

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

Graciela Marini Heidrich

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE La_2O_3 EM RATOS E
BIODISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS POR LA-ICP-MS**

Santa Maria, RS
2018

Graciela Marini Heidrich

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE La_2O_3 EM RATOS E BIODISTRIBUIÇÃO DE
ELEMENTOS POR LA-ICP-MS**

Dissertação 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 **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Santa Maria, RS
2018

Heidrich, Graciela Marini
EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE La₂O₃ EM RATOS E
BIODISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS POR LA-ICP-MS / Graciela
Marini Heidrich.- 2018.
68 p.; 30 cm

Orientador: Valderi Luiz Dressler
Coorientador: Rodrigo Cordeiro Bolzan
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. Nanopartículas 2. Óxido de lantânio 3. ratos 4.
biodistribuição 5. LA-ICP-MS I. Dressler, Valderi Luiz
II. Bolzan, Rodrigo Cordeiro III. Título.

Graciela Marini Heidrich

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE La_2O_3 EM RATOS E BIODISTRIBUIÇÃO DE
ELEMENTOS POR LA-ICP-MS**

Dissertação 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 **Mestre em Química**.


Aprovado em 02 de março de 2018:



Valderi Luiz Dressler, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)



Sergio Roberto Mortari, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2018

DECLARAÇÃO

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



Graciela Marini Heidrich

AGRADECIMENTOS

A **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 possibilidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo incentivo à pesquisa e pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler**, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, pela amizade e pelo exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. **Sergio Roberto Mortari**, a Prof. Dra. **Maria Rosa Chitolina Schetinger** e ao Prof. Dr. **Edson Irineu Muller**, pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Rodrigo Cordeiro Bolzan** e ao Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte**, pela participação no comitê de orientação.

Aos professores e aos colegas do **LAQIA** e **CEPETRO**, pelo convívio, amizade e contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do **Laboratório Enzitox**, pela disponibilidade do laboratório, pela ajuda e pelos ensinamentos fornecidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof. Dra **Cristiane**, Prof. Dr. **Roberto** e Dr. **Éverton** do laboratório **LAPBIO**, pela contribuição neste trabalho.

Ao **Ademir** e a **Valéria** da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Química, pela disponibilidade e atenção.

À minha **família**, pelo apoio e incentivo durante o mestrado.

“A disciplina é a mãe do êxito.”
Ésquiles

RESUMO

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE La_2O_3 EM RATOS E BIODISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS POR LA-ICP-MS

AUTORA: Graciela Marini Heidrich
ORIENTADOR: Dr. Valderi Luiz Dressler

Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos causados pela administração, via oral, de NP- La_2O_3 em ratos. Devido ao pouco conhecimento toxicológico das NP- La_2O_3 , inicialmente foi feito o teste de toxicidade oral aguda de acordo com a norma OECD 425. Para tal, foram utilizadas 4 doses de NP- La_2O_3 (5 mg kg^{-1} , 50 mg kg^{-1} , 300 mg kg^{-1} e 2000 mg kg^{-1} por massa corpórea), onde não foram observadas alterações comportamentais, sintomas de intoxicação ou mortalidade. Conforme as análises histológicas do fígado, as doses de 300 e 2000 mg kg^{-1} apresentaram pequenas lesões hepáticas, sendo assim, para o estudo de toxicidade crônica foi utilizado doses inferiores a 300 mg kg^{-1} . A segunda etapa do trabalho consistiu na avaliação da toxicidade crônica de NP- La_2O_3 por um período de 31 dias, no qual, os animais foram divididos em 4 grupos de dosagem oral (controle, 1 mg kg^{-1} , 10 mg kg^{-1} e 100 mg kg^{-1} por massa corpórea). Foi realizada a análise da biodistribuição de La e os elementos classificados como macrominerais e microminerais em diferentes órgãos, através da determinação por ICP-MS e obtenção de bioimagens por LA-ICP-MS. Além disso, parâmetros toxicológicos também foram avaliados, através de determinações bioquímicas em soro sanguíneo, para avaliar possível lesão hepática e renal. No entanto, não foram observadas alterações nos níveis de creatinina, ureia, gama glutamiltranspeptidase, alanina aminotransferase e aspartato transaminase, tanto nos animais controle como os animais submetidos ao tratamento com as NPs. De acordo com os resultados, a dose letal (DL50) para administração de NP- La_2O_3 é superior a 2000 mg kg^{-1} . A administração oral de NP- La_2O_3 em concentrações iguais ou inferiores de 100 mg kg^{-1} por um período de 31 dias, não provocou alterações significativas em parâmetros bioquímicos e na massa dos órgãos de ratos, não demonstrando características toxicológicas desse nanomaterial. Em relação a distribuição de NP- La_2O_3 , ocorreu um maior acúmulo de La no fígado, rim e coração e a determinação de macro e microminerais, pode ser observado que, o rim e o fígado foram os órgãos mais afetados na variação da concentração elementar.

Palavras-chave: Nanopartículas, óxido de lantânio, ratos, biodistribuição, LA-ICP-MS

ABSTRACT

EFFECTS OF La_2O_3 NANOPARTICLES ON RATS AND ELEMENT BIODISTRIBUTION ANALYSIS BY LA-ICP-MS

AUTHOR: GRACIELA MARINI HEIDRICH

ADVISER: Dr. VALDERI LUIZ DRESSLER

The aim of this work is to evaluate possible effects caused by oral administration of La_2O_3 -NP in rats. Due to the lack of toxicological knowledge of La_2O_3 -NP, the acute oral toxicity test, according to OECD 425 guidelines, was initially performed. For this purpose, four doses of La_2O_3 -NP (5 mg kg^{-1} , 50 mg kg^{-1} , 300 mg kg^{-1} and 2000 mg kg^{-1} per body weight), where no behavioral changes, symptoms of intoxication or mortality were observed. According to the histological analyzes of the liver, doses of 300 mg kg^{-1} showed small hepatic lesions, so, for the chronic toxicity study of, doses below 300 mg kg^{-1} were used. The second part of the study consisted in the evaluation of chronic toxicity of La_2O_3 -NP for a period of 31 days. La_2O_3 -NPs were also administered orally. For the test, animals were divided into 4 groups (control, 1 mg kg^{-1} , 10 mg kg^{-1} and 100 mg kg^{-1} per body mass). Analysis of biodistribution of La, macrominerals and microminerals elements in different organs, through determination by ICP-MS and bioimaging by LA-ICP-MS. In addition, toxicological parameters were also analyzed through biochemical analyzes in blood serum to evaluate possible hepatic and renal lesions. However, no changes were observed in creatinine, urea, gamma glutamyltranspeptidase, alanine aminotransferase and aspartate transaminase levels, both in the control animals with the animals treated with the NPs. According to the results, the lethal dose (LD50) for administration of La_2O_3 -NP is greater than 2000 mg kg^{-1} . Oral administration of La_2O_3 -NP at concentrations equal to or lower than 100 mg kg^{-1} over a period of 31 days did not cause significant changes in biochemical parameters and in the mass of rat organs, which did not demonstrate toxicological characteristics of this nanomaterial. Analysis of biodistribution of La_2O_3 -NP, shows that La is most accumulated in liver, kidney and heart. Determination of macrominerals and microminerals, can be observed that the kidney and liver were the most affected organs in the variation of the elemental concentration.

Keywords: Nanoparticles, lanthanum oxide, rats, biodistribution, LA-ICP-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise histológica de fígado. (A) Rato controle e rato submetido a, (B) NP-La ₂ O ₃ 5 mg kg ⁻¹ , (C) NP-La ₂ O ₃ 300 mg kg ⁻¹ e (D) NP-La ₂ O ₃ 2000 mg kg ⁻¹ . (H&E 10X – Detalhes 40X)	37
Figura 2 – Análise histológica do baço. (A) Rato controle e (B) rato submetido a tratamento com NP-La ₂ O ₃ 2000 mg kg ⁻¹ (H&E 10X).....	38
Figura 3 – Análise histológica de coração. (A) Rato controle e (B) rato submetido a tratamento com NP-La ₂ O ₃ 2000 mg kg ⁻¹ . (H&E10X).....	38
Figura 4 – Bioimagens da distribuição de La e outros elementos em fígado de rato exposto a 2000 mg kg ⁻¹ de La ₂ O ₃ . Condições operacionais do instrumento LA-ICP-MS de acordo com a Tabela 2.....	40
Figura 5 – Variação da massa corpórea dos animais no período de 4 semanas,.....	42
Figura 6 – Resultados obtidos por ICP-MS para La nos diferentes órgãos (n = 3), baço e pulmão (n = 2). As condições de determinação estão descritas na Tabela 1 (seção <i>Materiais e Métodos</i>).....	45
Figura 7 – Biodistribuição de macrominerais após 31 dias de exposição de NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).	47
Figura 8 – Biodistribuição de microminerais após 31 dias de exposição de NPs-La ₂ O ₃ (n = 3)	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições operacionais utilizadas para as determinações por ICP-MS e ICP OES.	31
Tabela 2 – Condições operacionais para a análise de tecido animal por LA-ICP-MS.	32
Tabela 3 – Propriedades físico-químicas das nanopartículas de La_2O_3	33
Tabela 4 – Massa corpórea dos ratos antes e depois de serem submetidos ao tratamento com NP- La_2O_3 e a massa dos órgãos relacionada à massa corpórea (n = 1).	36
Tabela 5 – Relação da massa dos órgãos com a massa corpórea de ratos após 31 dias de tratamento com NP- La_2O_3 . Os valores representam a média e o desvio padrão (SD) para n = 10.	43
Tabela 6 – Valores bioquímicos séricos de ratos após 31 dias de tratamento com NP- La_2O_3 , (n = 5).	44
Tabela 7 – Resultados obtidos por ICP-MS em material de referência certificado e os respectivos LOD e LOQ da técnica (n = 3).	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

0D	Dimensão zero
1D	Uma dimensão
3D	Três dimensões
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
ADP	Adenosina difosfato
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina amonitransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AST	Aspartato transaminase
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPASE	Adenosinatrifosfatases
CRM	Material de referência certificado, do inglês <i>certified reference material</i>
DL50	Dose letal mediana
EPA	do inglês, Environmental Protection Agency
FDA	do inglês, Food and Drug Administration
GGT	Gama glutamil transferase
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IS	Padrão interno, do inglês <i>internal standard</i>
LA-ICP-MS	Ablação por laser acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LDH	Lacto desidrogenase
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limited of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limited of quantification</i>
M-CeO ₂	Micropartículas de óxido de cério
NIST	Instituto nacional de padrões e tecnologia, do inglês <i>National Institute of Standards and Tecnology</i>
NM	Nanomateriais, do inglês <i>nanomaterials</i>
NP	Nanopartículas, do inglês <i>nanoparticles</i>
NP-Ag	Nanopartículas de prata
NP-CeO ₂	Nanopartículas de óxido de cério
NP-Fe ₂ O ₃	Nanopartículas de óxido de ferro
NP-La ₂ O ₃	Nanopartículas de óxido de lantânio
NP-NiO	Nanopartículas de óxido de níquel
NP-SiC	Nanopartículas de carbeto de silício
NP-TiO ₂	Nanopartículas de dióxido de titânio
OECD	Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico, do inglês <i>Organization for economic co-operation and development</i>
REE	Elementos terras raras, do inglês <i>rare earth elements</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SIMS	Espectrometria de massa de íon secundário, do inglês <i>secondary ion mass spectrometry</i>
TFM	Politetrafluoretileno modificado
XRF	Espectroscopia de fluorescência de raio-X, do inglês <i>x-ray fluorscence spectroscopy</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	NANOPARTÍCULAS.....	17
2.1.1	Nanopartículas de óxido de lantânio	18
2.1.2	Toxicidade das nanopartículas.....	19
2.1.3	Análise bioquímica de efeitos toxicológicos <i>in vivo</i>	21
2.2	BIODISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS	22
2.2.1	Análise de composição elementar	24
2.2.2	Técnicas de Bioimagem	25
2.2.3	Ablação por laser acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.....	26
2.2.4	Análise de tecido animal por LA-ICP-MS	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Animais.....	28
3.2	Estudo de toxicidade oral aguda.....	28
3.3	Estudo de toxicidade crônica da NP-La ₂ O ₃ por um período de 31 dias.....	29
3.4	Instrumentação.....	30
3.5	Reagentes e soluções	32
3.6	Validação das análises por ICP-MS, ICP OES e LA-ICP-MS.....	33
3.7	Análises bioquímicas	33
3.8	Histologia.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Estudo de toxicidade oral aguda.....	35
4.1.1	Análise Histológica.....	36
4.1.2	Análise de biodistribuição por LA-ICP-MS	39
4.2	Estudo de toxicidade crônica da NP-La ₂ O ₃ por um período de 31 dias.....	42
4.2.1	Determinação de lantânio por ICP-MS	44
4.2.2	Determinação de macrominerais e microminerais.....	46
4.2.3	Validação dos resultados.....	50
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXO A - BIODISTRIBUIÇÃO DE CÁLCIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).....	59
	ANEXO B - BIODISTRIBUIÇÃO DE POTÁSSIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).....	60
	ANEXO C - BIODISTRIBUIÇÃO DE MAGNÉSIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).....	61
	ANEXO D - BIODISTRIBUIÇÃO DE FÓSFORO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).....	62
	ANEXO E - BIODISTRIBUIÇÃO DE COBALTO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).....	63
	ANEXO F - BIODISTRIBUIÇÃO DE COBRE APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).....	64
	ANEXO G - BIODISTRIBUIÇÃO DE FERRO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).....	65
	ANEXO H - BIODISTRIBUIÇÃO DE MANGANÊS APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La ₂ O ₃ (n = 3).....	66

