estão descritas na Tabela 4, do item 3.1 *INSTRUMENTAÇÃO*. É importante destacar que a análise de biodistribuição foi feita monitorando todos os contaminantes inorgânicos presentes nos CNTs. Entretanto, serão mostradas as bioimagens

somente para os elementos que estiveram acima do limite de detecção.

Particularmente para análise de biodistribuição dos elementos no fígado, foi analisada uma região específica do tecido, tendo em vista o tamanho e o longo tempo de ablação requerido. Para isso, foi aplicado o modo de ablação de múltiplas linhas, obtendo-se um total de 60 linhas ablasadas na amostra, com espaçamento de 10  $\mu\text{m}$  entre cada linha e diâmetro de feixe do laser de 100  $\mu\text{m}$ . O tempo total de medição das intensidades dos elementos monitorados na amostra de fígado, para obtenção das bioimagens, foi de, aproximadamente, 1 h e 30 min. Na sequência, para o fígado, estão mostradas sua imagem, obtida com uma câmera CCD integrada ao sistema de LA e as bioimagens para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Imagens das amostras do fígado do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Ca, (E) Cu e (G) Fe no fígado do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Ca, (F) Cu e (H) Fe no fígado do rato do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.

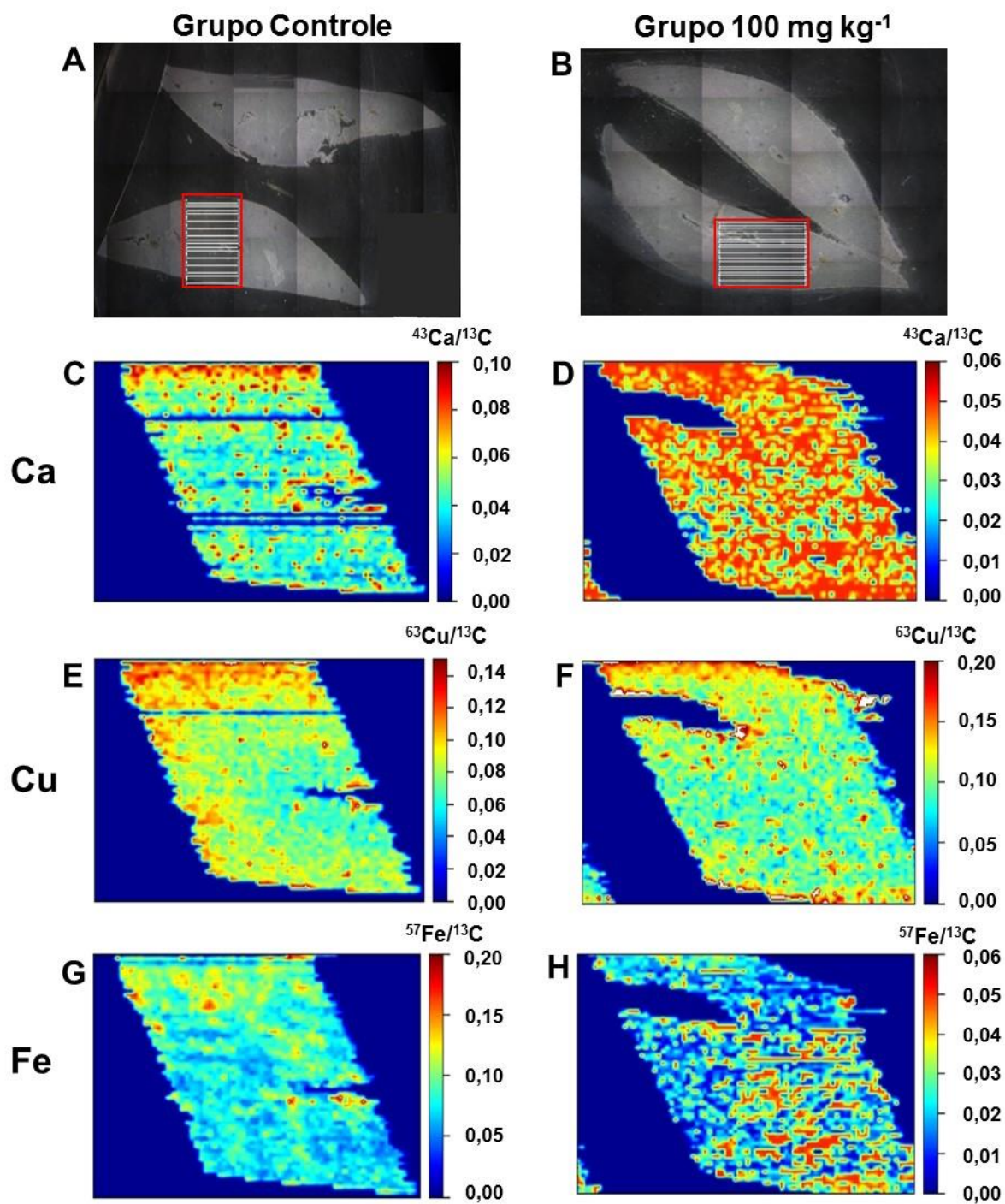
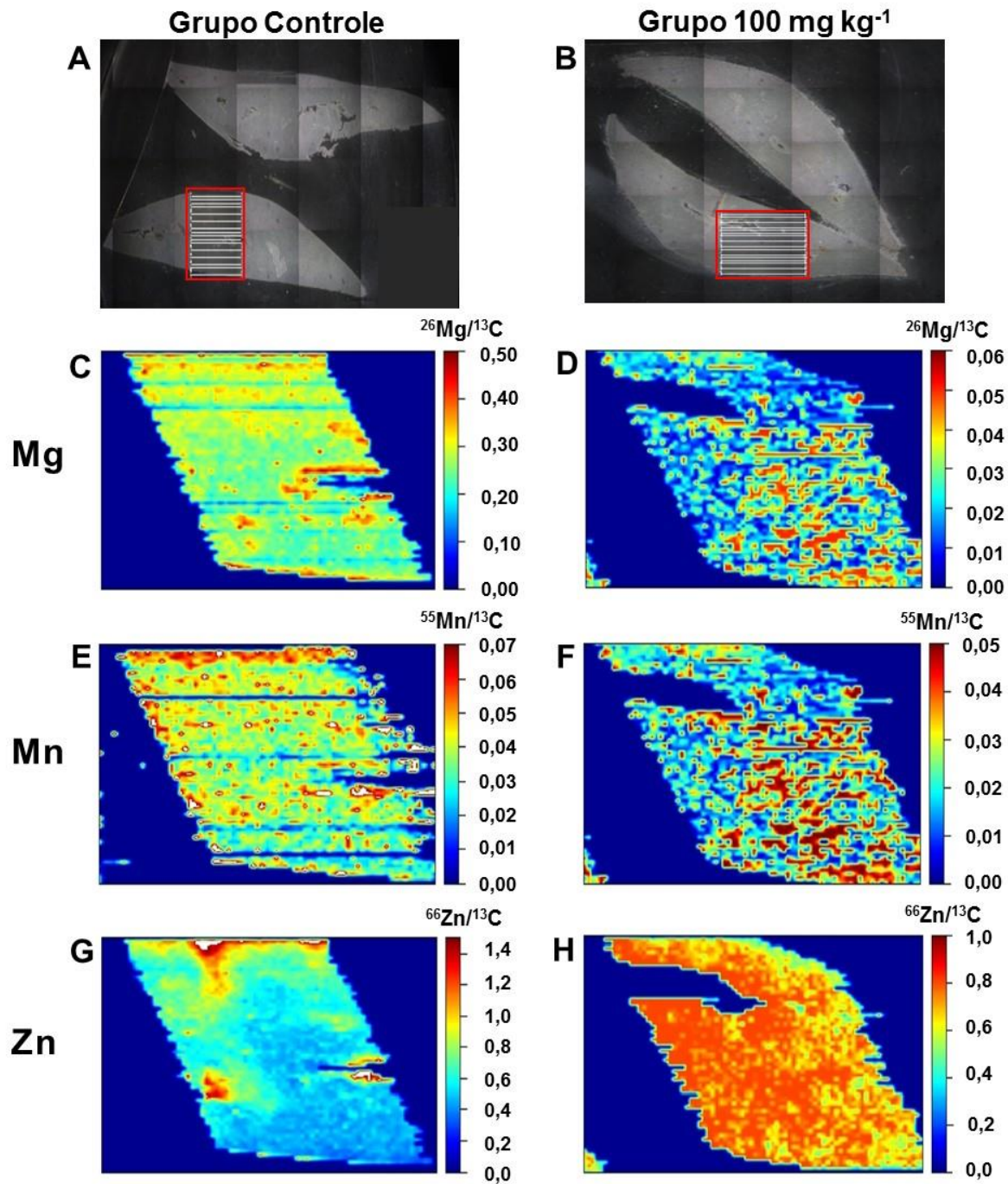


Figura 23 - Imagens das amostras do fígado do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Mg, (E) Mn e (G) Zn no fígado do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Mg, (F) Mn e (H) Zn no fígado do rato do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.





Como pode ser visto na Figura 22, o Ca estava distribuído quase que homogeneamente na região do tecido analisado em ambos os grupos. Para Cu, observou-se, também, uma distribuição homogênea com uma deposição maior deste elemento nas extremidades da região analisada do fígado, tanto do animal do grupo controle quanto daquele pertencente ao grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . A distribuição de Fe no fígado do grupo controle foi mais homogênea em relação ao grupo submetido ao tratamento com CNT, sendo que neste observou-se uma deposição maior de Fe na região central.

De acordo com a Figura 23, nas bioimagens obtidas para Mg e Mn foi possível observar a distribuição quase que homogênea destes elementos em toda a região analisada no fígado do animal do grupo controle. Entretanto, no fígado do animal tratado com  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , observou-se uma deposição maior destes elementos na parte central da região analisada. O Zn estava distribuído homogeneamente na região analisada em ambos os grupos, porém, observou-se um depósito maior na extremidade da região analisada no fígado do grupo controle. Com base na distribuição dos elementos no fígado dos ratos, foi possível verificar que houve diferença na distribuição de Fe, Mg e Mn no fígado do animal do grupo controle em relação ao fígado do animal submetido à maior dose de CNT. No entanto, apesar disto, não foi possível concluir se ocorreu alguma interferência na distribuição destes elementos em decorrência da administração dos CNTs, uma vez que foi analisada uma região específica do fígado e não o fígado todo.

Para a análise de biodistribuição dos elementos no rim, inicialmente, foi selecionado todo o órgão, sendo abscidas, aproximadamente, 140 linhas na amostra de ambos os grupos, com espaçamento de  $10 \mu\text{m}$  entre cada linha e diâmetro de feixe do laser de  $100 \mu\text{m}$ . O tempo total de medição das intensidades dos elementos monitorados nas amostras de rim, para obtenção das bioimagens, foi de, aproximadamente, 3 a 4 h. As imagens para as amostras de rim e as bioimagens de distribuição dos elementos obtidas por LA-ICP-MS, estão mostradas nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Imagens das amostras do rim do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Ca, (E) Cu e (G) Fe no rim do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Ca, (F) Cu e (H) Fe no rim do rato do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.

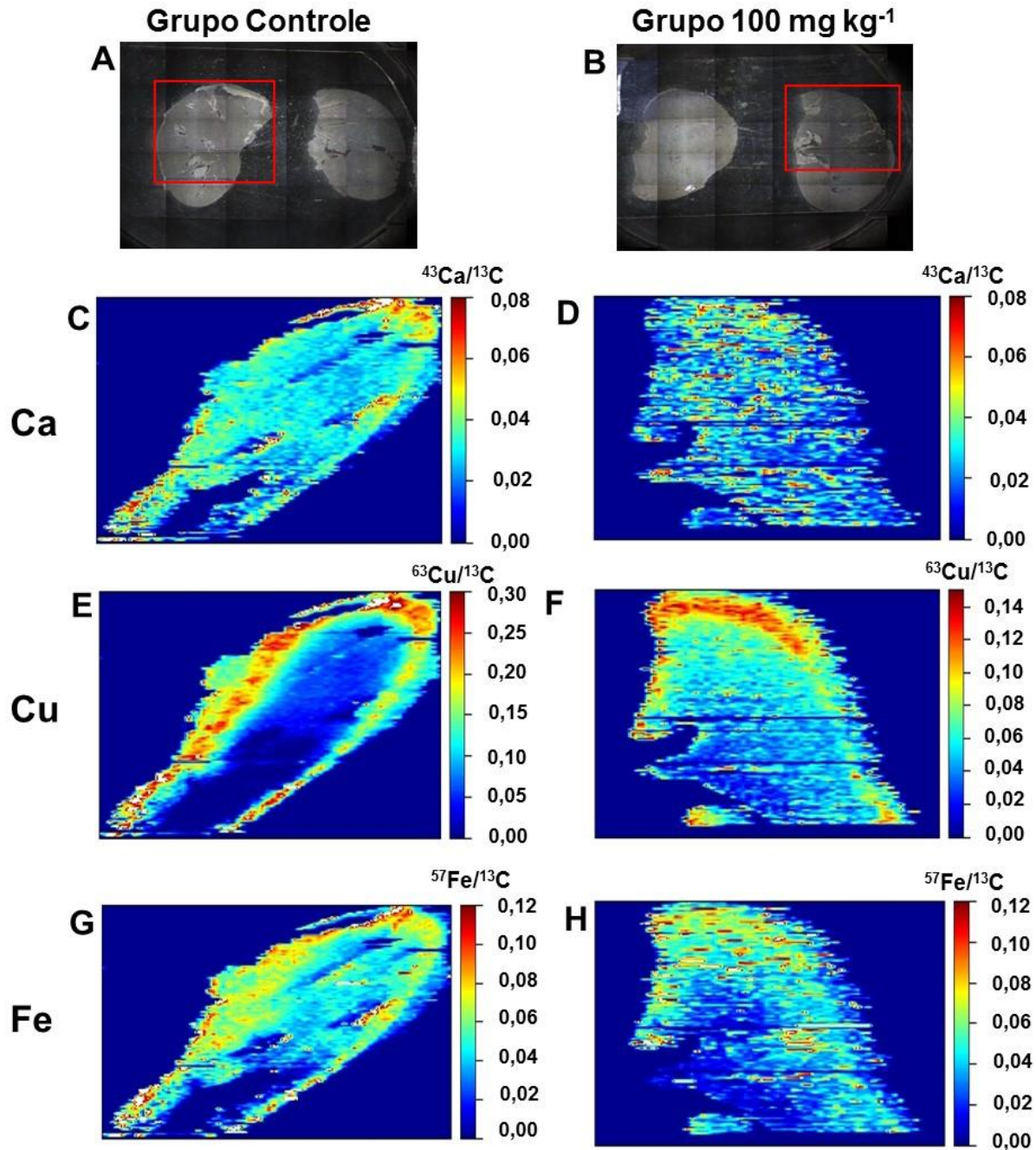
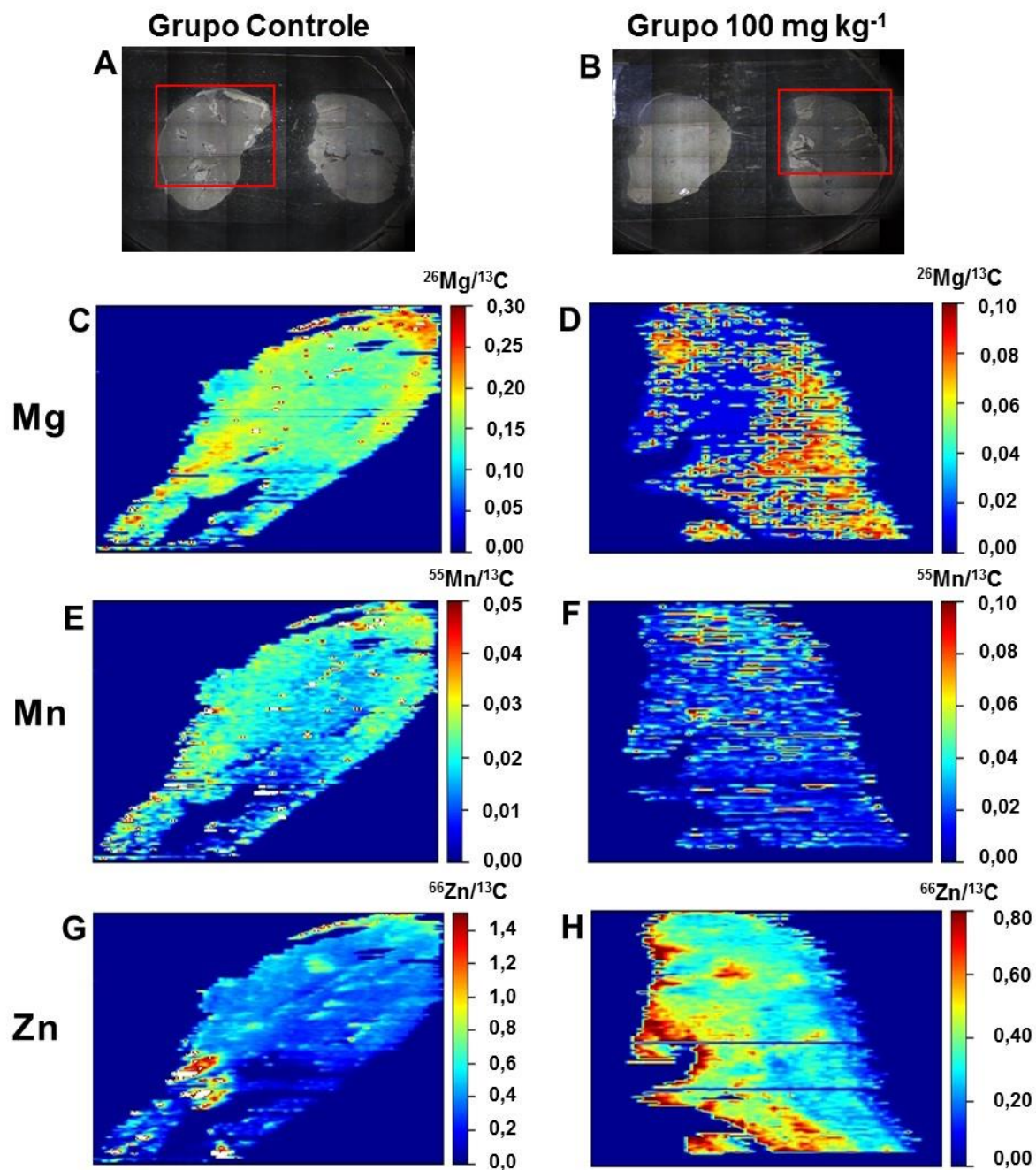


Figura 25 - Imagens das amostras do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Mg, (E) Mn e (G) Zn no rim do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Mg, (F) Mn e (H) Zn no rim do rato do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT.



Na Figura 24 observou-se que a região destacada não corresponde à toda região do tecido demarcada para análise e isto deve-se ao fato de que o sistema de LA parou de funcionar durante o processo, não sendo possível ablar todo o tecido. Com base nas bioimagens obtidas nas Figuras 24C e 24D, observou-se que o Ca encontrava-se distribuído quase que homogeneamente no rim dos ratos de ambos os grupos, sendo observado um depósito maior deste elemento nas extremidades do rim do rato do grupo controle. Para Cu e Fe, independente do grupo (Figuras 24E e F e 24G e H), verificou-se seu acúmulo nas extremidades da região analisada.

As bioimagens da distribuição de Mg, Mn e Zn no rim do rato do grupo controle e do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> estão mostradas na Figura 25. Para Mg e Mn (Figuras 25C e D e 25E e F, respectivamente) no rim dos ratos do grupo controle observou-se que estes se distribuíram de maneira mais homogênea quando comparado com o do tratamento de 100 mg kg<sup>-1</sup>. O Zn estava distribuído quase que homogeneamente, mas com acúmulo deste nas extremidades do rim do rato submetido ao tratamento com CNT. No rim do animal pertencente ao grupo controle, observou-se a deposição de Zn somente em uma região específica.

Dessa forma, com base na distribuição dos elementos nos rins dos ratos, foi possível afirmar que houve diferença na distribuição de Ca, Mg, Mn e Zn no rim do rato do grupo controle em relação ao rim do rato submetido ao tratamento com CNT. O rim é composto por milhares de unidades funcionais chamadas de néfrons, os quais auxiliam os rins a manter a homeostase dos fluidos corporais e eletrólitos, bem como são responsáveis por filtrar o sangue e eliminar as substâncias tóxicas encontradas no organismo (SHARIATGORJI *et al.*, 2016). Devido a estas funções, apesar de ter sido ablada apenas uma região do tecido, foi possível assumir que a diferença na distribuição de Ca, Mg, Mn e Zn, seja, provavelmente, consequência da administração dos CNTs.

A análise de biodistribuição dos elementos no baço foi feita selecionando todo o tecido, com um total de 85 e 100 linhas ablas no baço do rato pertencente ao grupo controle e naquele do rato pertencente ao grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O tempo total de medição das intensidades dos elementos monitorados nas amostras de baço, para obtenção das bioimagens, foi de, aproximadamente, 2 a 3 h. As imagens das amostras de baço e as bioimagens da distribuição dos elementos obtidas por LA-ICP-MS, estão mostradas nas Figuras 26 e 27.

Figura 26 - Imagens das amostras do baço do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Ca, (E) Cu e (G) Fe no baço do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Ca, (F) Cu e (H) Fe no baço do rato do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.