ANEXO I - BIODISTRIBUIÇÃO DE MOLIBDÊNIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3).....	67
ANEXO J - BIODISTRIBUIÇÃO DE SELÊNIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3).....	68
ANEXO L - BIODISTRIBUIÇÃO DE ZINCO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3).....	69

1 INTRODUÇÃO

A utilização das nanopartículas (NP) vem sendo cada vez mais recorrente com o avanço da ciência e da indústria tecnológica. Porém, devido as dimensões nanométricas, seu uso pode levar a efeitos biológicos completamente diferentes quando comparados aos efeitos produzidos pelo mesmo material na forma macromolecular ou iônica/elementar.¹

Ainda há poucos estudos que relatam a toxicidade das NPs em relação aos seres humanos, mas as NPs podem possuir diferentes efeitos tóxicos, devido ao seu pequeno tamanho e, em consequência disso, possui uma elevada área superficial, podendo assim serem altamente reativos. As NPs são capazes de se associar com o corpo humano e interagir com as estruturas intracelulares durante um longo período de tempo. As principais vias de absorção são por inalação, ingestão, penetração na pele ou injeção.¹

Os elementos terras raras (REE) apresentam características ópticas, magnéticas e catalíticas peculiares. O lantânio (La) possui características químicas muito parecidas com as do cálcio (Ca), podendo deslocar o Ca na parte estrutural dos organismos. Em altas concentrações, o La pode interagir com as proteínas e afetar as atividades enzimáticas, levando assim a efeitos tóxicos.²

Estes elementos, em tamanho nanométrico, possuem propriedades modificadas e de característica única, na qual, lhe conferem um desenvolvimento significativo em vários campos, como na medicina, tecnologia, agroindústria e indústria de cosméticos.³

As nanopartículas de óxido de lantânio (NP-La₂O₃), podem ser encontradas em produtos antibacterianos⁴ e catalisadores³. Na medicina, são utilizadas como agente radiosensibilizador⁵, carreadores de fármacos⁶, na elaboração de biossensores⁷, entre outras aplicações.

Sendo ou não tóxicas, há uma preocupação em relação as NP-La₂O₃, mas ainda faltam informações a respeito. Desta forma, a importância de avaliar os efeitos em organismos vivos, bem como verificar onde elas atuam ou se concentram. Em relação aos estudos voltados para verificar a sua distribuição no organismo, a determinação da concentração total do elemento em determinado órgão ou tecido ainda é o mais usual. Entretanto, nos últimos anos, ênfase está sendo dado em relação a estudos relacionados à verificação da distribuição espacial dos elementos,

denominado de bioimageamento ou biodistribuição.^{8,9} Para tal, diferentes técnicas têm sido propostas, entre elas a ablação com laser acoplada à espectrometria de massa com plasma (LA-ICP-MS). A análise da distribuição espacial dos elementos em materiais biológicos tem aumentado em diversas áreas científicas, entre elas, química, biologia e ciências ambientais.¹⁰

Além da análise de biodistribuição, a avaliação toxicológica de NP em ratos, a análise de enzimas, no qual a presença delas no sangue em quantidade significativa pode indicar danos ao tecido, podem atuar como biomarcadores para determinar o estado funcional de alguns órgãos. Como exemplo, tem-se a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que são usadas como medida de referência de hepatotoxicidade.¹¹ O exame histológico é outra avaliação feita para determinar as mudanças morfológicas devido à exposição à NPs, avaliando, assim, os efeitos toxicológicos de cada órgão.¹²

Deste modo, este trabalho tem como objetivo:

- Avaliação da toxicidade oral (DL50) aguda das NP-La₂O₃, em ratos fêmeas *Wistar*.
- Avaliação da toxicidade oral crônica de NP-La₂O₃ em ratos machos *Wistar*, com diferentes concentrações por um período de 31 dias.
- Monitoramento de possíveis alterações comportamentais dos animais, bem como a variação da massa corpórea e outros aspectos visuais, como perda de pelo, durante o período do tratamento.
- Análise dos parâmetros toxicológicos, no fígado e rim através de alterações nos parâmetros bioquímicos em soro sanguíneo.
- Desenvolvimento de método e a análise da distribuição de La nos órgãos dos animais de forma quantitativa e qualitativa (bioimageamento), bem como, a alteração de elementos essenciais devido à absorção de La.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NANOPARTÍCULAS

São consideradas NPs os materiais que possuem tamanho entre 1 e 100 nm. Em consequência deste pequeno tamanho, elas possuem propriedades únicas. Uma dessas propriedades é sua elevada área superficial, que pode comportar um maior número de átomos na sua superfície, tornando-se, assim, mais reativas. As NPs podem estar nas formas esféricas, bastão ou tubo e com dimensões variáveis, sendo que essas características definem suas propriedades físicas, mecânicas, ópticas e eletromagnéticas.^{13,14} Dentre os nanomateriais, as NPs possuem dimensão zero (0D) ou uma dimensão (1D), o que lhes conferem propriedades diferentes aos compostos *bulk* (conjunto de partículas de tamanho maior), as quais possuem três dimensões (3D).¹⁵

As NPs são obtidas a partir de processos de síntese, sendo que entre os mais conhecidos estão os métodos de *Top-Down* e *Bottom-up*. No método *Top-Down*, parte-se do material previamente preparado em escala micrométrica e prepara-se o material nanoestruturado por processos de abrasão ou moagem de alta energia. O método *Bottom-up* consiste no uso de precursores moleculares ou iônicos, que são submetidos a um processo de nucleação e crescimento de partículas a fim de formar o material de interesse.¹⁶

Devido as suas propriedades diferenciadas, o emprego das NPs metálicas na elaboração de biossensores, transportadores de fármacos e agentes antimicrobianos, estão em amplo desenvolvimento e possuem um potencial de emprego na biomedicina.¹⁷ Além disso, esses materiais podem ser sintetizados e modificados com vários grupos funcionais químicos que permitem se combinar com anticorpos, ligando a drogas de interesse.¹⁸ Um exemplo para essas aplicações é a utilização de NPs como agentes de contraste em ressonância magnética nuclear (RMN). Nesse emprego, as NPs possuem grande utilidade, melhorando o contraste da imagem para o monitoramento de células específicas e acompanhamento do seu destino no organismo do paciente. Em virtude do seu tamanho, elas permanecem mais tempo em contato com o órgão, comparada a partículas maiores, sendo que o tempo de permanência delas no organismo é um critério importante no procedimento de imagem.¹⁹ Outros exemplos de NPs e suas aplicações incluem as NPs de prata

(NP-Ag), as quais possuem amplo uso na indústria têxtil como agente antimicrobiano,²⁰ e as NPs de óxido de ferro (NP-Fe₂O₃), que são utilizadas como agente de contraste em imageamento biomédico devido as suas propriedades magnéticas.²¹ Podem ser citadas também as NPs de dióxido de titânio (NP-TiO), que são amplamente empregadas em protetores solares com intuito de proporcionar melhor aspecto na homogeneização dos mesmos,²² e as NPs de óxido de lantânio (NP-La₂O₃), as quais tem atividade antimicrobiana.⁴

2.1.1 Nanopartículas de óxido de lantânio

O lantânio pertence à classe dos lantanídeos ou elementos terras raras (REE), contendo configurações estáveis de elétrons no nível 4f e, devido a isso, possui característica paramagnética.²³ Os lantanídeos, de um modo geral, possuem propriedades químicas semelhantes ao cálcio (Ca), como raio iônico, por exemplo. Deste modo, o lantânio trivalente (La³⁺) possui potencial para tratamento de transtornos de reabsorção óssea, como a osteoporose, sendo que os lantanídeos também são utilizados em tratamento de toxicidade hepática, aterosclerose e artrite reumatoide.^{2,24} Além disso, devido a sua forte afinidade por fosfatos, o La também é utilizado como medicamento, como o Fosrenol, em tratamentos renais, devido seu grande potencial para eliminação de fosfatos.²⁵

As NP-La₂O₃ possuem morfologia esférica, são insolúveis em água e solúveis em ácido. Na área biomédica, as propriedades magnéticas das NP-La₂O₃ são exploradas para o desenvolvimento de marcadores controlados por campo magnético para liberação de fármacos, além de serem empregadas como contraste em imageamento biomédico por RMN.²⁶ Adicionalmente, as NP-La₂O₃ podem também ser aplicadas como agentes antimicrobiano⁴ e antiviral²⁷.

Além do seu potencial uso na área da saúde, as NP-La₂O₃ demonstram muitas propriedades atrativas para aplicações industriais e tecnológicas, como em semicondutores do tipo p e aplicações na área eletrônica, em biossensores, tratamento de água, componente em conversores de gases automotivos, materiais catalíticos e filtros ópticos.³

De acordo com ensaio de biocompatibilidade das NP-La₂O₃, foi observado que estas apresentam citotoxicidade moderada, isto significa que são nocivas às células, tornando assim, preocupante seu uso em aplicações biomédicas. Além

disso, elas são rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal, sendo então, acumuladas no fígado.²⁶ Entretanto, estudos de toxicidade com doses repetidas e avaliação da bioacumulação ainda são necessários.