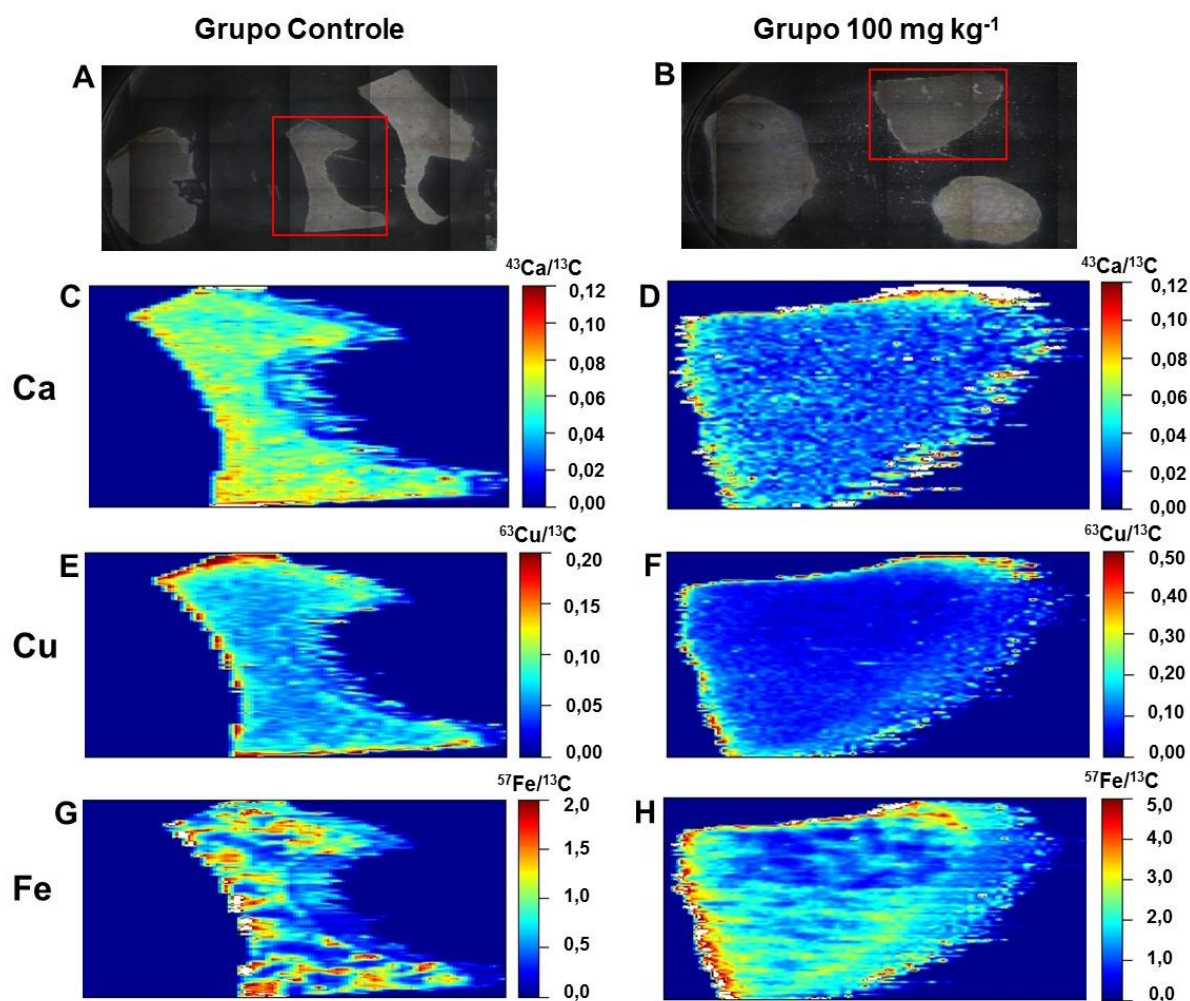
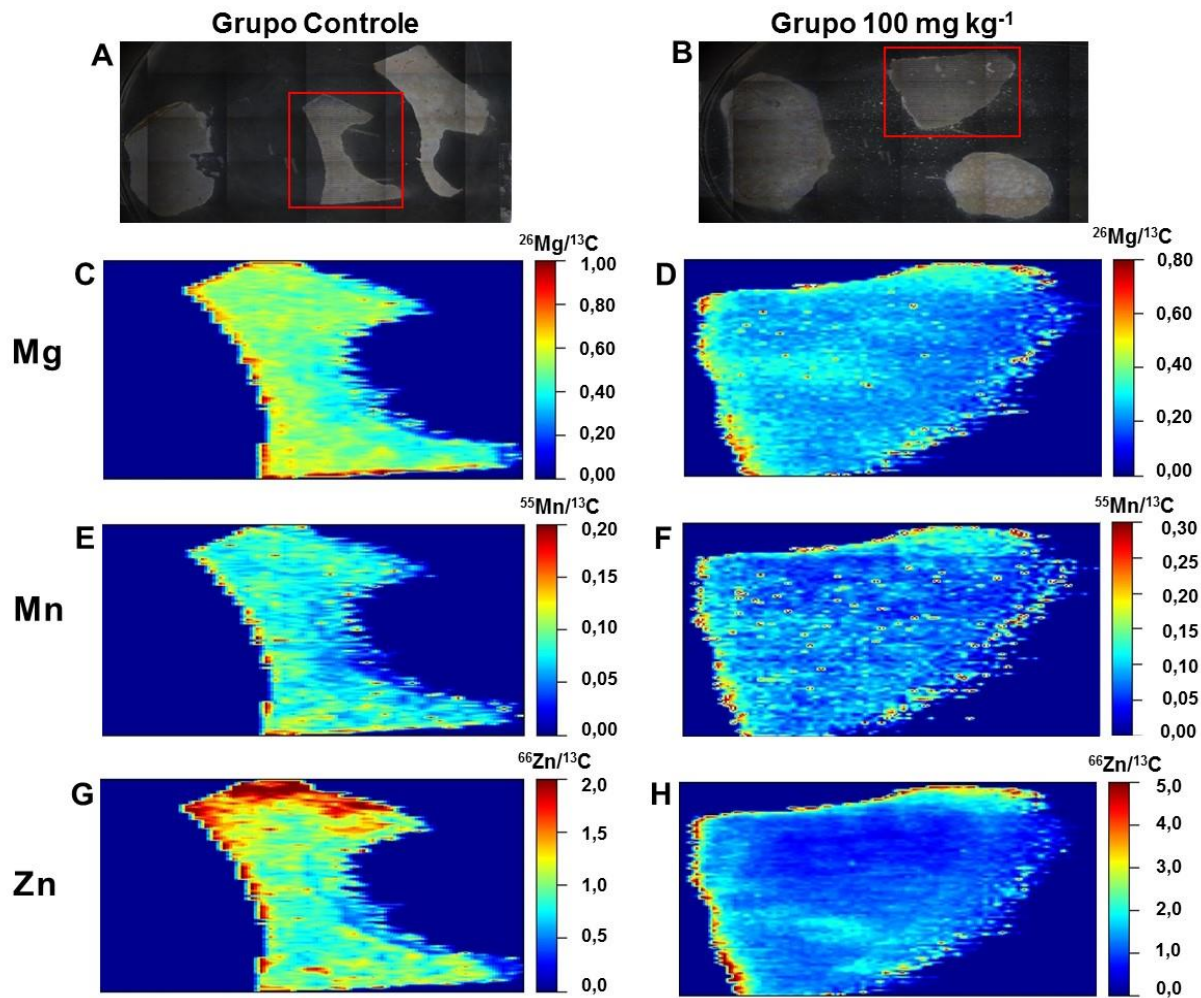


Figura 27 - Imagens das amostras do baço do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Mg, (E) Mn e (G) Zn no baço do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Mg, (F) Mn e (H) Zn no baço do rato do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.



Nas Figuras 26C e 26D, observou-se uma distribuição homogênea do Ca no baço dos ratos de ambos os grupos. O Cu estava distribuído quase que homogeneamente, porém, observou-se o seu depósito nas extremidades do baço dos ratos pertencentes a ambos os grupos. Na Figura 26H, verificou-se que o Fe estava distribuído homogeneamente e com depósito maior nas extremidades para o rato submetido ao tratamento com CNT. No entanto, observou-se que no baço do rato do grupo controle (Figura 26G), o Fe estava distribuído de maneira mais heterogênea, com deposição maior nas extremidades e na região central do baço analisado.

Nas bioimagens obtidas nas Figuras 27C e D e 27E e F observou-se que Mg e Mn estavam distribuídos quase que homogeneamente no baço do rato do grupo controle e naquele do rato pertencente ao grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup>. Verificou-se, ainda, que para ambos os grupos, houve um depósito maior destes elementos nas extremidades. Para Zn, houve uma deposição maior do elemento na extremidade superior do baço do rato do grupo controle em relação ao baço do rato tratado com CNT.

Levando em consideração a distribuição dos elementos no baço dos animais, observou-se que houve uma diferença na distribuição de Fe e Zn entre os ratos pertencentes aos grupos analisados. Isto pode estar associado à administração dos CNTs. No entanto, é importante destacar que, especificamente, para o Fe, a influência de sua distribuição pode ser afetada pelo processo de preparo das lâminas onde as seções das amostras foram fixadas, uma vez que na etapa de desidratação em uma solução tampão de formaldeído a 10% (v/v), pode ocorrer a passagem deste elemento para a solução. Dentre todos os órgãos dos animais investigados neste estudo, verificou-se, através da decomposição por MAWD-PDC e posterior determinação por ICP-OES, que o Fe estava presente em maior concentração no baço. Dessa forma, pelo fato deste órgão atuar como um filtro e reservatório de sangue, a manipulação do mesmo pode afetar os resultados obtidos para Fe. Neste caso, ressalta-se que só foi observada diferença na distribuição deste elemento na análise de biodistribuição por LA-ICP-MS, enquanto que não foi observada diferença na concentração de Fe no baço dos animais submetidos a tratamentos com CNTs em relação aqueles do grupo controle.

Por fim, foi feita a análise de biodistribuição dos elementos no pulmão dos animais. Para isto, foi selecionado todo o tecido, com um total de 51 e 68 linhas

abladas no pulmão do rato do grupo controle e no do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O tempo total de medição das intensidades dos elementos monitorados nas amostras de pulmão, para obtenção das bioimagens, foi de, aproximadamente, 2 h. As imagens das amostras de pulmão e as bioimagens para a análise de distribuição dos elementos obtidas por LA-ICP-MS, estão mostradas nas Figuras 28, 29 e 30.



Figura 28 - Imagens das amostras do pulmão do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Al, (E) Ca e (G) Cu no pulmão do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Al, (F) Ca e (H) Cu no pulmão do rato do do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.

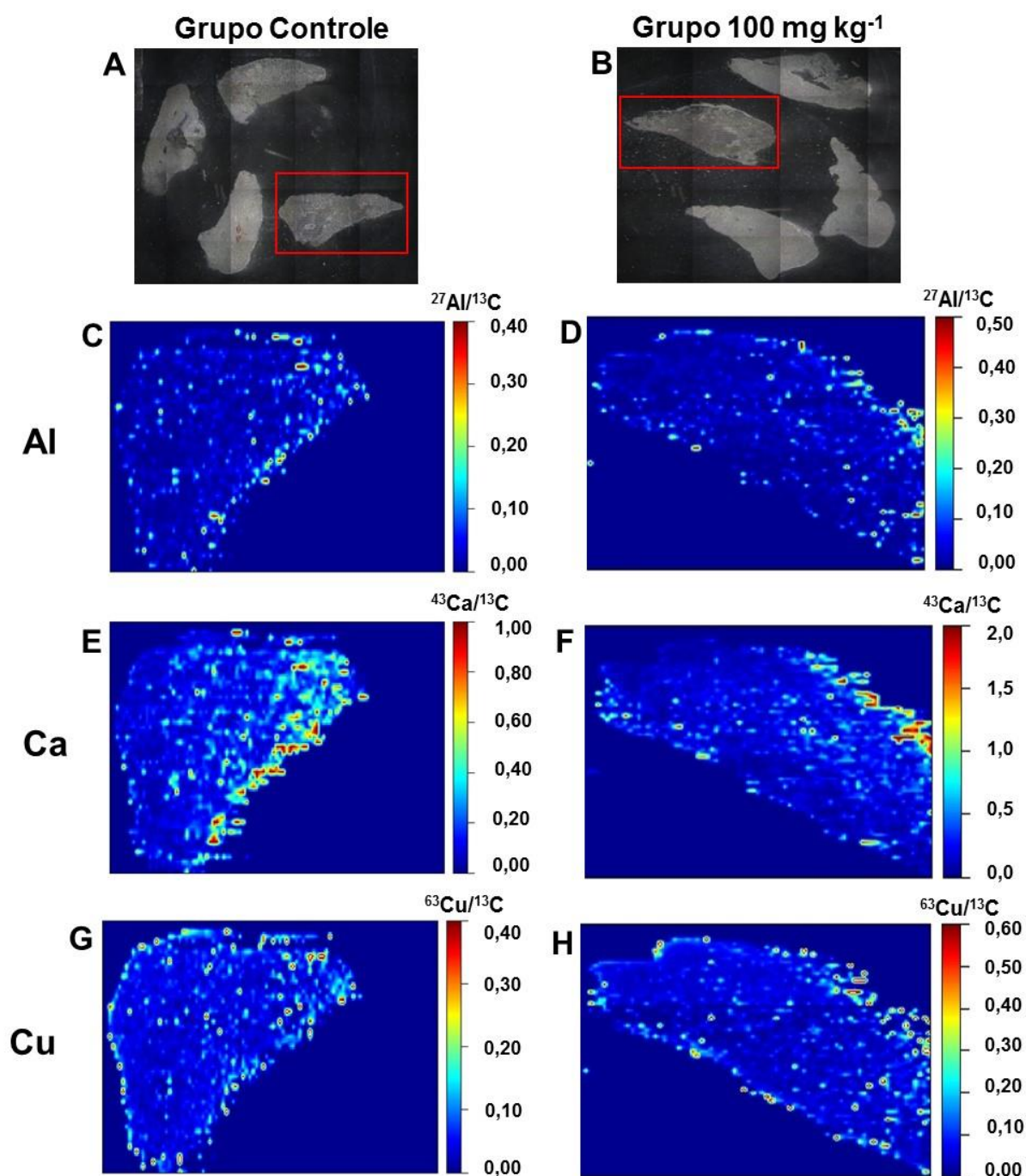


Figura 29 - Imagens das amostras do pulmão do rato do (A) grupo controle e (B) grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Fe, (E) Mg e (G) Mn no pulmão do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Fe, (F) Mg e (H) Mn no pulmão do rato do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de CNT.

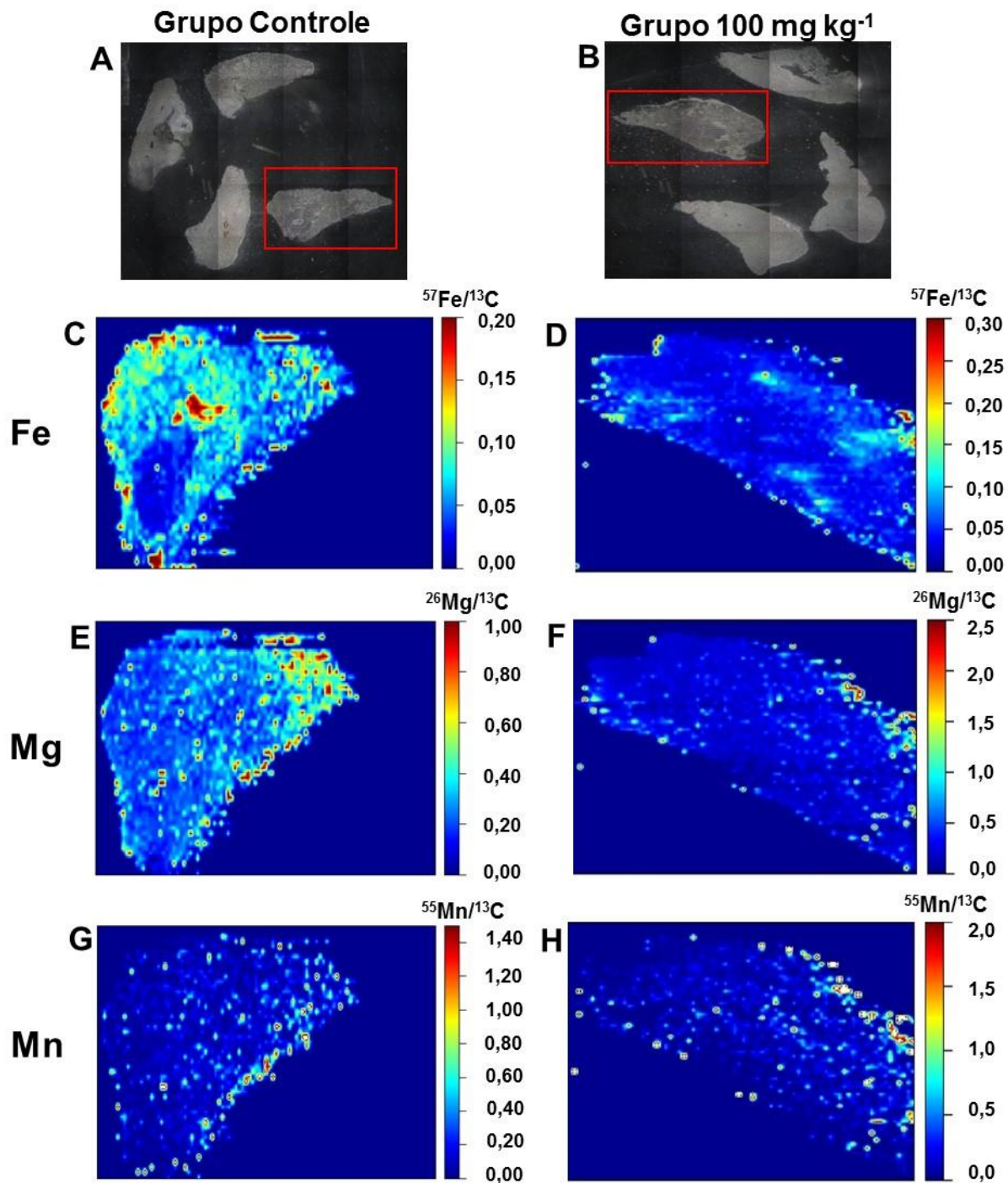
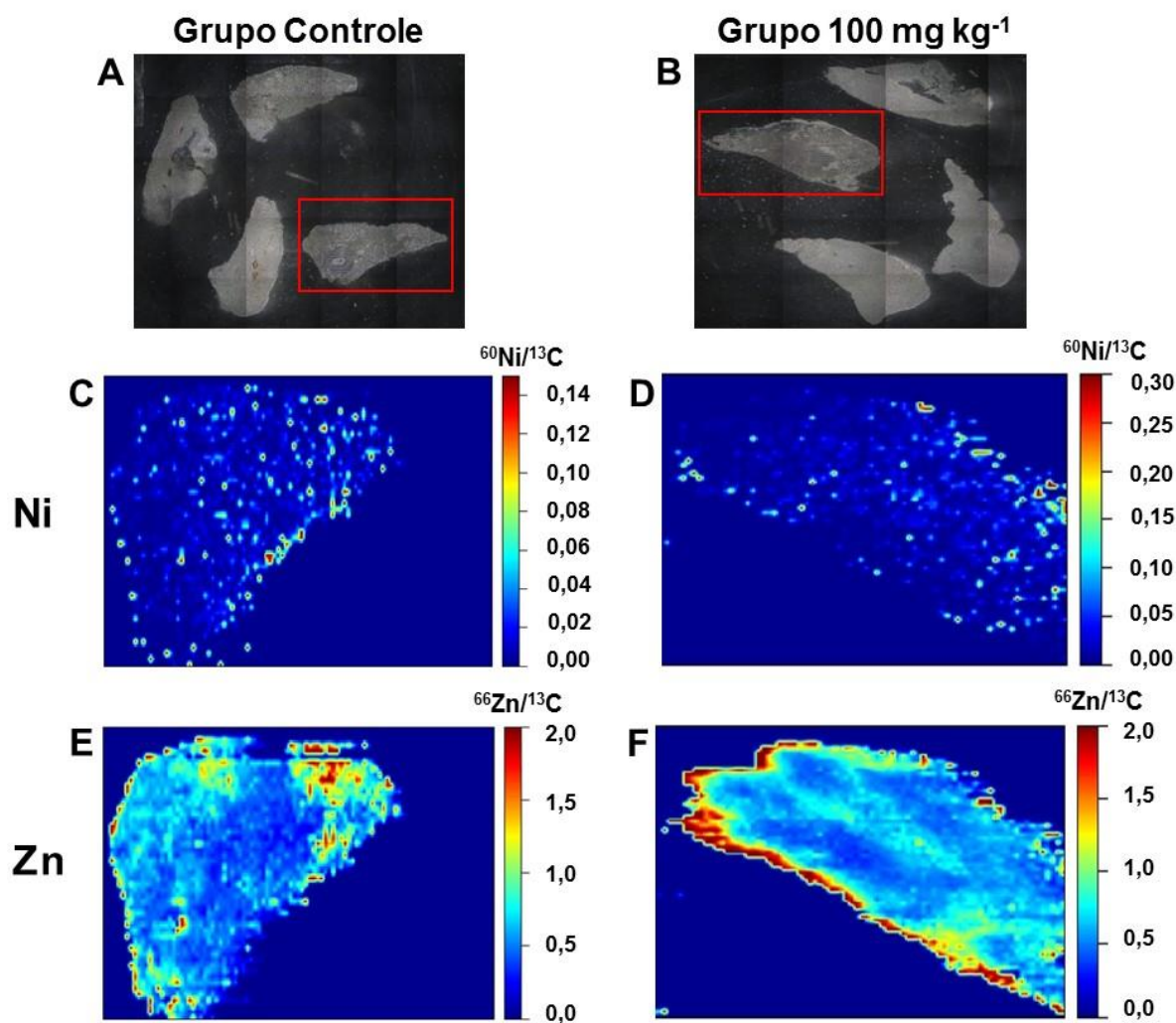


Figura 30 - Imagens das amostras do pulmão do rato do (A) grupo controle e (B) do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT. A região ablada está destacada em vermelho. Bioimagens da distribuição de (C) Ni e (E) Zn no pulmão do rato do grupo controle e bioimagens da distribuição de (D) Ni e (F) Zn no pulmão do rato do grupo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.



Na Figura 28 observou-se que o Al, Ca e Cu distribuíram-se de maneira semelhante no pulmão do rato pertencente ao grupo controle, com depósito maior de Ca e de Cu nas extremidades do pulmão dos ratos de ambos os grupos. De acordo com as bioimagens mostradas na Figura 29, verificou-se que Fe e Mg estavam distribuídos quase que homogêaneamente no pulmão do rato do grupo controle e do grupo submetido ao tratamento com CNT (Figuras 29C e D e 29E e F, respectivamente). No entanto, observou-se que houve um depósito maior de Fe nas extremidades e em uma região central específica do pulmão do rato do grupo controle, enquanto que para o Mg, observou-se um depósito maior deste elemento na extremidade superior direita do pulmão para o grupo controle. Para o Mn, verificou-se que este estava distribuído de maneira mais heterogênea e com deposição maior nas extremidades no pulmão de ambos os grupos. De acordo com as bioimagens obtidas nas Figuras 30C e 30D para Ni, foi possível observar que este elemento estava distribuído heterogêaneamente de maneira semelhante que no pulmão do rato do grupo controle e no do grupo de 100 mg kg<sup>-1</sup>. Para o Zn, verificou-se a sua distribuição em todo o órgão, com depósito nas extremidades do pulmão analisado, para ambos os grupos. Com base nas bioimagens obtidas da distribuição dos elementos no pulmão dos ratos, verificou-se que houve diferença na distribuição de Fe e Mg no pulmão do rato do grupo controle em relação ao pertencente ao grupo tratado com CNT.