2.1.2 Toxicidade das nanopartículas

A utilização das NPs é crescente com o avanço da ciência e da indústria tecnológica. Simultaneamente, as dúvidas sobre seus reais efeitos, benéficos ou maléficos, ainda não estão totalmente elucidados. Portanto, o desenvolvimento de estudos sobre biodistribuição, isto é, análise da interação destes materiais com tecidos animais, ainda são necessários.²⁸

No âmbito biológico, o tamanho reduzido das NPs define uma preocupação com a sua passagem pela membrana celular, devido os mesmos estarem na mesma ordem de grandeza, afetando a fisiologia de células animais.²⁹ Além do mais, as proteínas possuem uma tendência de interagir com as NPs por possuírem dimensão semelhante, podendo isso afetar o metabolismo celular.³⁰

Depois da absorção e interação, NPs da ordem de 10 a 20 nm conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, tornando-se assim importantes agentes terapêuticos, podendo atuar como carregador de fármacos e, também, serem utilizadas como ferramenta para localização de processos patológicos cerebrais. Também, podem atuar como ligante seletivo a células tumorais sem causar danos comparados aos métodos convencionais de tratamento neural. Entretanto, o efeito que essas NPs podem ter na função neural ainda são desconhecidas.³¹

Com relação à toxicidade de NPs, estudos evidenciaram que NPs de alguns óxidos metálicos possuem a capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo afetar a expressão de proteínas antioxidantes e enzimas dos sistemas de defesa, tanto *in vitro* como em *in vivo*, resultando em estresse oxidativo, podendo assim levar à citotoxicidade, inflamação e fibrose.³²

Muitos nanomateriais, mesmo aqueles compostos por materiais bastante inertes, como o ouro, tornam-se altamente reativos na escala nanométrica. Isto ocorre devido ao aumento da área superficial, fazendo com que mais moléculas (agentes externos) entrem em contato com a superfície, ocorrendo então o aumento da interação.³³ Além do tamanho, outros parâmetros que afetam o potencial toxicológico de NPs são a forma, a composição, o estado de

aglomeração/agregação, a morfologia da superfície, a cristalinidade e a solubilidade.^{34,35}

A maioria dos estudos fornece informações somente da composição química e o tamanho de NPs utilizadas, sendo as demais informações limitadas. Informações como biocinética nos estudos de nanotoxicidade são importantes, pois as propriedades da NP no ambiente fisiológico para o qual elas são aplicadas, como o pH e a força iônica do meio, podem influenciar na solubilidade das mesmas.^{36,37} Deste modo, ensaios de toxicidade devem ser realizados nas condições mais próximas dos modos de exposição real. Atualmente, existem dois modelos de ensaio comumente empregados: *in vitro* e *in vivo*. No ensaio *in vitro* são, geralmente, utilizadas células que são expostas aos agentes de interesse. Posteriormente, parâmetros indicadores da toxicidade são avaliados, como a inibição do crescimento e respiração celular, produção de radicais livres, lesões no DNA e outras manifestações bioquímicas e celulares. Ensaios *in vivo* são empregados utilizando modelos animais, em que as alterações causadas no desenvolvimento no organismo como, crescimento, mortalidade e lesão em alguns órgãos, podem ser indicadores de toxicidade. Neste sentido, cabe mencionar que as agências reguladoras nacionais como INCQS/Fiocruz, e internacionais EPA, FDA, OECD, já possuem protocolos padronizados para realização desses ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.³⁸

Na maioria dos casos, o efeito tóxico das NPs está relacionado à produção excessiva de ROS, sendo que essas espécies em excesso são potencialmente tóxicas. Níveis moderados de ROS possuem a função de algumas modulações celulares, como transdução de sinal, resposta proliferativa, expressão de gene e regulação da proteína redox. Porém, altos níveis de ROS podem causar estresse oxidativo, provocar inflamações e danos as células devido a peroxidação lipídica, alteração das proteínas e até mesmo o rompimento do DNA.³⁹

Nos últimos anos é observado um aumento do número de publicações referentes a testes de toxicidade de NPs. Neste sentido, Kumari *et al.*⁴⁰ determinaram a dose letal (DL50) para NPs de óxido de cério (NP-CeO₂) e micropartículas de óxido de cério (M-CeO₂) em fêmeas de rato albino *Wistar*, de acordo com a OECD 420, conhecida como *Acute oral toxicity-fixed dose method*. Neste estudo, os ratos foram expostos a concentrações de NP-CeO₂ de 5, 50 e 300 mg kg⁻¹ de peso corpóreo. Os autores observaram que em doses de 5 e 50 mg kg⁻¹

de NP-CeO₂ não houve aumento significativo da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) em soro dos ratos expostos. Porém, quando administradas concentrações de 300 mg kg⁻¹, o nível de lactato desidrogenase (LDH) aumentou significativamente, indicando citotoxicidade. Além disso, a bioacumulação de NP-CeO₂ foi mais pronunciada em relação a M-CeO₂.

Em um ensaio de exposição oral de ratos a NPs de óxido de níquel (NP-NiO), submetidos a 125, 250 e 500 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, foi observado que a biodistribuição de NP-NiO resultou em um maior acúmulo de Ni no tecido hepático depois de 24 h de exposição. Neste estudo também foram identificados danos significativos ao DNA após administração da dose mais elevada no período de 24 h, demonstrando assim os efeitos genotóxicos das NP-NiO.⁴¹

No trabalho realizado por Srinivas *et al.*⁴², a toxicidade foi avaliada através da exposição por inalação, na qual 36 ratos, sendo 18 machos e 18 fêmeas, foram expostos continuamente a NP-CeO₂ por um período de 4 h em um ambiente contendo aerossol de NP-CeO₂ com 641 mg m⁻³. As avaliações após 24 h, 48 h e 14 dias de exposição, indicaram citotoxicidade por meio do estresse oxidativo e inflamação crônica.⁴² Niu *et al.*⁴³ submeteram quatro grupos de ratos, contendo 6 animais cada, para avaliar o efeito cardioprotetor de NP-CeO₂. Os ratos receberam, por via oral (gavagem), 100 µL de uma solução a 0,15 mM de NP-CeO₂. Os autores observaram efeito benéfico da NP-CeO₂ através de suas propriedades antioxidantes e autorregenerativas.

Apesar do pouco conhecimento sobre nanomateriais, principalmente para o La₂O₃, em trabalho realizado por Sisler *et al.*,⁴⁴ os ratos foram expostos a uma baixa dose (10 mg m⁻³) e uma alta dose (30 mg m⁻³) de NPs-La₂O₃, de acordo com os autores. As doses foram administradas via inalação, durante 4 dias, por períodos de 6 h dia⁻¹, tendo 12 animais para cada grupo de ratos tratados com NPs-La₂O₃ e 24 animais para o grupo controle. Como resultados, foram observadas alterações inflamatórias crônicas e fibrose no pulmão.

2.1.3 Análise bioquímica de efeitos toxicológicos *in vivo*

A avaliação do potencial toxicológico deve incluir indicadores gerais da saúde dos animais, tais como, distúrbios do comportamento, alterações na massa corporal e taxa de mortalidade.⁴⁵

As NPs podem interagir com as proteínas e afetar as atividades enzimáticas, levando assim a efeitos tóxicos. As enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST) e gama glutamil transpeptidase (GGT), estão presentes no fígado, no entanto, quando há alguma lesão nesse órgão, tais enzimas são liberadas para a corrente sanguínea.⁴⁶ Deste modo, a análise destas enzimas fornece informações sobre o funcionamento do fígado e identifica possíveis lesões hepáticas. Além disso, danos renais podem ser identificados através da análise da creatinina e uréia presente no soro sanguíneo. Visto que, a creatinina e a uréia são filtradas no rim, o alto teor delas no soro significa que o rim possui dificuldade em excretá-las, sendo considerado um marcador da função renal, embora não sejam considerados específicos.⁴⁷

Em virtude dessas enzimas serem encontradas no soro ou plasma de seres humanos e ratos, eles têm potencial para serem utilizados como marcadores para monitorar lesões hepáticas e lesões renais induzidas por alguma substância em testes de toxicidade.

2.2 BIODISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS

A análise de biodistribuição é utilizada para avaliar o destino e em qual região ocorre, preferencialmente, a absorção de substâncias, como fármacos, metais, NPs, entre outros, em um organismo, animal ou vegetal.⁴⁸ A aplicação de NPs na medicina tem se destacado, uma vez que podem atuar como carreadores de fármacos capazes de atingir células específicas e aprimorar o diagnóstico médico.⁴⁹ Nesse contexto, a biodistribuição de nanomateriais é considerada uma avaliação importante em relação à sua eficácia e segurança, tornando assim decisivo seu uso na medicina para diagnóstico e/ou tratamento de doenças.

No caso das NPs, a biodistribuição pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a rota de administração (intravenosa, oral, pulmonar e administração dérmica), propriedades físicas (tamanho e forma) e químicas (reatividade química) da NP, além do ambiente fisiológico para a qual as NPs são introduzidas. Outras características que podem influenciar a absorção seriam o revestimento da NP, sua carga superficial e o seu tamanho.¹

Uma das principais rotas de exposição de NPs em humanos é via administração oral, através do consumo de produtos que contenham nanomateriais

em sua composição. Quando ingeridos, as NPs podem ser absorvidas pelo trato gastrointestinal³⁶ e ao entrar em contato com a corrente sanguínea, as NPs são expostas em um ambiente rico de proteínas, células e tecidos. Em casos em que as NPs possuem dimensões similares às das proteínas, ou seja, inferior a 40 nm, e dependendo da composição da superfície, elas podem formar complexos, podendo ocasionar mudanças na estrutura da proteína e inclusive alterar a função da mesma.⁵⁰

A análise de biodistribuição pode ser realizada por métodos invasivos, através da eutanásia do animal e posterior análise dos órgãos, como quantificação elementar, ou por métodos não invasivos através da obtenção de imagem, com auxílio de um marcador fluorescente juntamente com as NPs e detecção por microscopia de fluorescência.⁵¹

Para a análise de biodistribuição após sacrifício do animal, a decomposição total dos órgãos é uma metodologia utilizada para posterior determinação elementar. Para isto, é necessária uma etapa de preparo de amostra, para converter a matriz (órgãos) em solução. Esta etapa é realizada fornecendo energia térmica, combinada a reagentes químicos, como ácidos concentrados. Outro método de análise de biodistribuição elementar nos tecidos animais é através da obtenção de imagens com auxílio de técnicas analíticas como a espectrometria de massa de íon secundário (SIMS),⁵² espectroscopia de raios-X (XRF)⁵³, micro espectroscopia de raios-X (μ XRF)⁵⁴ e ablação por laser acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS). Com estas técnicas é possível mapear em qual região do tecido teve maior acúmulo ou monitorar uma possível lesão.

Na literatura são reportados trabalhos sobre biodistribuição de diversas NPs, um deles se refere a biodistribuição de NPs de carbeto de silício (NP-SiC) em modelo animal após administração oral da dose aguda (24 h), nas concentrações de 0,5, 5, 50, 300 e 600 mg kg⁻¹ por peso corpóreo, para dose crônica (28 dias), com doses de 0,5 e 50 mg kg⁻¹ por peso corpóreo. A biodistribuição de NP-SiC no fígado, rim, baço e fezes, foi analisada por emissão de raios-X induzido por partícula (PIXE). No tratamento de dose aguda não ocorreu acúmulo de NP-SiC nos órgãos, porém no tratamento de dose subaguda, a concentração de NP-SiC nas fezes teve um aumento até o final do tratamento e não teve acúmulo nos órgãos.⁵⁵ Em outro estudo foi para avaliação da distribuição de NPs de óxido de zinco (NP-ZnO) e NPs de dióxido de titânio (NP-TiO₂) em sangue, urina, fezes e órgãos como fígado, rim,

baço e cérebro. As NPs foram administradas oralmente em ratos durante 13 semanas (7 dias semana⁻¹), nas concentrações de 260, 520 e 1041 mg kg⁻¹ de NP-TiO₂ e 134, 268 e 536 mg kg⁻¹ de NP-ZnO por peso corpóreo. Para a determinação de Ti e Zn foi utilizado a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a concentração de Zn foi maior no fígado, rim e urina. Para as NP-TiO₂, a concentração de Ti foi mais elevada nas fezes, sendo que nos outros órgãos não teve diferença significativa com o controle. Entretanto, a NP-ZnO comparada à NP-TiO₂, demonstrou uma maior absorção e distribuição entre os órgãos, isto se justifica possivelmente a alta taxa de dissolução da NP-ZnO no fluido gástrico.⁵⁶

2.2.1 Análise de composição elementar

Muitos elementos são considerados essenciais para o desempenho das atividades biológicas do organismo. Estes elementos podem ser classificados como macrominerais, que são necessários em concentrações mais elevadas, como cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e potássio (K), e os microminerais, que são essenciais em concentrações diárias na faixa de µg g⁻¹ no organismo. Entre os microminerais estão o ferro (Fe), selênio (Se), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn) e molibdênio (Mo). Estes elementos encontram-se na forma iônica ou estão ligados a proteínas ou moléculas, como metaloenzimas. Cada elemento possui propriedades químicas diferentes e funcionalidades específicas. O Ca²⁺, por exemplo, ligado a proteína (Ca²⁺-ATPase) é crucial para manter o equilíbrio das funções neurais. Um distúrbio na disponibilidade de Ca pode desencadear desordens no sistema nervoso central e sua deficiência em longo prazo é, provavelmente, um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de osteoporose.⁵⁷

Em alguns casos, a deficiência de determinados elementos essenciais pode ser resultado da absorção de outros elementos, causado pela exposição aguda ou crônica de elementos não-essenciais. O mecanismo de interação dos elementos com o organismo, pode ser identificado através de alterações na distribuição de metais nos tecidos.⁵⁸

Para a determinação elementar em materiais biológicos são necessárias técnicas analíticas de determinação com boa seletividade e sensibilidade,

principalmente nos casos de elementos que estão em baixa concentração. Neste contexto, destaca-se o uso da análise por espectroscopia de fluorescência de raios-X⁵⁹, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)⁶⁰ e a ICP-OES⁶¹.

Na técnica de XRF, a amostra é submetida a uma radiação de elevada energia (radiação gama ou radiação X), que promove a excitação de átomos. Ao retornarem para o estado fundamental, estes emitem um comprimento de onda específico, sendo possível a identificação do elemento. Nesta técnica, a determinação é multi-elementar e é possível a análise direta de sólidos, não sendo necessária uma etapa prévia de preparo da amostra.⁶²

A técnica de ICP-MS é comumente a técnica de escolha para a determinação de elementos em baixas concentrações, principalmente devido a sua alta sensibilidade. No entanto, nesta técnica, apesar da alta seletividade, podem ser encontradas interferências espectrais causadas pela formação de óxidos, hidróxidos e de íons poliatômicos.⁶⁰

A técnica de ICP-OES também tem sido amplamente utilizada para determinação de macronutrientes, porém são encontradas algumas limitações devido à presença de interferências espectrais que são causadas, principalmente, por sobreposição de linhas de emissão atômica.⁶¹

2.2.2 Técnicas de Bioimagem

Estudos envolvendo biodistribuição e bioacumulação de NPs em tecidos e órgãos de animais, apesar de serem importantes para avaliação da toxicidade, ainda são relativamente limitados. A obtenção da bioimagem da distribuição de NPs nos tecidos e órgãos é uma forma de revelar o seu acúmulo em determinada região ou espaço dos mesmos, bem como mapear possíveis lesões causadas pelo material monitorado e compreender as rotas de exposições.⁶³

Entre as técnicas de bioimagem, a escolha vai depender da sensibilidade, seletividade e resolução espacial necessária. A seguir será dada ênfase sobre a técnica LA-ICP-MS, uma vez que será a técnica utilizada para a análise dos materiais biológicos no presente estudo.

2.2.3 Ablação por laser acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

A técnica de LA-ICP-MS permite determinar a distribuição espacial dos elementos com resolução espacial da ordem de 5 a 200 μm . A técnica é semi-destrutiva da amostra, requerendo somente quantidades da ordem de ng de massa de amostra, que corresponde a quantidade de material removido por pulsos de laser.⁶⁴ A LA-ICP-MS é utilizada para análise direta de sólido na qual uma porção da amostra é convertida em vapor ou em partículas, com mínima ou nenhuma manipulação da amostra.³⁵ Ou seja, a análise pode ser feita diretamente na amostra *in natura*, sem qualquer preparo prévio. Dependendo da aplicação, a amostra pode ser seccionada ou fatiada, geralmente com espessura da ordem de 10 a 500 μm , e fixada em um suporte, como numa lâmina de vidro.

A LA-ICP-MS permite que a amostra seja analisada de diferentes formas, normalmente de modo pontual, rastreamento, profundidade e linha, e que pode ser escolhida de acordo com a aplicação requerida. A varredura em linha, por exemplo, é normalmente utilizada para a obtenção de bioimagens.⁶³ Obtidos os dados da análise, estes são tratados em programas para a obtenção das imagens, como o MatLab, Origin e ImageJ, por exemplo.

Dentre as principais vantagens da LA-ICP-MS, destacam-se a alta taxa de transferência de amostra para o plasma, alta sensibilidade, boa exatidão e precisão de resultados analíticos.⁶⁵

Porém, as partículas de aerossol produzidas durante a ablação de diferentes matrizes podem variar em tamanho e geometria, afetando a eficiência de transporte da amostra da célula de ablação até o plasma. Ambos os efeitos contribuem para desestabilização do plasma e originar efeitos de matriz, uma vez que as eficiências de vaporização, atomização e ionização dependem da quantidade de massa ablada da forma de aerossol (vapor ou partícula) e transportada para o plasma.³⁵

Para contornar estes efeitos pode ser feita a normalização do sinal do analito com o sinal de um padrão interno (PI). O ideal é que o PI esteja presente na matriz e distribuído de forma homogênea, esteja preferencialmente na mesma faixa de concentração do analito, tenha razão massa/carga (m/z) próximo ao do analito e o processo de ablação e ionização no plasma deve ser semelhante ao do analito.^{35,65}

Neste contexto, o carbono, apesar de ter todas estas características, é um dos elementos mais utilizados para normalização em amostras biológicas, por diversos autores, pois o carbono é um dos principais componentes dos tecidos e tem uma distribuição bastante homogênea.^{66,67}

2.2.4 Análise de tecido animal por LA-ICP-MS

Recentemente houve um aumento no interesse do estudo da distribuição elementar e molecular em materiais biológicos. Esses estudos têm sido conduzidos, especialmente, através da obtenção da imagem da distribuição dos elementos nesses materiais, permitindo a visualização da disposição, tanto de elementos essenciais como a presença de elementos tóxicos. Este é um método importante para auxiliar na compreensão dos complexos mecanismos dos processos biológicos, a relação dos efeitos da deficiência ou carência de determinados elementos e como podem estar associados a algumas doenças.⁶⁸

A LA-ICP-MS é uma técnica que permite a determinação de elementos e isótopos em tecidos biológicos e materiais relacionados com uma boa resolução espacial e alta sensibilidade. Análises qualitativas e semi-quantitativas em tecidos animais incluem a verificação da absorção de drogas medicamentosas, nanopartículas, concentração de metais em células e acúmulo ou disseminação de elementos, bem como a sua distribuição no tecido.⁶⁴

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizadas ratas *Wistar* fêmeas adultas, nulíparas e não-grávidas e ratos *Wistar* machos adultos, pesando entre 200 e 250 g, com 60 dias de idade. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Durante o período de desenvolvimento deste trabalho, os ratos foram 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 líquida, foram fornecidas *ad libitum* (acesso livre). Antes do início dos experimentos, os animais passaram por um período de adaptação de 7 a 14 dias no ambiente do biotério. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Santa Maria (número do protocolo: 4250170317).

3.2 ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado de acordo com a norma OECD 425⁶⁹, que consiste na administração de dosagens de concentrações crescentes do composto nos animais. Para este teste é recomendado o uso de fêmeas devido a pequena diferença de sensibilidade entre ratos fêmeas e machos, na qual, geralmente, as fêmeas são um pouco mais sensíveis.⁶⁹ Neste estudo, foram utilizadas 5 ratas fêmeas *Wistar* (60 dias e aproximadamente 220 g cada), sendo que 1 rata foi o controle, ou seja, não recebeu dose de nanomaterial, e 4 ratas pertenceram ao grupo do teste de dose letal referente as NPs óxido de lantânio (NP-La₂O₃).

Para a avaliação da toxicidade das NPs, foram usadas 4 doses diferentes de NP-La₂O₃ (5 mg kg⁻¹, 50 mg kg⁻¹, 300 mg kg⁻¹ e 2000 mg kg⁻¹ corpóreo). As doses foram preparadas em H₂O purificada e posteriormente sonicadas durante 5 min em banho de ultrassom. A administração foi por gavagem utilizando sonda orofágica. O teste foi iniciado com o tratamento de uma rata com a dose de 5 mg kg⁻¹ corpóreo, o segundo rato foi tratado com a dose de 50 mg kg⁻¹, seguida da dose de 300 mg kg⁻¹ e da dose final de 2000 mg kg⁻¹, com um período de 24 h entre as dosagens,

estabelecido a fim de verificar a mortalidade ou não desses animais após a administração das NPs.

A dose letal é definida quando há mortalidade de ratos em doses menores do que 2000 mg kg^{-1} corpóreo. Após a dosagem, os animais foram observados durante 15 dias, sendo monitorado o possível aparecimento de sintomas associados à intoxicação, como tremores, convulsões, diarreia ou salivação. Durante este período, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e alimentação *ad libitum*. Na ausência de mortalidade e de sinais de intoxicação, os animais foram pesados e eutanaziados para estudos necroscópicos. Os órgãos, baço, coração e fígado foram coletados para estudos histológicos.

3.3 ESTUDO DE TOXICIDADE CRÔNICA DA NP-LA₂O₃ POR UM PERÍODO DE 31 DIAS

Neste estudo, foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos, na qual os animais foram distribuídos aleatoriamente, com $n = 10$ em 4 grupos, descritos a seguir:

- Grupo 1: Controle
- Grupo 2: Administração de 1 mg kg^{-1} de nanopartículas de La₂O₃.
- Grupo 3: Administração de 10 mg kg^{-1} de nanopartículas de La₂O₃.
- Grupo 4: Administração de 100 mg kg^{-1} de nanopartículas de La₂O₃.

Os animais receberam as NPs por gavagem, na dose de 1; 10 e 100 mg kg^{-1} corpóreo, uma vez por dia, durante 31 dias, 5 dias por semana. No grupo controle, os animais receberam veículo (suspensão em água), em dose única. Todas as soluções foram administradas em volume igual a $1,0 \text{ mL kg}^{-1}$ corpóreo e entre as 16 e 17 horas.

Após o tratamento, os animais foram pesados e em seguida anestesiados com halotano (1-bromo-1-cloro-2,2,2-trifluoroetano) para serem eutanaziados. O baço, cérebro, coração, fígado, pâncreas, pulmão e rim foram coletados para os estudos de biodistribuição de La e avaliação do teor de microminerais e macrominerais. O sangue foi coletado por punção cardíaca para as análises bioquímicas e para determinação da concentração de La.

3.4 INSTRUMENTAÇÃO

As amostras de baço, cérebro, coração, fígado, pâncreas, pulmão, rim e sangue, foram decompostas em sistema fechado, utilizando um forno de micro-ondas modelo *SpeedWave (Microwave Digestion System, Berghof, Alemanha)* equipado com 12 frascos de TFM (Politetrafluoretileno modificado), com capacidade para 60 mL e temperatura e pressão máxima de trabalho de 260 °C e 40 atm, respectivamente. Para a decomposição de cerca de 250 mg de amostra, foram utilizados 4 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹. A mistura foi submetida a aquecimento durante 30 min a 900 W de potência com rampa de aquecimento de 10 min. Após arrefecimento, as soluções foram transferidas para frascos de polipropileno e avolumadas à 20 mL com água ultrapura e armazenadas à temperatura ambiente até a etapa de quantificação.

As determinações de cobalto, cobre, lantânio, manganês, molibdênio e selênio foram feitas em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRC II, PerkinElmer Sciex, Canadá), equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, EUA) e câmara de nebulização ciclônica de quartzo tipo *baffled* (PerkinElmer), tocha e tubo injetor de quartzo com 2 mm de diâmetro interno. A caracterização das amostras através da determinação de cálcio, ferro, potássio, fósforo, magnésio e zinco, após decomposição, foi feita utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha), equipado com nebulizador *cross-flow* e câmara de nebulização de vidro de duplo passo (tipo Scott), tocha e tubo injetor (2 mm de d.i.) de quartzo. As determinações utilizando ICP OES e ICP-MS foram feitas utilizando argônio de alta pureza (99,998%, White Martins, São Paulo, Brasil). As condições operacionais utilizadas no equipamento de ICP-MS e ICP OES estão apresentadas na Tabela 1 e foram utilizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Tabela 1 – Condições operacionais utilizadas para as determinações por ICP-MS e ICP OES.