De maneira geral, observou-se que para todos os tecidos dos órgãos analisados, foram obtidas bioimagens da distribuição dos elementos considerados macronutrientes, como o Ca e Mg, e micronutrientes como o Cu, Fe, Mn e Zn. Estes elementos são considerados essenciais e estão envolvidos em inúmeros processos fisiológicos em sistemas biológicos, atuando como componentes estruturais de moléculas maiores e biocatalisadores em diversos processos biológicos (SHARIATGORJI *et al.*, 2016). Destaca-se que apesar de terem sido observadas diferenças na distribuição de alguns elementos no rim, no baço e no pulmão, outros fatores, além da administração dos CNTs, também devem ser levados em consideração. Dentre estes, menciona-se a etapa de preparo das lâminas, na qual os tecidos são submetidos a um processo de desidratação, podendo levar à migração e/ou até contaminação de alguns elementos.

Adicionalmente, é importante ressaltar que ainda não há trabalhos relatados na literatura que investigam a aplicabilidade da LA-ICP-MS em tecidos de ratos

submetidos a tratamentos com CNTs. Dentre os tipos de nanomateriais, esta técnica tem sido aplicada para obtenção de imagens da distribuição de nanopartículas, como, por exemplo, NPs de Ag, Au e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em tecidos e células biológicas (BOHME *et al.*, 2015; MANAGH *et al.*, 2014; POZEBON, DRESSLER e SCHEFFLER, 2017). Nestes trabalhos, os autores mencionam as dificuldades da análise destes nanomateriais, devido à heterogeneidade das NPs em relação ao tamanho (POZEBON, DRESSLER e SCHEFFLER, 2017).

É importante ressaltar que o emprego da LA-ICP-MS para análise da distribuição de elementos em tecidos de ratos submetidos a tratamentos com CNTs requer uma atenção especial em relação ao local onde estes se concentram. Quando se investiga o uso desta técnica para análise de nanopartículas metálicas, como NPs de Au ou de Ag, por exemplo, busca-se a localização e/ou concentração destas através do monitoramento do metal em questão. No entanto, no presente estudo, a maneira indireta de verificar a presença de CNT nos tecidos dos animais, pelo monitoramento dos contaminantes inorgânicos presentes no mesmo, foi dificultada porque somente alguns poucos mg de amostra são removidos durante a ablação. Assim, dependendo da concentração do elemento, esta pode ficar abaixo do LOD.

Com base nas bioimagens da distribuição dos elementos nos tecidos dos animais investigados neste estudo e considerando os demais fatores citados anteriormente, além da administração dos CNTs, pode-se inferir que a técnica de LA-ICP-MS foi adequada para o estudo de biodistribuição proposto neste trabalho. Além disso, é importante salientar que uma vez demonstrada a distribuição dos elementos nos tecidos dos órgãos investigados, esta tem aplicação na área da biomedicina para melhor compreender os processos biológicos, bem como verificar rotas de acúmulo de substâncias não essenciais ao organismo como, por exemplo, os CNTs.

#### 4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICA

Para complementar o estudo, foram feitas análises bioquímicas para melhor compreensão da toxicidade do CNT utilizado neste estudo. O uso de marcadores bioquímicos, bem como indicadores gerais da saúde dos animais, tais como, distúrbios do comportamento, alteração na massa corporal e taxa de mortalidade,

são parâmetros de avaliação do potencial toxicológico de substâncias (AILLON *et al.*, 2009).

A possibilidade de interação dos CNTs com as proteínas pode afetar as atividades enzimáticas, levando assim a efeitos tóxicos. Dentre as enzimas monitoradas, destacam-se a alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST) e gama glutamil transpeptidase (GGT). Estas estão presentes no fígado e quando há alguma lesão nesse órgão, são liberadas para a corrente sanguínea. Deste modo, a análise destas fornece informações sobre o funcionamento do fígado e identifica possíveis lesões hepáticas (OZER *et al.*, 2008). Adicionalmente, a análise da creatinina e da uréia, presentes no soro sanguíneo, pode mensurar danos renais, uma vez que estas são filtradas no rim, o alto teor no soro significa que o rim possui dificuldade em eliminá-las.

Dessa forma, no presente estudo foi feita a avaliação de parâmetros bioquímicos como a análise de creatinina, ureia, GGT, ALT, AST em soro sanguíneo dos ratos do grupo controle e dos demais grupos pertencentes ao tratamento com CNTs. As análises foram realizadas em um laboratório de análises clínicas de Santa Maria. Os valores obtidos estão mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores bioquímicos séricos de ratos após 31 dias de tratamento com CNT, (n = 5).

Parâmetro	Controle	1 mg kg <sup>-1</sup>	10 mg kg <sup>-1</sup>	100 mg kg <sup>-1</sup>
Creatinina (mg dL <sup>-1</sup> )	0,380 ± 0,045	0,340 ± 0,089	0,360 ± 0,089	0,360 ± 0,055
Ureia (mg dL <sup>-1</sup> )	48,0 ± 3,4	46,6 ± 4,4	44,8 ± 6,0	44,4 ± 4,9
GGT (U L <sup>-1</sup> )	< 1	< 1	< 1	< 1
ALT (U L <sup>-1</sup> )	143 ± 42	174 ± 26	144 ± 22	148 ± 34
AST (U L <sup>-1</sup> )	54,0 ± 12,0	48,8 ± 7,6	56,2 ± 4,2	55,6 ± 5,7

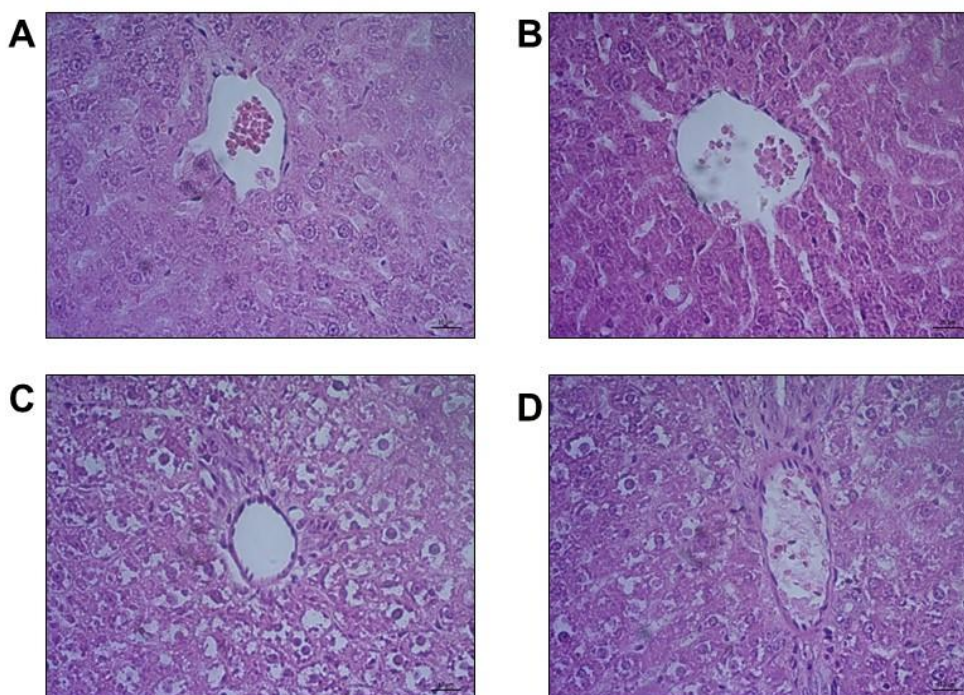
GGT, gama glutamil transpeptidase; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato transaminase.

Com base nos resultados mostrados na Tabela 12 foi possível observar que os níveis de creatinina e uréia dos animais do grupo controle não apresentaram diferenças (ANOVA) quando comparados com os dos grupos tratados com CNT. Para os demais parâmetros como ALT e AST, também não foram observadas diferenças (ANOVA) entre os animais do grupo controle e os animais que receberam tratamento. Os níveis de GGT, independente do grupo, foram menores que 1 U L<sup>-1</sup>.

Sendo assim, com base nas análises bioquímicas, não foram identificados danos renais e hepáticos com administração de diferentes concentrações de CNT até  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , durante 31 dias. Outros parâmetros bioquímicos foram avaliados no fígado, rim e soro sanguíneo dos animais. As análises foram feitas no Laboratório Enzitox do Departamento de Bioquímica da UFSM e, por simplificação, estão mostradas no Apêndice B.

A análise histológica foi realizada no fígado dos ratos submetidos ao estudo de toxicidade crônica de 31 dias após a exposição dos ratos a CNTs. A Figura 31, mostra a imagem obtida na análise histológica do fígado.

Figura 31 - Imagens microscópicas da análise histológica de fígado de ratos submetidos ao estudo de toxicidade crônica. (A) Grupo controle, (B) CNT  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , (C) CNT  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , e (D) CNT  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . (H&E 10X – Detalhes 40X).



Na Figura 31 foi possível observar que o fígado do rato controle e do rato submetido à administração da dose de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT apresentaram histologia normal com hepatócitos arranjados radialmente da veia central em direção à periferia do lóbulo. No entanto, no caso do fígado dos animais expostos às doses de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT, observou-se a degeneração hidrópica do órgão, caracterizada pela presença de hepatócitos amplos, com um citoplasma claro,

caracterizado pela presença de pequenos vacúolos pálidos e um núcleo normal em posição central. Com base nesta análise, foi possível verificar indícios de pequenas lesões hepáticas no fígado dos ratos submetidos ao tratamento de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.



## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que a determinação de metais em tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs possibilitou, de maneira indireta, a verificação do local onde os CNTs atuam ou se concentram. Para isso, a MAWD-PDC se mostrou adequada para a etapa de preparo de amostra, sendo demonstrada a importância desta para a exatidão dos resultados, já que uma decomposição incompleta pode levar a recuperação não quantitativa dos elementos uma vez que estes podem estar presentes dentro da estrutura dos CNTs. A análise de biodistribuição por LA-ICP-MS nos tecidos dos animais, também se mostrou adequada para o propósito do presente estudo, uma vez que permite observar a influência na distribuição dos elementos nos órgãos de ratos submetidos a tratamento com  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT em relação àqueles pertencente ao grupo controle.

No teste de toxicidade oral aguda, os CNTs mostraram não ser tóxicos quando administrados em ratas na dose máxima de  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corpóreo. De acordo com a análise histológica do fígado, as doses de  $300$  e  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  causaram pequenas lesões hepáticas, enquanto que os demais órgãos analisados apresentaram histologia normal. A administração oral de CNTs, para avaliação de toxicidade crônica, não provocou alterações significativas em parâmetros bioquímicos no soro sanguíneo dos ratos do grupo controle e dos demais grupos pertencentes aos tratamentos com CNTs. Não foram observadas alterações comportamentais nos animais e outros aspectos visuais, como perda de pelo e perda de massa corporal.