Parâmetro	ICP-MS	ICP-OES
Potência do gerador de RF, W	1300	1400
Vazão de argônio principal, L min ⁻¹	15	15
Vazão de argônio auxiliar, L min ⁻¹	1,2	0,20
Vazão de argônio do nebulizador, L min ⁻¹	1,00	0,70
<i>Dwell time</i> , ms	40	-
Leituras	5	-
Leituras por replicata	3	3
Isótopos monitorados, m/z	¹³⁹ La, ⁵⁵ Mn, ⁶⁵ Cu, ¹³ C, ⁸² Se, ⁹⁸ Mo	-
Comprimentos de onda espectral, nm*	-	CaII (393,366), FeII (238,204), KI (766,490), MgI (285,213), PI (214,914), ZnII (206,200)

* I – linha atômica, II – linha iônica

Para obtenção das imagens de biodistribuição dos elementos foi usado um sistema de ablação com laser combinado com espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS). O sistema LA contém uma fonte de laser de estado sólido, composto pelo meio ativo de 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 0-100%, sendo que a energia nominal do feixe a 100% é de 15 mJ e o tempo da duração do pulso do laser é inferior a 6 ns. O sistema possui uma câmera CCD com resolução de até 2 µm, que permite a visualização da superfície da amostra. A amostra é inserida em uma câmara de ablação, de aproximadamente 50 mm de diâmetro e 50 mm de altura (volume de aproximadamente 80 mL) e que 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), que é executado em um computador fornecido com o instrumento. As condições operacionais do sistema LA-ICP-MS foram adaptadas de Nunes *et al.*⁶⁷ e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições operacionais para a análise de tecido animal por LA-ICP-MS.

LA-ICP-MS	Condição
Gás de arraste (Ar), L min ⁻¹	1,30
Diâmetro do feixe, µm	100
Velocidade de varredura, µm s ⁻¹	100
Frequência do pulso de laser, Hz	20
Energia*, %	15

*A energia de 100% corresponde a 15 mJ.

As imagens da distribuição dos elementos, foi obtida através da intensidade dos sinais gerados pelo ICP-MS, exportado os dados no formato .xls e processados no programa MATLAB, versão 7.9.0, o qual foi programado o comando com informações do número de linhas de ablação e a quantidade total de medidas durante a análise.

Para os procedimentos de pesagem foi utilizada uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu do Brasil, Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g e uma microbalança (modelo M2P, Sartorius, Alemanha) com resolução de 0,001 mg e carga máxima de 2 g.

Para a homogeneização das soluções de NP-La₂O₃ foi utilizado um banho de ultrassom multifrequência (modelo Transsonic TI-H-5, Elma, Alemanha) com potência efetiva de 100 W e frequência de 25/45 kHz.

3.5 REAGENTES E SOLUÇÕES

A água utilizada foi previamente destilada, deionizada em coluna de troca iônica e posteriormente purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, EUA), obtendo resistividade final de 18,2 MΩ cm. Ácido nítrico P.A. (65%, 1,4 kg L⁻¹, 14,4 mol L⁻¹, Vetec, Brasil), utilizado na decomposição das amostras, foi purificado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália).

As nanopartículas de La₂O₃ foram adquiridas da Nanostructured & Amorphous Materials, Inc. (Houston, TX, USA). As propriedades físico-químicas das nanopartículas, informadas pelo fabricante, estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas das nanopartículas de La₂O₃.

Propriedade	La₂O₃
Tamanho	15 – 30 nm
Morfologia	Esféricas
Pureza	99,99%

Para a determinação de Cu, Co, La, Mn, Mo e Se por ICP-MS, as soluções de calibração foram preparadas a partir da diluição de uma solução de referência multielementar com concentração de 10 mg L⁻¹ (SCP33MS, SCP Science, Canadá) em HNO₃ 5% (v/v). As soluções da curva de calibração para a determinação de Ca, Fe, K, P, Mg e Zn por ICP-OES, foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque multielementar a 1000 mg L⁻¹ (Merck IV, Certipur, Estados Unidos).

3.6 VALIDAÇÃO DAS ANÁLISES POR ICP-MS, ICP OES E LA-ICP-MS

As determinações de Ca, Co, Cu, Fe, K, La, Mg, Mn, Mo, P, Se e Zn por ICP-MS e ICP OES foram feitas de acordo com as condições descritas na Tabela 1. Para a verificação da exatidão dos resultados obtidos pelo método de decomposição foi utilizado material de referência certificado (CRM) biológico, tecido de ostra do NIST 1566a (Oyster Tissue, National Institute of Standards and Technology, USA), o qual foi decomposto nas mesmas condições descritas acima. O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) também foram determinados.

Os dados são avaliados pela análise de variância de uma via (ANOVA), com pós teste de Tukey ou teste *t-Student*, ambos com nível de confiança de 95%.

As análises para a obtenção de imagens por LA-ICP-MS foram feitas de forma qualitativa, sendo as condições descritas na Tabela 2.

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O sangue foi coletado através da punção cardíaca e transferido para tubos sem anticoagulante e em seguida centrifugado a 2500 g durante 15 min e o soro foi separado e congelado a -20 °C, para posterior análise. Dentre as análises bioquímicas realizadas, incluem creatinina, uréia, gama glutamil transpeptidase,

transaminase oxalacética e transaminase pirúvica. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.8 HISTOLOGIA

O baço, coração e fígado foram removidos e acondicionados em uma solução tampão de formaldeído (10% v/v) durante 24 h. Após a desidratação dos órgãos, foi adicionado parafina e em seguida o material foi seccionado em fatias de 6 micrômetros de espessura utilizando um micrótomo manual. A avaliação histológica foi feita através de um microscópio (OLYMPUS CX21 microscópio, OLYMPUS câmera). A análise e o parecer dos resultados, foram realizados por um patologista.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos estudos de toxicidade oral aguda e crônica das NPs-La₂O₃, sua biodistribuição e os possíveis efeitos da administração das NPs sobre outros elementos biologicamente importantes nos diferentes órgãos (baço, cérebro, coração, fígado, pâncreas, pulmão e rim) e sangue total dos ratos, após 31 dias de tratamento. Também serão apresentados os resultados da análise bioquímica, como contribuição para análise toxicológica.

4.1 ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

O teste de toxicidade oral aguda foi feito como descrito no item 3.2 (seção *Materiais e Métodos*). Esse teste foi realizado devido ao pouco conhecimento sobre a toxicidade das NP-La₂O₃, uma vez que não foram encontrados na literatura estudos de toxicidade oral aguda em ratos. O estudo da dose letal é de fundamental importância para os estudos sobre bioacumulação, uma vez que é necessário saber a dose máxima que pode ser administrada sem que ocorra a morte do animal.

Após a administração da dose máxima de 2000 mg kg⁻¹ corpóreo, os animais foram monitorados durante 15 dias e não foram observadas alterações comportamentais, sintomas de intoxicação ou mortalidade. Sendo assim, os animais foram pesados e em seguida eutanaziados. O baço, fígado e coração foram então coletados e acondicionados em uma solução de formaldeído tamponada para posterior análise histológica. O pâncreas, rim e cérebro foram retirados e pesados a fim de relacionar a razão entre a massa do órgão com a massa corpórea, após a administração das NP-La₂O₃. A massa corpórea dos animais antes e depois do tratamento, bem como a relação da massa dos órgãos com a massa corpórea dos animais que receberam diferentes concentrações da solução das NP-La₂O₃ estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Massa corpórea dos ratos antes e depois de serem submetidos ao tratamento com NP-La₂O₃ e a massa dos órgãos relacionada à massa corpórea (n = 1).

Concentração NP-La ₂ O ₃	Massa corpórea (g)		Pâncreas (%)	Rim (%)	Cérebro (%)
	Antes	Depois			
Controle	268	280	0,233	0,345	0,753
50 mg kg ⁻¹	246	268	0,372	0,388	0,716
300 mg kg ⁻¹	242	266	0,301	0,359	0,778
2000 mg kg ⁻¹	237	258	0,303	0,399	0,689

De uma maneira geral, foi observado que os tratamentos com as NPs não tiveram influência no aumento ou diminuição de massa corpórea dos animais e não foram observadas alterações na massa dos órgãos quando administradas diferentes dosagens das NP-La₂O₃. Neste período de observação, os animais não apresentaram sintomas de intoxicação e nem mortalidade, sendo assim, não se detectou dose letal.

4.1.1 Análise Histológica

A análise histológica foi realizada no fígado, baço e coração no período de 14 dias após a exposição dos ratos às NP-La₂O₃. A Figura 1, demonstra a análise histológica do fígado.

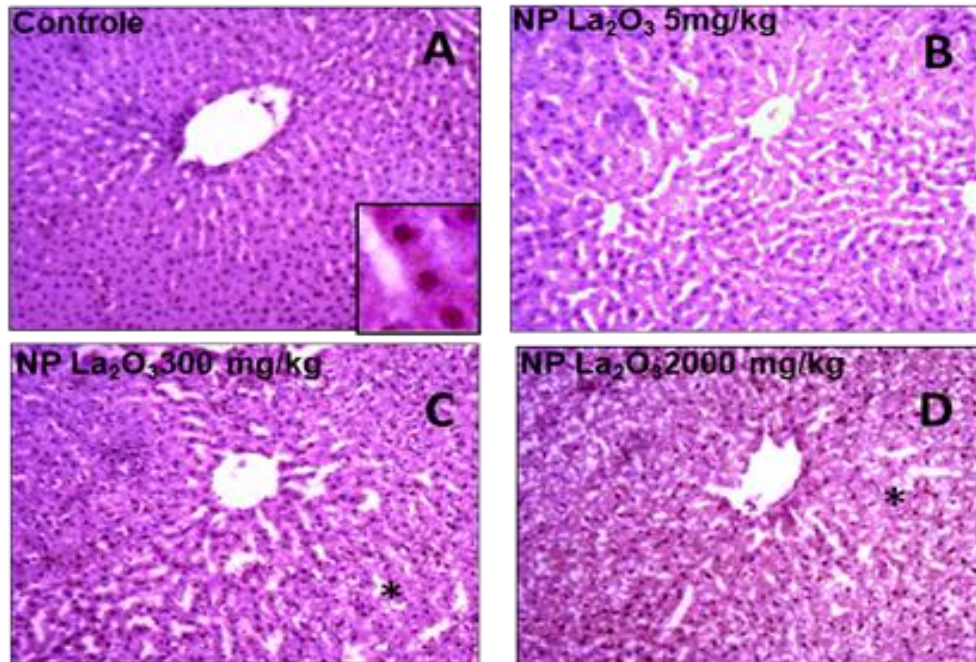


Figura 1 – Análise histológica de fígado. (A) Rato controle e rato submetido a, (B) NP-La₂O₃ 5 mg kg⁻¹, (C) NP-La₂O₃ 300 mg kg⁻¹ e (D) NP-La₂O₃ 2000 mg kg⁻¹. (H&E 10X – Detalhes 40X)

É possível observar, nesta figura, que o órgão do rato controle apresenta histologia normal com hepatócitos arranjados radialmente da veia central em direção à periferia do lóbulo. Do mesmo modo, para a administração da dose de 5 mg kg⁻¹ de NP-La₂O₃, não houveram alterações histológicas. Já no caso do fígado dos animais expostos às doses de 300 mg kg⁻¹ e 2000 mg kg⁻¹ de NP-La₂O₃, 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 *.

Na Figura 2, está apresentada a análise histológica do baço do rato controle e do rato após administração de 2000 mg kg⁻¹ de NP-La₂O₃.

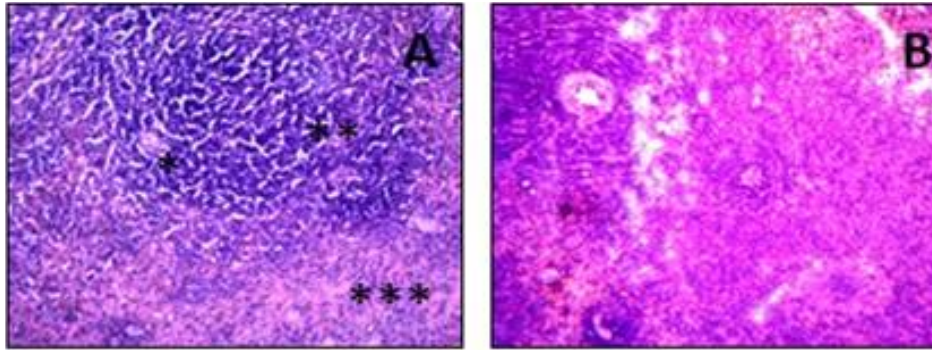


Figura 2 – Análise histológica do baço. (A) Rato controle e (B) rato submetido a tratamento com NP-La₂O₃ 2000 mg kg⁻¹ (H&E 10X)

Observa-se em (A), na Figura 2, o órgão controle, de histologia normal com (*) arteríola central, (**) polpa branca e (***) polpa vermelha, enquanto que em (B) dose de 2000 mg kg⁻¹ de NP-La₂O₃, representativo das demais doses, com histologia normal quando comparada ao controle.

A análise histológica do coração está apresentada na Figura 3.

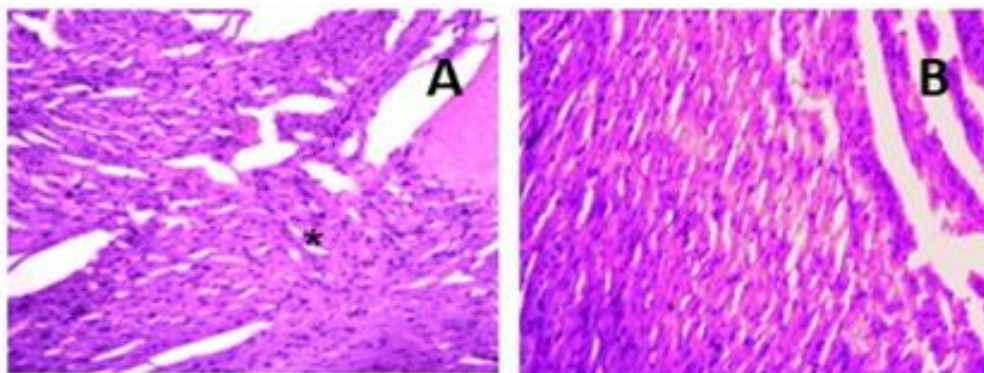


Figura 3 – Análise histológica de coração. (A) Rato controle e (B) rato submetido a tratamento com NP-La₂O₃ 2000 mg kg⁻¹. (H&E10X)

Em (A), na Figura 3, o controle demonstra histologia normal, com células musculares com núcleo central (*), e em (B) a dose de 2000 mg kg⁻¹ de NP-La₂O₃ é representativa das demais doses, com histologia normal quando comparado ao controle.

Conforme as análises histológicas do fígado, as doses de 300 mg kg⁻¹ e 2000 mg kg⁻¹ apresentaram pequenas lesões hepáticas. Por conta disso, foi decidido continuar os estudos de toxicidade com dose repetida administrando concentrações

inferiores a 300 mg kg^{-1} , tendo em vista o bem-estar e segurança dos animais. No entanto, cabe mencionar que com base nos resultados obtidos nas análises de intoxicação oral aguda e histológica, em que não foram observadas alterações comportamentais, sintomas de intoxicação ou mortalidade, além de histologia normal no tecido hepático, é possível inferir que a DL50 estimada para administração oral de NP-La₂O₃ em ratos é maior do que 2000 mg kg^{-1} corpóreo.

4.1.2 Análise de biodistribuição por LA-ICP-MS

Para análise de biodistribuição foi utilizado uma região do fígado de rato que teve tratamento com dose de 2000 mg kg^{-1} . Para tal, a amostra passou por um processo de desidratação em uma solução tampão de formaldeído a 10% (v/v). Após este processo, foi adicionada parafina para seccionar a amostra em fatias de 30 micrômetros de espessura utilizando um micrótomo manual. As fatias de fígado foram fixadas em lâminas de vidro e armazenadas em um frasco fechado sob temperatura ambiente, para posterior análise.

Para a análise de biodistribuição das NP-La₂O₃ nas fatias de fígado foi utilizada a técnica de LA-ICP-MS. As condições operacionais estão descritas na Tabela 2, do item 3.4 (seção *Materiais e Métodos*). Para ablação do fígado, foi aplicado o modo de ablação de múltiplas linhas, obtendo-se um total de 107 linhas abladadas 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 6 horas.

O ¹³C foi utilizado para a normalização do sinal analítico. O processamento dos dados para obtenção das bioimagens foi feito empregando o programa MATLAB. A fotografia da amostra de fígado e as bioimagens para a análise de distribuição dos elementos obtidas por LA-ICP-MS, estão mostradas na Figura 4.

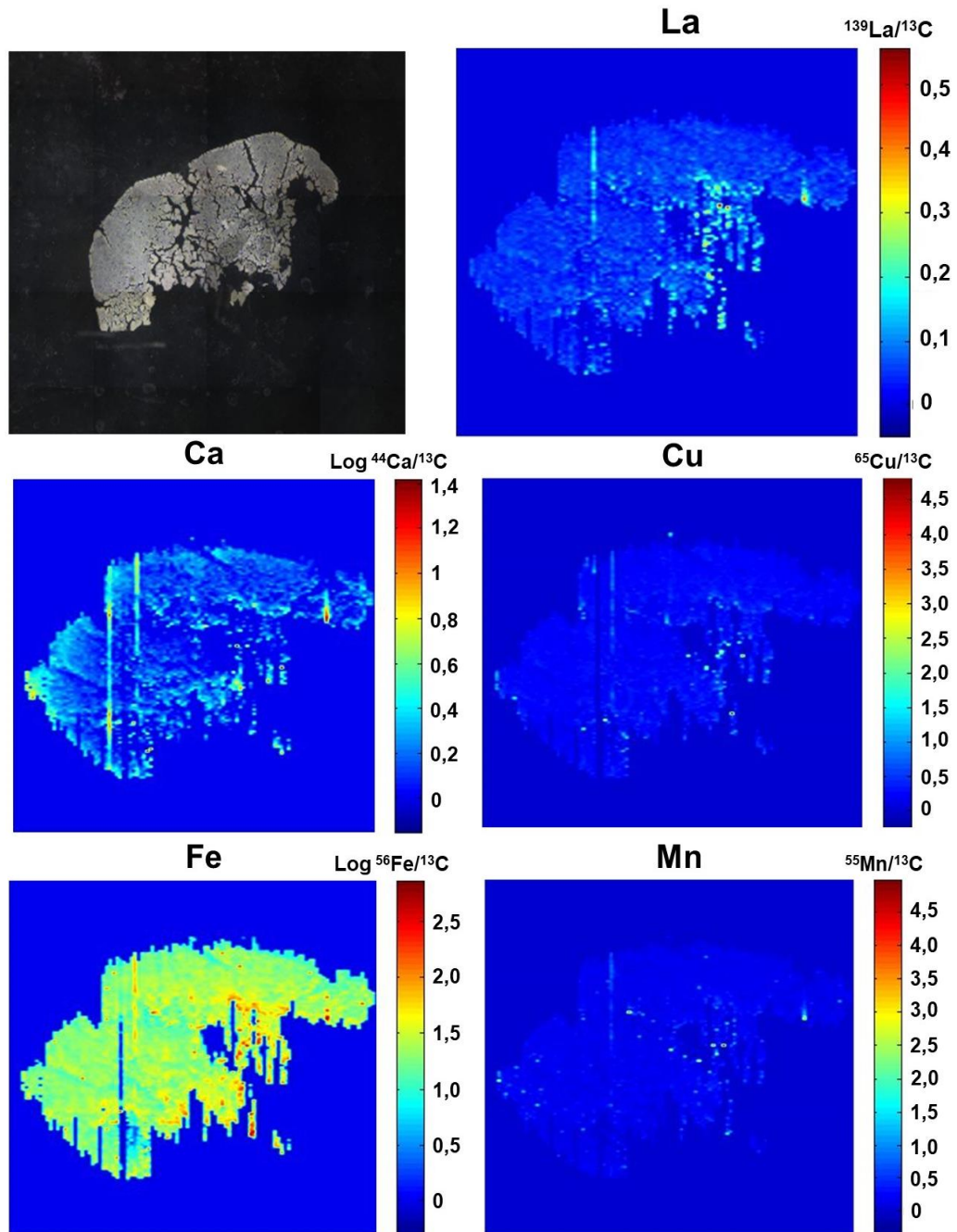


Figura 4 – Bioimagens da distribuição de La e outros elementos em fígado de rato exposto a 2000 mg kg^{-1} de La_2O_3 . Condições operacionais do instrumento LA-ICP-MS de acordo com a Tabela 2.

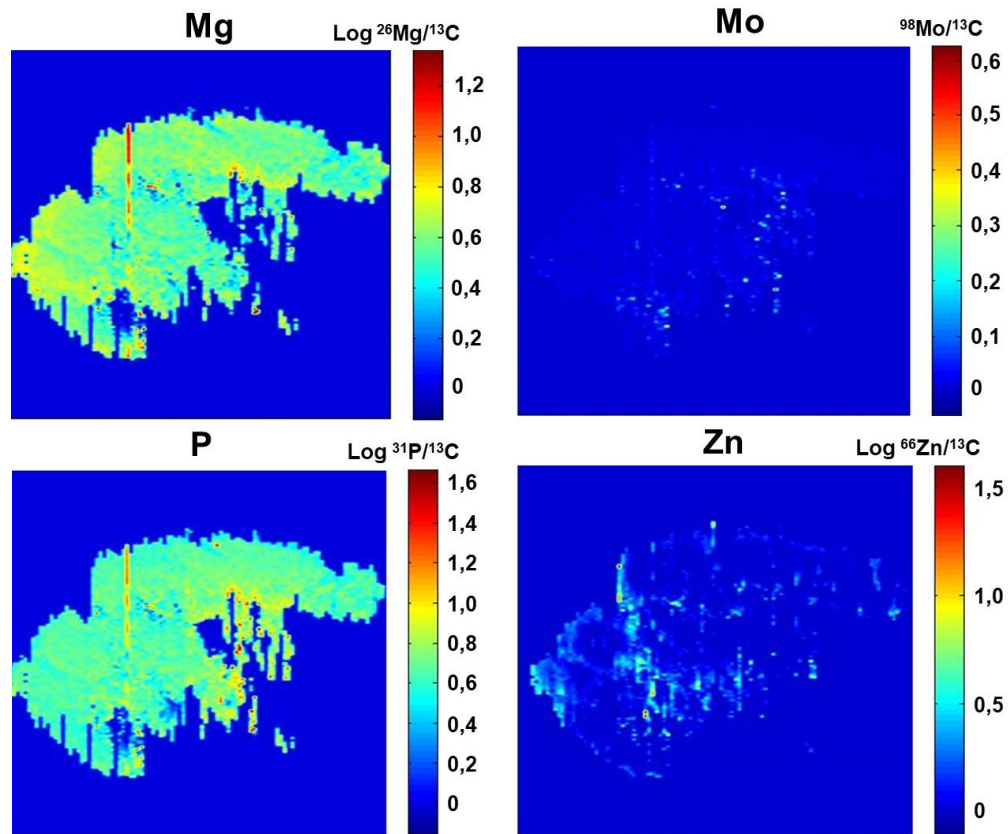


Figura 4 – Continuação

De acordo com a bioimagem obtida para o elemento La, é possível observar o seu acúmulo na região central do fígado. Para os demais elementos, é necessário a obtenção da bioimagem do mesmo órgão do animal controle, sendo assim, não é possível concluir se ocorreu alguma interferência na alteração na concentração destes elementos no fígado em decorrência da administração das NPs nos animais.