Dentre os métodos de preparo de amostras, investigou-se, primeiramente, a viabilidade da digestão ácida por aquecimento convencional em sistema aberto empregando bloco digestor, uma vez que este é o método de preparo de amostra mais difundido entre os laboratórios para decomposição de tecidos biológicos. Empregando  $4 \text{ mL}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado e  $2 \text{ mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% como solução digestora e um programa de aquecimento a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 horas, foi possível verificar que o método de digestão ácida em sistema aberto empregando bloco digestor foi adequado somente para a decomposição de tecidos animais, mas não pode ser usado para a decomposição de CNTs. Dessa forma, este foi considerado como inadequado para o objetivo do estudo que visa a decomposição de tecidos, fluidos e

pelos dos animais, contendo CNTs.

A MAWD-PDC foi investigada para decomposição de tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs empregando 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% como solução de decomposição e um programa constituído de *i*) 25 min a 180 °C (10 min de rampa) e *ii*) 40 min a 270 °C (5 min de rampa). A avaliação da exatidão do método para decomposição dos tecidos foi verificada através da decomposição de um material de referência de fígado bovino juntamente com as amostras de fígado bovino e frango, usadas para simular os tecidos dos ratos diante da indisponibilidade de consumir as amostras para essas investigações prévias, e foram observadas recuperações adequadas (90 a 127%). Na avaliação da exatidão do método para decomposição de CNT foi verificado que os resultados obtidos utilizando 275 mg de CNT, para decomposição por MAWD-PDC, não apresentaram diferença (teste *t-student*) quando comparados com aqueles obtidos pelo método de referência (MAWD-SRC). Os valores obtidos através da decomposição por MAWD-PDC utilizando 275 mg de CNT e posterior determinação dos elementos, foram utilizados como valores de referência, uma vez que tendo o conhecimento da concentração dos contaminantes inorgânicos presentes no CNT administrado nos ratos, é possível inferir, indiretamente, onde os CNTs se concentram por meio do controle da concentração de cada elemento nos tecidos. Com base na avaliação da influência da massa de tecido animal a ser decomposta e na eficiência da decomposição de CNT, o método da MAWD-PCD foi considerado adequado para a decomposição de tecidos, fluidos e pelos dos animais submetidos a tratamentos com CNTs no estudo de toxicidade crônica.

De maneira geral, foram observadas diferenças nos resultados obtidos para Ni na decomposição do fígado, coração, pulmão e nas fezes dos animais pertencentes aos grupos dos animais tratados com CNT em relação ao grupo controle. Apesar da discrepância nos valores obtidos para a concentração de Ni, foi possível verificar que, mesmo em baixa concentração em relação aquela presente no CNT (aproximadamente 2%, sendo este elemento considerado o catalisador utilizado no processo síntese do CNT), houve a absorção em tecidos específicos de somente alguns poucos animais tratados com CNT. Dessa forma, para uma avaliação mais abrangente, seria necessário um número maior de ratos ( $n > 10$  para cada grupo) submetidos ao estudo.

Para todos os tecidos dos órgãos analisados por LA-ICP-MS, em geral, foram

obtidas as bioimagens da distribuição dos elementos considerados macronutrientes, como o Ca e Mg, e micronutrientes como o Cu, Fe, Mn e Zn. Destaca-se que apesar de terem sido observadas diferenças na distribuição de alguns elementos no rim, baço e no pulmão, outros fatores, além da administração dos CNTs também devem ser levados em consideração como, por exemplo, a etapa de preparo das lâminas. Com base nas bioimagens de distribuição dos elementos nos tecidos dos animais investigados neste estudo e considerando que ainda não há trabalhos publicados sobre o assunto, pode-se inferir que a técnica de LA-ICP-MS foi adequada para o estudo de biodistribuição, como proposto neste trabalho, contribuindo, assim, para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dos CNTs.

Em relação às análises bioquímicas, destaca-se que não foram observadas alterações significativas nos parâmetros avaliados no soro sanguíneo dos ratos do grupo controle e dos demais grupos pertencentes aos tratamentos com CNTs. Na análise histológica do fígado dos animais submetidos ao estudo de toxicidade crônica, observaram-se indícios de pequenas lesões hepáticas no fígado dos ratos submetidos ao tratamento de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de CNT.

Dessa forma, considerando todas as informações obtidas, verificou-se possíveis efeitos tóxicos causados pela administração de CNT. Assim, para uma melhor compreensão destes efeitos, é desejável que seja feito um estudo de toxicidade crônica por um período de tempo maior, de no mínimo 90 dias, e com um número maior de ratos por grupo. É importante destacar que o conjunto de informações dos possíveis efeitos tóxicos observados, é restrito apenas ao CNT utilizado neste estudo (CNT funcionalizado com grupo  $-\text{OH}$ ) para doses de até  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . Isto deve-se ao fato de que a toxicidade dos CNTs pode variar devido à diferença no tamanho, na morfologia, na estrutura, na pureza obtida na síntese e na purificação, no tipo e na quantidade de impurezas metálicas, bem como em função do método de funcionalização que estes podem ser submetidos.



## REFERÊNCIAS

- AILLON, K. L. *et al.* Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 457-466, 2009.
- ALSHEHRI, R. *et al.* Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 18, p. 8149-8167, 2016.
- AWASTHI, K. K. *et al.* Multi walled carbon nano tubes induced hepatotoxicity in Swiss albino mice. **Micron**, v. 44, p. 359-364, 2013.
- AYOUNI-DEROUCHE, L. *et al.* Development of efficient digestion procedures for quantitative determination of cobalt and molybdenum catalyst residues in carbon nanotubes. **Carbon**, v. 80, p. 59-67, 2014.
- BARIN, J. S. *et al.* Métodos de preparo de amostras para análise elementar: **Decomposição de materiais orgânicos por via úmida**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2016.
- BASSYOUNI, M. *et al.* Utilization of carbon nanotubes in removal of heavy metals from wastewater: a review of the CNTs' potential and current challenges. **Applied Physics A**, v. 126, n. 1, p. 38, 2019.
- BERTI, L. A.; PORTO, L. M. **Nanossegurança: Guia de boas práticas em nanotecnologia para fabricação e laboratórios**. São Paulo: Cengage Learning, 2016.
- BIZZI, C. A. *et al.* Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 2, p. 332-338, 2014.
- BIZZI, C. A. *et al.* Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical Methods**, v. 2, n. 6, p. 734-738, 2010.
- BIZZI, C. A. *et al.* Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O<sub>2</sub> pressure. **Analytica Chimica Acta**, v. 837, p. 16-22, 2014.
- BOHME, S. *et al.* Exploring LA-ICP-MS as a quantitative imaging technique to study nanoparticle uptake in *Daphnia magna* and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 18, p. 5477-5485, 2015.
- CHEN, B. *et al.* Integration of sub-organ quantitative imaging LA-ICP-MS and fractionation reveals differences in translocation and transformation of CeO<sub>2</sub> and Ce<sup>3+</sup> in mice. **Analytica Chimica Acta**, v. 1082, p. 18-29, 2019.
- CHEN, L. *et al.* Toxicological Evaluation of Graphene-Family Nanomaterials. **J**

**Nanosci Nanotechnol**, v. 20, n. 4, p. 1993-2006, 2020.

CHERUKURI, P. *et al.* Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 50, p. 18882-18886, 2006.

DENG, X. *et al.* Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. **Carbon**, v. 45, n. 7, p. 1419-1424, 2007.

DESOUZA, E. D. *et al.* Characterization of the depth distribution of Ca, Fe and Zn in skin samples, using synchrotron micro-x-ray fluorescence (SmuXRF) to help quantify in-vivo measurements of elements in the skin. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 77, p. 68-75, 2013.

DOMAGAŁA, K. *et al.* Purification and functionalisation of multi-walled carbon nanotubes. **Materials Letters**, v. 253, p. 272-275, 2019.

DRESSLER, V. L. *et al.* Investigative Analysis of Lanthanum Oxide Nanoparticles on Elements in Bone of Wistar Rats After 30 Days of Repeated Oral Administration. **Biological Trace Elemental Research**, 2019.

DVASH, R. *et al.* Structural profiling and biological performance of phospholipid-hyaluronan functionalized single-walled carbon nanotubes. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 2, p. 295-305, 2013.

ELGRABLI, D. *et al.* Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes. **Toxicology**, v. 253, n. 1, p. 131-136, 2008.

ENDERS, M. S. P., Krzyzaniak, S. R., Mortari, S. R., Mello, P. A., Müller, E. I. Identification of metallic impurities in carbon nanotubes using FEG scanning electron microscopy and determination by energy-dispersive X-ray spectrometry. In: IX Congresso de Microscopia dos Materiais, 2016, Belo Horizonte., 2016.

ERDELY, A. *et al.* Cross-Talk between Lung and Systemic Circulation during Carbon Nanotube Respiratory Exposure. Potential Biomarkers. **Nano Letters**, v. 9, n. 1, p. 36-43, 2009.

F. DURRANT, S. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, n. 9, p. 1385-1403, 1999.

FERNANDES, M. R.; PEDROSO, A. R. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, p. 923-928, 2017.

FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 1, n. 1, p. 60-66, 1992.

FOLKMANN, J. K. *et al.* Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. **Environmental health**

**perspectives**, v. 117, n. 5, p. 703-708, 2009.

FRACZEK, A. *et al.* Comparative in vivo biocompatibility study of single- and multi-wall carbon nanotubes. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 6, p. 1593-1602, 2008.

GE, C. *et al.* Quantitative Analysis of Metal Impurities in Carbon Nanotubes: Efficacy of Different Pretreatment Protocols for ICPMS Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9426-9434, 2008.

GONZALEZ, M. H. *et al.* Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 396-401, 2009.

GRAS, L.; HERNANDIS, V.; MORA, J. Elemental matrix effects in ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, p. 142-169, 2002.

GRINBERG, P. *et al.* Comparison of sample digestion techniques for the determination of trace and residual catalyst metal content in single-wall carbon nanotubes by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 105, n. 0, p. 89-94, 2015.

GRINDLAY, G. *et al.* Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 2, p. 234-243, 2008.

GÜNTHER, D.; HATTENDORF, B. Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 255-265, 2005.

GUO, J. *et al.* Biodistribution of functionalized multiwall carbon nanotubes in mice. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 34, n. 5, p. 579-583, 2007.

GUSAIN, R.; KUMAR, N.; RAY, S. S. Recent advances in carbon nanomaterial-based adsorbents for water purification. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 405, p. 213111, 2020.

HALL, J. B. *et al.* Characterization of nanoparticles for therapeutics. **Nanomedicine**, v. 2, n. 6, p. 789-803, 2007.

HAN, S. G.; ANDREWS, R.; GAIROLA, C. G. Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes. **Inhalation Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 340-347, 2010.

HANĆ, A. *et al.* Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in quantitative analysis and imaging of plant's thin sections. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 363, p. 16-22, 2014.

HOU, P.-X.; LIU, C.; CHENG, H.-M. Purification of carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 15, p. 2003-2025, 2008.

HSIEH, Y.-K. *et al.* Using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to characterize the biointeractions of inhaled CdSe quantum dots in the

mouse lungs. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 9, p. 1396-1401, 2013.

HSIEH, Y. K. *et al.* Using laser ablation/inductively coupled plasma mass spectrometry to bioimage multiple elements in mouse tumors after hyperthermia. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 3, p. 909-915, 2011.

IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991.

ISMAIL, A. *et al.* A review of purification techniques for carbon nanotubes. **Nano**, v. 03, p. 127-143, 2008.

ITO, Y. *et al.* Effect of fiber length of carbon nanotubes on the absorption of erythropoietin from rat small intestine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1, p. 357-360, 2007.

Jl, Z. *et al.* The hepatotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in mice. **Nanotechnology**, v. 20, n. 44, p. 445101, 2009.

KAMALY, N. *et al.* Imaging of Gadolinium Spatial Distribution in Tumor Tissue by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Molecular Imaging and Biology**, v. 12, n. 4, p. 361-366, 2010.

KING, T.; SHERIDAN, R. Determination of 27 Elements in Animal Feed by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. **Journal AOAC International**, v. 102, n. 2, p. 434-444, 2019.

KO, F.-H. *et al.* Purification of multi-walled carbon nanotubes through microwave heating of nitric acid in a closed vessel. **Carbon**, v. 43, n. 4, p. 727-733, 2005.

KOLOSNAJ-TABI, J. *et al.* In vivo behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. **ACS Nano**, v. 4, n. 3, p. 1481-1492, 2010.

KOYAMA, S. *et al.* In vivo immunological toxicity in mice of carbon nanotubes with impurities. **Carbon**, v. 47, n. 5, p. 1365-1372, 2009.

KRZYZANIAK, S. R. Determinação de contaminantes inorgânicos em nanotubos de carbono por ICP-OES e ICP-MS. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS., 2016.

KRZYZANIAK, S. R. *et al.* Determination of inorganic contaminants in carbon nanotubes by plasma-based techniques: Overcoming the limitations of sample preparation. **Talanta**, v. 192, p. 255-262, 2019.

KUMAR, V.; SHARMA, N.; MAITRA, S. S. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. **International Nano Letters**, v. 7, n. 4, p. 243-256, 2017.

LAM, C. W. *et al.* Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and



90 days after intratracheal instillation. **Toxicological Sciences**, v. 77, n. 1, p. 126-134, 2004.

LECLERCQ, A. *et al.* Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: a tutorial review. Part I. Theoretical considerations. **Analytica Chimica Acta**, v. 885, p. 33-56, 2015.

LI, Q. *et al.* Elemental bio-imaging of PEGylated NaYF<sub>4</sub>:Yb/Tm/Gd upconversion nanoparticles in mice by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to study toxic side effects on the spleen, liver and kidneys. **Metallomics**, v. 9, n. 8, p. 1150-1156, 2017.

LI, Q. *et al.* Imaging gold nanoparticles in mouse liver by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2965, 2017.

LI, R. *et al.* Surface Charge and Cellular Processing of Covalently Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes Determine Pulmonary Toxicity. **ACS Nano**, v. 7, n. 3, p. 2352-2368, 2013.

LIM, J.-H.; BAIRI, V. G.; FONG, A. Quantification of impurities in carbon nanotubes: Development of ICP-MS sample preparation methods. **Materials Chemistry and Physics**, v. 198, p. 324-330, 2017.

LIMBECK, A. *et al.* Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 22, p. 6593-6617, 2015.

LIU, J.; HARRIS, A. T. Microwave-assisted acid digestion of alumina-supported carbon nanotubes. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 602-608, 2008.

LIU, Z. *et al.* Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1410-1415, 2008.

MA-HOCK, L. *et al.* Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. **Toxicological Sciences**, v. 112, n. 2, p. 468-481, 2009.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause, alimentos, nutrição & dietoterapia**. editora roca, 2005.

MAI, F.-D. *et al.* Imaging of single liver tumor cells intoxicated by heavy metals using ToF-SIMS. **Applied Surface Science**, v. 252, n. 19, p. 6809-6812, 2006.

MANAGH, A. J. *et al.* Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry: an emerging technology for detecting rare cells in tissue sections. **Journal of Immunology**, v. 193, n. 5, p. 2600-2608, 2014.

MCDEVITT, M. R. *et al.* PET Imaging of Soluble Yttrium-86-Labeled Carbon Nanotubes in Mice. **PLOS ONE**, v. 2, n. 9, p. e907, 2007.

MELLO, P. A. *et al.* Determination of metal impurities in carbon nanotubes by direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1040-1049, 2011.

MILISZKIEWICZ, N.; WALAS, S.; TOBIASZ, A. Current approaches to calibration of LA-ICP-MS analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 2, p. 327-338, 2015.

MOHAMMADI, E. *et al.* The effects of functionalization of carbon nanotubes on toxicological parameters in mice. **Human & Experimental Toxicology**, p. 1-21, 2020.

MORAES, D. P. d. *et al.* Métodos de preparo de amostras para análise elementar: **Preparo de amostra assistido por radiação micro-ondas** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2016.

MORTARI, S. R. *et al.* Fast Digestion Procedure for Determination of Catalyst Residues in La- and Ni-Based Carbon Nanotubes. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 10, p. 4298-4303, 2010.

MULLER, J. *et al.* Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 3, p. 221-231, 2005.

MURPHY, F. A. *et al.* Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 6, p. 2587-2600, 2011.

NTF. A Report of the U.S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force. NTF. A Report of the U.S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force., 2007. Disponível Acesso em: 27/04.

NUNES, M. A. G. *et al.* External calibration strategy for trace element quantification in botanical samples by LA-ICP-MS using filter paper. **Analytica Chimica Acta**, v. 905, p. 51-57, 2016.

OECD. **Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**. 2008.

OZER, J. *et al.* The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.

PARK, E.-J. *et al.* Toxic response of HIPCO single-walled carbon nanotubes in mice and RAW264.7 macrophage cells. **Toxicology Letters**, v. 229, n. 1, p. 167-177, 2014.

PATLOLLA, A. K.; BERRY, A.; TCHOUNWOU, P. B. Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss-Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1, p. 189-199, 2011.

PATLOLLA, A. K. *et al.* Cytogenetic evaluation of functionalized single-walled carbon

nanotube in mice bone marrow cells. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 9, p. 1091-1102, 2016.

PATOLE, S. P. *et al.* An evaluation of microwave-assisted fusion and microwave-assisted acid digestion methods for determining elemental impurities in carbon nanostructures using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 148, p. 94-100, 2016.

PAUL, B. *et al.* Visualising mouse neuroanatomy and function by metal distribution using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging. **Chemical Science**, v. 6, n. 10, p. 5383-5393, 2015.

PEREIRA, J. S. F. *et al.* Microwave-induced combustion of carbon nanotubes for further halogen determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 8, p. 1268-1274, 2010.

PIETROIUSTI, A. *et al.* Low Doses of Pristine and Oxidized Single-Wall Carbon Nanotubes Affect Mammalian Embryonic Development. **ACS Nano**, v. 5, n. 6, p. 4624-4633, 2011.

POLAND, C. A. *et al.* Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 7, p. 423-428, 2008.

PORTER, D. W. *et al.* Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. **Toxicology**, v. 269, n. 2-3, p. 136-147, 2010.

POZEBON, D.; DRESSLER, V.; SCHEFFLER, G. Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: A follow-up review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, 2017.

POZEBON, D. *et al.* Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 12, p. 2204-2228, 2014.

PRAJAPATI, S. K. *et al.* Biomedical applications and toxicities of carbon nanotubes. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-16, 2020.

PUGH, J. A. *et al.* Elemental imaging of MRI contrast agents: benchmarking of LA-ICP-MS to MRI. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 6, p. 1641-1649, 2012.

PUMERA, M. Carbon Nanotubes Contain Residual Metal Catalyst Nanoparticles even after Washing with Nitric Acid at Elevated Temperature Because These Metal Nanoparticles Are Sheathed by Several Graphene Sheets. **Langmuir**, v. 23, n. 11, p. 6453-6458, 2007.

PUNSHON, T. *et al.* Application of Synchrotron X-Ray Microbeam Spectroscopy to the Determination of Metal Distribution and Speciation in Biological Tissues.

**Spectroscopy Letters**, v. 38, n. 3, p. 343-363, 2005.

RESANO, M. *et al.* Simultaneous determination of Co, Fe, Ni and Pb in carbon nanotubes by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 657-665, 2013.

SAMIEI, F. *et al.* Toxicity of multi-wall carbon nanotubes inhalation on the brain of rats. **Environmental Science and Pollution Research**, 2020.

SATO, Y. *et al.* Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. **Molecular Biosystems**, v. 1, n. 2, p. 176-182, 2005.

SCHARLACH, C. *et al.* LA-ICP-MS Allows Quantitative Microscopy of Europium-Doped Iron Oxide Nanoparticles and is a Possible Alternative to Ambiguous Prussian Blue Iron Staining. **Journal Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 5, p. 1001-1010, 2016.

SHAH, K. A.; TALI, B. A. Synthesis of carbon nanotubes by catalytic chemical vapour deposition: A review on carbon sources, catalysts and substrates. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 41, p. 67-82, 2016.

SHARIATGORJI, M. *et al.* Direct imaging of elemental distributions in tissue sections by laser ablation mass spectrometry. **Methods**, v. 104, p. 86-92, 2016.

SHINOHARA, N. *et al.* Long-term retention of pristine multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 36, n. 4, p. 501-509, 2016.

SINGH, R. *et al.* Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 9, p. 3357-3362, 2006.

SOUZA FILHO, A. G. d.; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de Carbono. **Química Nova**, v. 30, p. 1695-1703, 2007.

STEFANO, J. S. *et al.* Electrochemical detection of 2,4,6-trinitrotoluene on carbon nanotube modified electrode: Effect of acid functionalization. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 1, p. 121-129, 2020.

STEFANO, J. S. *et al.* Highly sensitive amperometric detection of drugs and antioxidants on non-functionalized multi-walled carbon nanotubes: Effect of metallic impurities? **Electrochimica Acta**, v. 240, p. 80-89, 2017.

TAMURA, M. *et al.* A determination method of pristine multiwall carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation exposure by combustive oxidation-nondispersive infrared analysis. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 802-808, 2011.

TASIS, D. *et al.* Chemistry of Carbon Nanotubes. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 1105-1136, 2006.

TROJANOWICZ, M. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 480-489, 2006.

VAN ZANDWIJK, N.; FRANK, A. L. Potential toxicities of carbon nanotubes: time for a reminder. **Expert Review of Respiratory Medicine**, p. 1-2, 2020.

WEHE, C. A. *et al.* Elemental Bioimaging by Means of Fast Scanning Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 26, n. 8, p. 1274-1282, 2015.

WIEMANN, M. *et al.* Silver Nanoparticles in the Lung: Toxic Effects and Focal Accumulation of Silver in Remote Organs. **Nanomaterials**, v. 7, p. 441, 2017.

YAHYAZADEH, A.; KHOSHANDAM, B. Carbon nanotube synthesis via the catalytic chemical vapor deposition of methane in the presence of iron, molybdenum, and iron–molybdenum alloy thin layer catalysts. **Results in Physics**, v. 7, p. 3826-3837, 2017.

YANG, K. X. *et al.* Evaluation of sample pretreatment methods for multiwalled and single-walled carbon nanotubes for the determination of metal impurities by ICPMS, ICPOES, and instrument neutron activation analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 8, p. 1290-1297, 2010.

YANG, S.-t. *et al.* Biodistribution of Pristine Single-Walled Carbon Nanotubes In Vivo. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 48, p. 17761-17764, 2007.