No entanto, esta técnica é uma alternativa para o estudo de biodistribuição, possuindo assim um potencial para aplicações na área da biomedicina pois é possível avaliar a distribuição espacial dos elementos em tecidos, para melhor entender processos biológicos, bem como compreender rotas de acúmulo de substâncias não essenciais ao organismo como, por exemplo, nanopartículas. Além disso, na análise de biodistribuição por LA-ICP-MS é possível a análise quantitativa.⁷⁰

4.2 ESTUDO DE TOXICIDADE CRÔNICA DA NP-La₂O₃ POR UM PERÍODO DE 31 DIAS

O estudo de toxicidade com dose repetida durante 31 dias foi realizado de acordo com item 3.3 (seção *Materiais e Métodos*), com a finalidade de avaliar em qual órgão ocorre o acúmulo das NP-La₂O₃, bem como avaliar possíveis alterações na concentração de macro e microminerais nos órgãos estudados.

Para o estudo de toxicidade com dose repetida, foram administrados 300 µL de solução aquosa com concentração de 1, 10 e 100 mg kg⁻¹. No caso dos animais do grupo controle, foram administrados 300 µL de água ultrapura da mesma forma de administração das nanopartículas nos ratos do grupo de tratamento, para que todos animais sejam submetidos pelo mesmo nível de estresse.

Durante o tratamento, os animais permaneceram sob observação diária e pesados semanalmente. Durante este período 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.

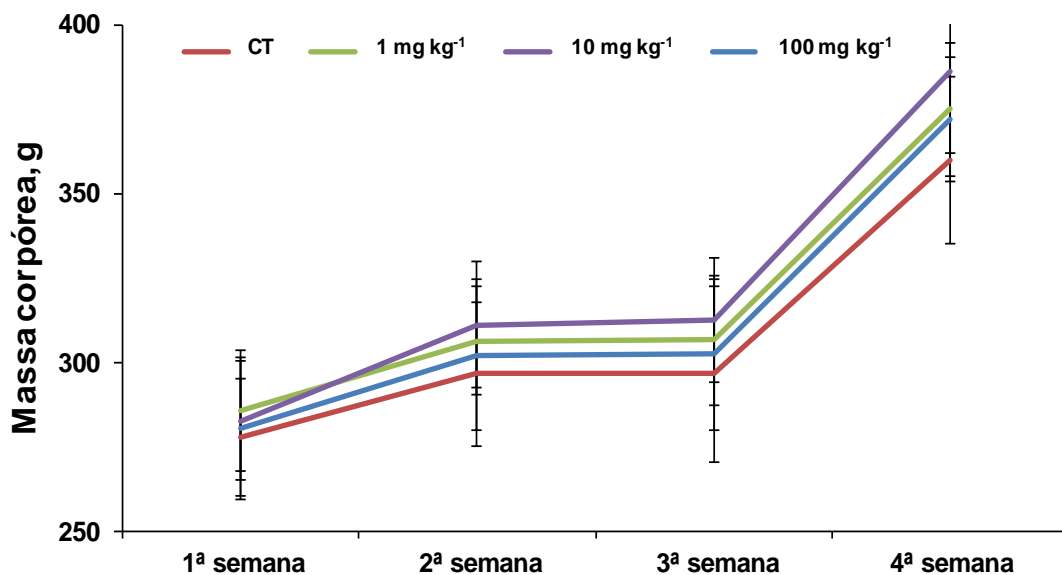


Figura 5 – Variação da massa corpórea dos animais no período de 4 semanas, (n = 10). CT: animal controle.

Não foi observada diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$) significativa da massa corpórea entre os grupos, sendo que todos os animais tiveram um aumento de massa corporal no final do tratamento, conforme ocorre naturalmente para os animais, pois ratos de 60 a 120 dias estão no período jovem-adulto, ainda sob crescimento corporal, de acordo com a OECD.⁶⁹

No 32º dia, os animais foram pesados e eutanaziados, em seguida, os órgãos foram coletados e pesados. A relação da massa dos órgãos com o peso corpóreo, não teve diferença significativa entre os ratos sob os tratamentos com as NPs e os ratos controle. A relação da massa do órgão com a massa corpórea está descrita na Tabela 5.

Tabela 5 – Relação da massa dos órgãos com a massa corpórea de ratos após 31 dias de tratamento com NP-La₂O₃. Os valores representam a média e o desvio padrão (SD) para n = 10.

Parâmetro	DOSE mg kg ⁻¹			
	0	1	10	100
Cérebro (%)	0,533 ± 0,038	0,539 ± 0,044	0,502 ± 0,182	0,536 ± 0,043
Fígado (%)	3,47 ± 0,11	3,66 ± 0,45	3,63 ± 1,29	3,80 ± 0,55
Rim esquerdo (%)	0,353 ± 0,150	0,357 ± 0,036	0,372 ± 0,036	0,368 ± 0,032
Rim direito (%)	0,340 ± 0,144	0,351 ± 0,027	0,366 ± 0,038	0,362 ± 0,037
Baço (%)	0,177 ± 0,012	0,189 ± 0,016	0,182 ± 0,022	0,178 ± 0,015
Pulmão direito (%)	0,121 ± 0,018	0,124 ± 0,009	0,138 ± 0,024	0,135 ± 0,028
Coração (%)	0,332 ± 0,031	0,340 ± 0,022	0,361 ± 0,054	0,337 ± 0,035
Pâncreas (%)	0,285 ± 0,027	0,245 ± 0,052	0,288 ± 0,031	0,255 ± 0,051

De acordo com a relação da massa do órgão com a massa corpórea, observa-se que não houveram diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle.

A avaliação de parâmetros bioquímicos séricos foi realizada em laboratório de análise clínicas de Santa Maria. Os parâmetros incluíram a análise de creatinina, ureia, GGT, ALT, AST em soro sanguíneo dos ratos controle e dos tratamentos. Os valores obtidos estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores bioquímicos séricos de ratos após 31 dias de tratamento com NP-La₂O₃, (n = 5).

Parâmetro	Controle	1 mg kg ⁻¹	10 mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹
Creatinina (mg dL⁻¹)	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Ureia (mg dL⁻¹)	47 ± 7	52 ± 8	51 ± 8	48 ± 3
GGT (U L⁻¹)	< 1	< 1	< 1	< 1
ALT (U L⁻¹)	132 ± 35	157 ± 13	140 ± 41	161 ± 32
AST (U L⁻¹)	48 ± 13	51 ± 6	49 ± 7	50 ± 8

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

Um aumento no valor de creatinina e uréia, pode indicar insuficiência renal. Se os rins não conseguem eliminar a creatinina e a ureia, provavelmente não conseguem eliminar outras substâncias produzidas pelo metabolismo. No caso dos ratos em estudo, os níveis de creatinina e ureia se mantiveram similares com o aumento da concentração da dosagem de NP-La₂O₃ administrada, bem como com relação aos animais controle. O GGT, ALT e AST são indicadores de lesões hepáticas, no entanto, de acordo com os resultados obtidos da análise bioquímica em soro sanguíneo, não foram observadas diferenças significativas destes indicadores entre os ratos controle e os ratos do tratamento. Sendo assim, não foram identificados danos hepáticos e renais com administração de diferentes concentrações de NP-La₂O₃ até 100 mg kg⁻¹, durante 31 dias.

4.2.1 Determinação de lantânio por ICP-MS

A decomposição dos órgãos para posterior determinação de lantânio teve como objetivo avaliar em que órgão ocorreu maior acúmulo de La proveniente da administração das NP-La₂O₃. A determinação de La foi feita utilizando um equipamento de ICP-MS e foram utilizados os parâmetros operacionais descritos no item 3.4 (seção *Materiais e Métodos*). A fim de verificar possíveis interferências de matriz nos resultados, foram utilizados pelo menos dois fatores de diluição da solução de amostra. Contudo, não foram observadas interferências de matriz nos resultados.

A concentração de La no sangue para os animais controle e submetido à tratamento, ficaram abaixo do limite de detecção, que foi de 1 ng g^{-1} . Os demais resultados obtidos estão mostrados na Figura 6.

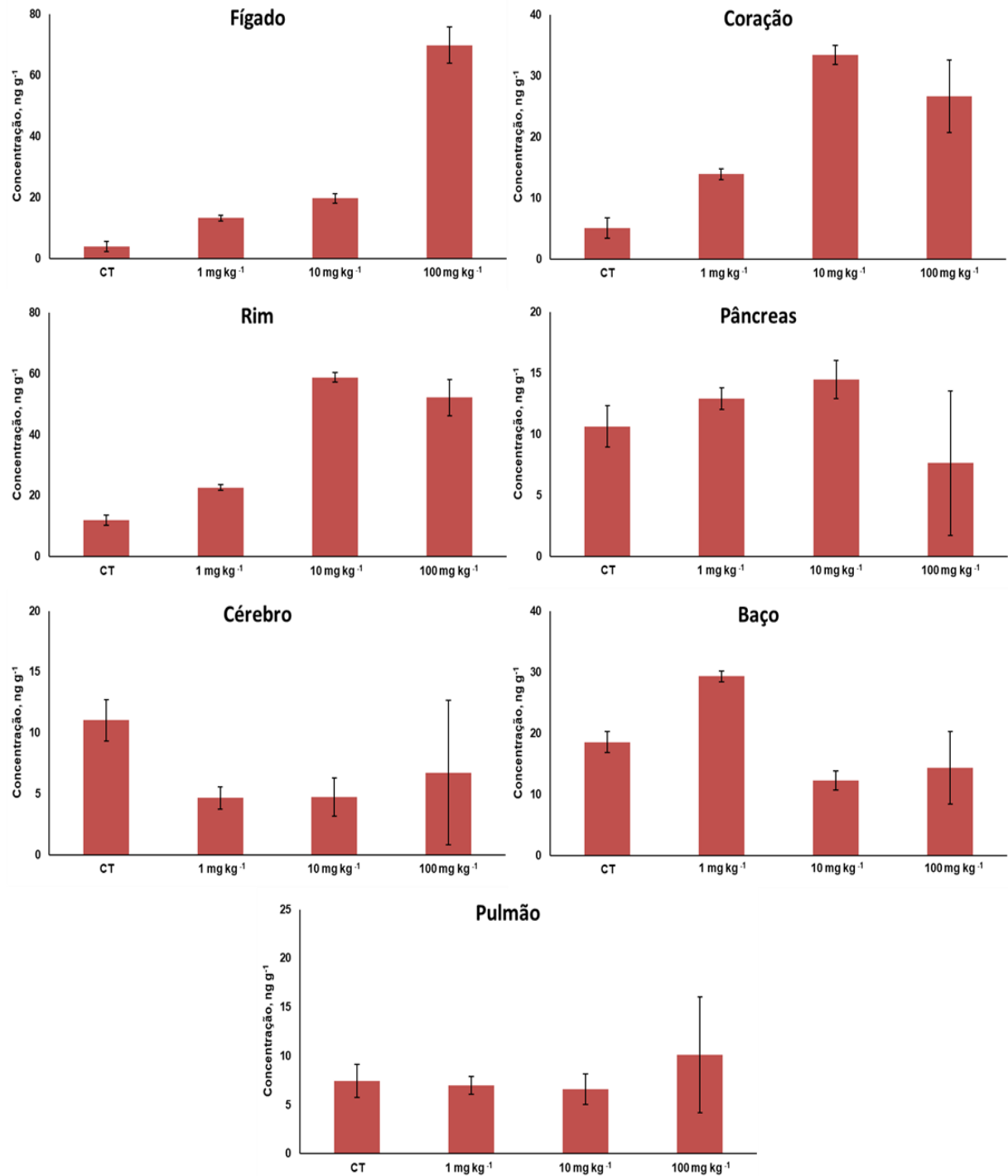


Figura 6 – Resultados obtidos por ICP-MS para La nos diferentes órgãos ($n = 3$), baço e pulmão ($n = 2$). As condições de determinação estão descritas na Tabela 1 (seção *Materiais e Métodos*).