ZEISLER, R. *et al.* Elemental analysis of a single-wall carbon nanotube candidate reference material. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 1, p. 509-517, 2011.

ZHANG, D. *et al.* Long-term hepatotoxicity of polyethylene-glycol functionalized multi-walled carbon nanotubes in mice. **Nanotechnology**, v. 21, n. 17, p. 175101, 2010.



## APÊNDICE A

### CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR DA RAÇÃO PARA ROEDORES

Em caráter de informação complementar, foi avaliado o teor de contaminantes na ração utilizada para a nutrição dos ratos. Para a digestão da ração dos ratos por via úmida (MAWD), foi utilizado um forno de micro-ondas (MultiWave 3000®, Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Áustria, [www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com)), equipado com 16 frascos de politetrafluoretileno (PTFE) modificado, com capacidade individual de 100 mL. As condições máximas de temperatura, pressão e potência permitidas pelo fabricante são de 210 °C, 40 bar e 1400 W, respectivamente.

As condições experimentais foram adaptadas de um trabalho publicado na literatura (KING e SHERIDAN, 2019). Para esta caracterização, optou-se por não utilizar o método oficial 935.13 da AOAC, tendo em vista que o mesmo recomenda a utilização de HClO<sub>4</sub>. Para este procedimento, 250 mg de ração foram transferidos ao frasco de decomposição e foram adicionados 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após, os frascos foram fechados, alocados no rotor e levados ao interior da cavidade do forno. Em seguida, a mistura foi submetida a um programa de irradiação de *i*) 400 W por 20 min (10 min de rampa); *ii*) 900 W por 35 min (15 min de rampa) e 0 W por 20 min. Ao final, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno (50 mL) e avolumados com água ultrapura a 20 mL. A determinação dos elementos foi feita por ICP-OES e os resultados estão mostrados na Tabela A1.

Tabela A1 - Resultados obtidos por ICP-OES para contaminantes inorgânicos em ração para roedores (valores em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=3$ , média  $\pm$  desvio padrão).

Analitos	MAWD*
Al	135 $\pm$ 16
As	< 3,16
Ca	8385 $\pm$ 824
Cd	< 0,400
Co	1,49 $\pm$ 0,13
Cr	1,77 $\pm$ 0,29
Cu	20,2 $\pm$ 2,8
Fe	216 $\pm$ 23
La	< 0,400
Mg	4022 $\pm$ 287
Mn	149 $\pm$ 5
Mo	1,06 $\pm$ 0,08
Ni	2,17 $\pm$ 0,13
Pb	< 9,70
V	< 2,59
Zn	112 $\pm$ 5

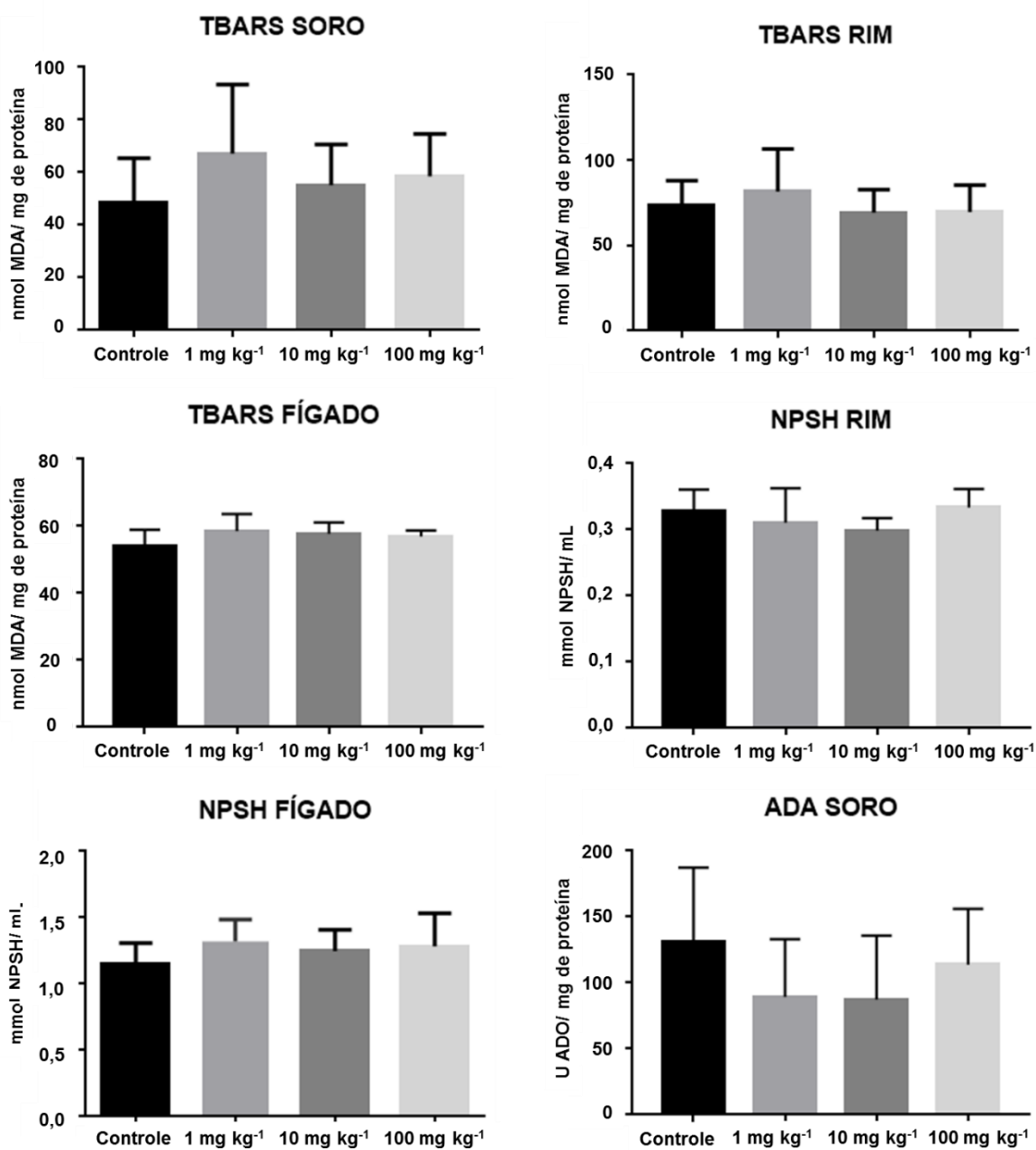
\* Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas: 250 mg, 5 mL de  $\text{HNO}_3$  14,4 mol  $\text{L}^{-1}$  + 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; programa; *i*) 400 W por 20 min (10 min de rampa); *ii*) 900 W por 35 min (15 min de rampa) e 0 W por 20 min.

Com base nos resultados obtidos na Tabela A1, foi possível observar que, dentre os analitos determinados, Ca e Mg estavam presentes em maior concentração, sendo estes considerados como macrominerais. Essas, em relação à concentração observada para esses elementos em tecidos, fluídos e pêlos, foram inferiores, não devendo ser relacionadas com as observações feitas. Para As, Cd, La, Pb e V, os resultados ficaram abaixo do LOQ. Para os demais elementos, alguma correlação poderia ser estabelecida, porém, esta avaliação fogia do alcance do presente estudo.

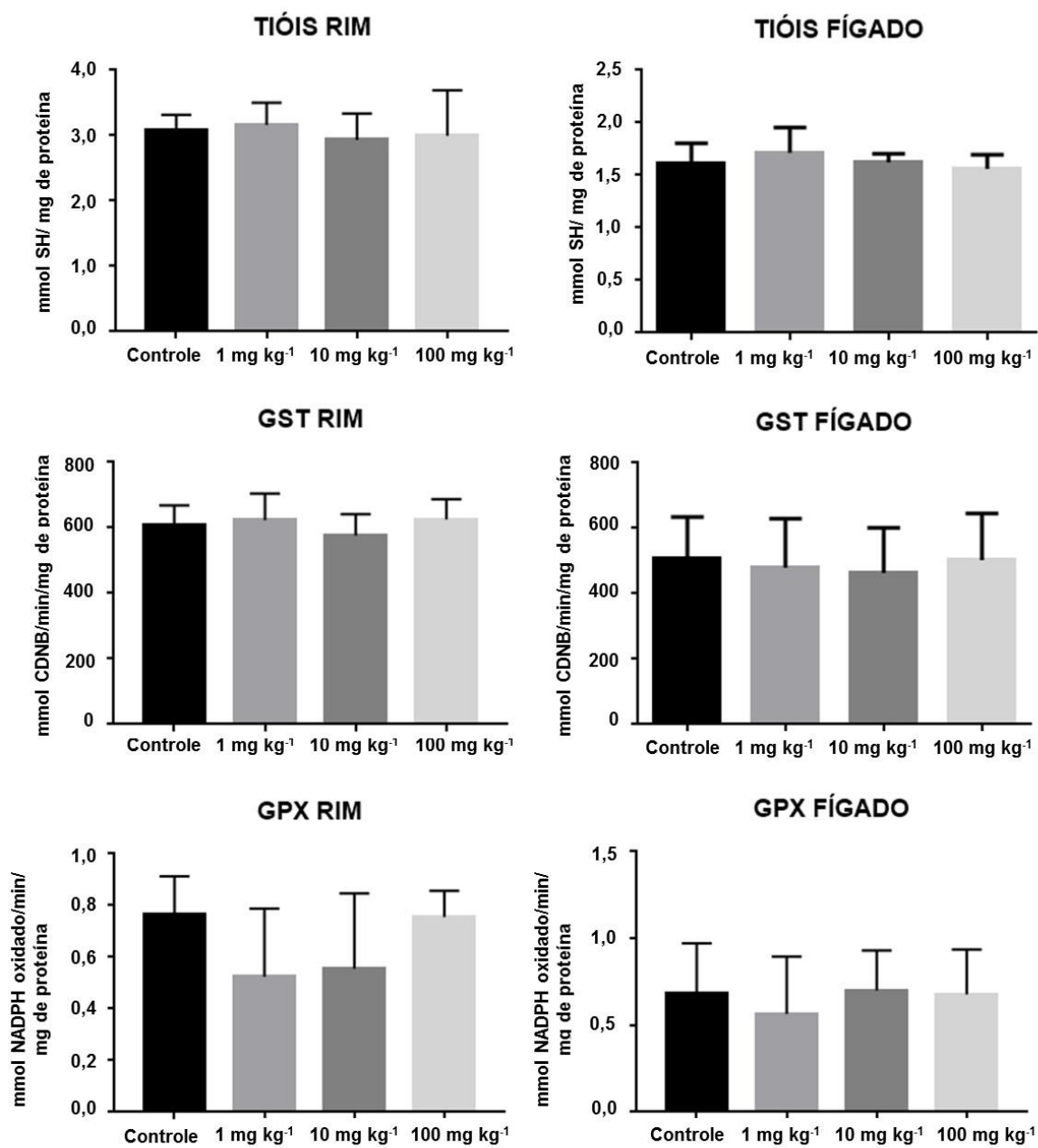


## APÊNDICE B

## PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS NO FÍGADO, RIM E SORO SANGUÍNEO DE RATOS SUBMETIDOS A TRATAMENTOS COM CNTs, (n=6).



TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; NPSH: tióis não proteicos; ADA: Adenosina deaminase.



GST: glutathiona S-transferase e GTX: glutathiona peroxidase.