Com base nos resultados apresentados na Figura 6, pode ser observado que a concentração de lantânio é maior no fígado, rim e coração, e aumenta de acordo com o aumento da concentração de NP-La₂O₃ administrada. Nestes órgãos, a taxa de absorção de La ficou entre 0,0002% e 0,005% da dose total administrada, a qual está de acordo com a taxa de absorção de NPs pouco solúveis, conforme relatado na literatura.⁷¹

O acúmulo de La no fígado pode ser explicado pela composição celular deste órgão. Nele estão contidas as células de Kupffer, as quais são responsáveis pela retirada de materiais "estranhos" que entram em contato com o órgão.³⁸ Devido a essa função celular, o fígado foi o órgão onde ocorreu um maior acúmulo de La na dose de 100 mg kg⁻¹ corpóreo.

A absorção de La no rim pode estar relacionada com a provável rota de eliminação das NPs pela urina, uma vez que a função do sistema renal é atuar como filtro de impurezas no organismo.³⁷

No coração, a absorção de NPs é um processo ainda pouco conhecido e relatado. Park *et al.*⁷² observaram acúmulo de nanopartículas de óxido de vanádio em maior concentração no coração, seguida do fígado, rim e baço. Entretanto, os autores relataram que seriam necessários mais estudos para avaliar os reais efeitos.

Nos demais órgãos analisados, não foram observadas diferenças significativas para a concentração de La entre os animais submetidos aos tratamentos e o controle. Nesse sentido, destaca-se como aspecto positivo o não acúmulo de La no cérebro, provavelmente devido a constituição da barreira hematoencefálica possuir tamanhos de poros menores do que 20 nm,³¹ não sendo possível a passagem das NP-La₂O₃, que possuem tamanho maior.

4.2.2 Determinação de macrominerais e microminerais

A relação do aumento ou decréscimo da concentração de macrominerais e microminerais em função da dose administrada em cada órgão foi realizada através da determinação Ca, Mg, K e P e Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn, respectivamente. Estas análises foram feitas utilizando as técnicas de ICP-OES e ICP-MS. Os parâmetros operacionais utilizados estão descritos no item 3.4 (seção *Materiais e Métodos*).

A concentração de macrominerais no fígado, coração, rim, pâncreas, cérebro, baço e pulmão do rato controle e os ratos submetidos ao tratamento, estão mostrados na Figura 7.

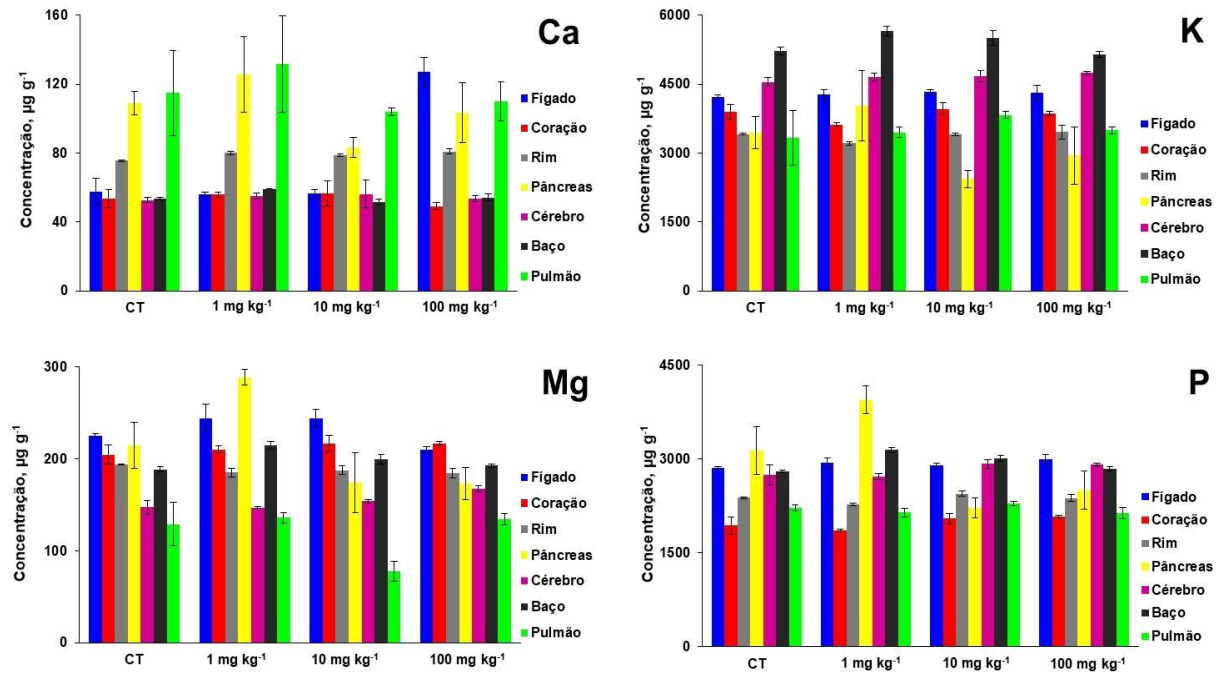


Figura 7 – Biodistribuição de macrominerais após 31 dias de exposição de NPs- La_2O_3 (n = 3).

Dentre os macrominerais quantificados, P e K são os elementos mais abundantes encontrados nos órgãos monitorados. A concentração de Ca no fígado, rim e baço nos animais submetidos ao tratamento com as NPs teve diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$), comparado ao controle. A concentração de K é significativamente diferente apenas no baço, nas concentrações de 1 e 10 mg kg^{-1} , quando comparada com o controle. Diferença significativa também foi observado para Mg no fígado, pâncreas, cérebro, baço e pulmão e o P no rim, pâncreas e baço entre os animais tratados com as NPs e os animais controle. A biodistribuição de Ca, K, Mg e P, pode ser visualizada em cada órgão separadamente nos Anexos A, B, C e D, respectivamente.

Com relação à distribuição de microminerais nos órgãos pode-se observar na Figura 8, que a concentração de cobre é maior no fígado, cérebro, coração e rim.

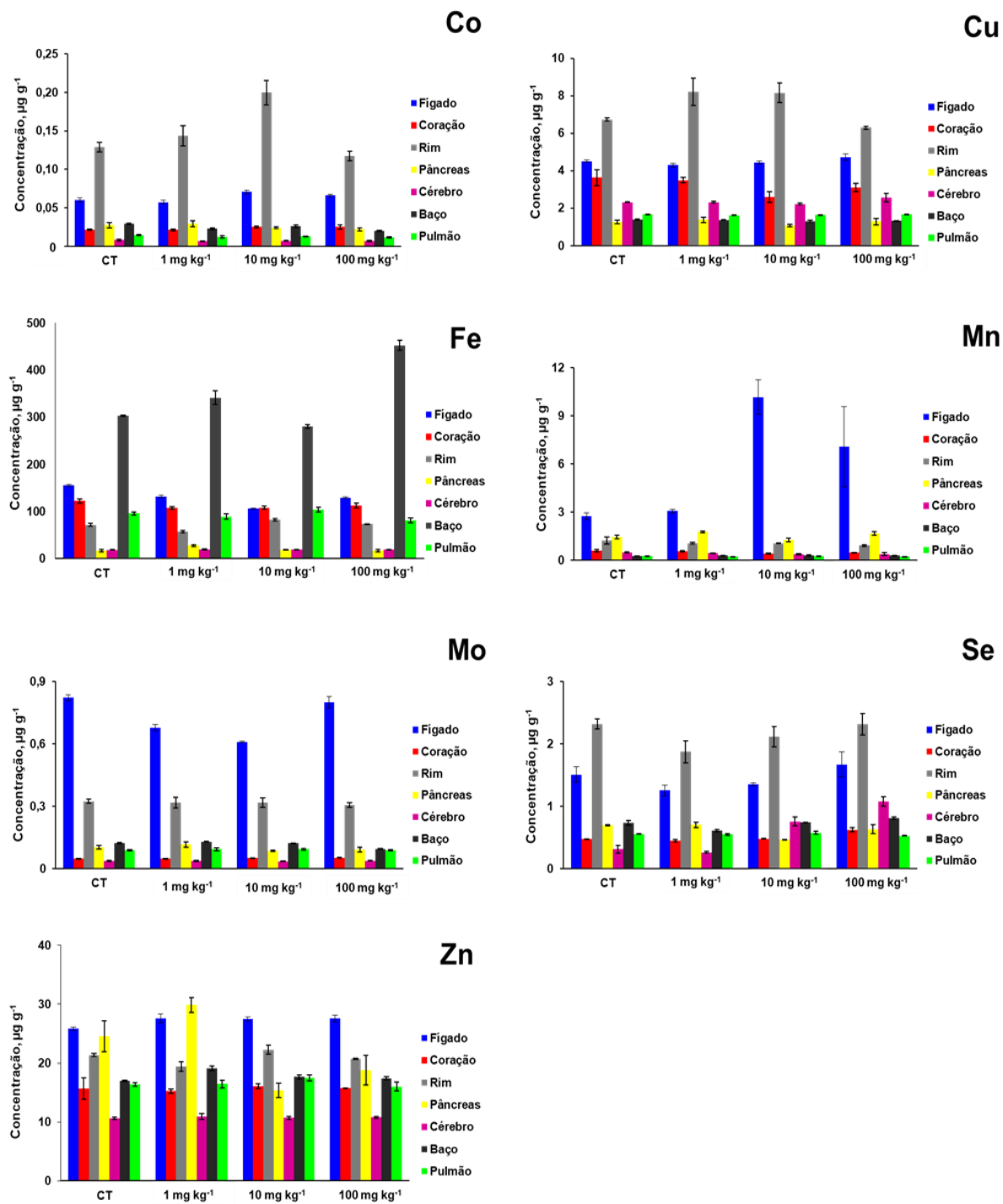


Figura 8 – Biodistribuição de microminerais após 31 dias de exposição de NPs- La_2O_3 ($n = 3$)

O Co é constituinte da cianocobalamina (vitamina B12) e é essencial para a função normal de todas as células.⁵⁷ Na determinação de Co foi observado que no fígado, rim e baço, houve diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$) entre os ratos controle e aqueles submetidos aos tratamentos. Ocorreu um aumento em torno de

20% para os tratamentos de 10 e 100 mg kg⁻¹ corpóreo, em comparação com o controle.

O Cu é co-fator de muitas enzimas, como a superóxido dismutase que possui a função de proteger o organismo contra oxidantes e radicais livres.⁵⁷ A concentração de Cu aumentou cerca de 20% no rim, nos tratamentos de 1 e 10 mg kg⁻¹ corpóreo. No tratamento de 100 mg kg⁻¹, a concentração obtida está na mesma faixa do controle.

O Fe é um elemento altamente reativo que pode interagir com o oxigênio para formar intermediários com o potencial de danificar membranas celulares ou degradar o DNA. Para que isso não ocorra, o Fe necessita estar ligado a proteínas.⁵⁷ Neste trabalho, a concentração de Fe diminuiu significativamente no fígado, coração e rim quando comparados os ratos controle e os ratos que foram submetidos ao tratamento com as NP-La₂O₃. A concentração de Fe no fígado (155 ± 8 µg g⁻¹) dos ratos submetidos ao tratamento com as NPs foi expressivamente maior do que o valor encontrado na literatura (35 µg g⁻¹)⁷³. Tal resultado pode estar associado a uma provável contaminação do Fe presente no sangue, através do contato do sangue com o órgão durante a coleta.

O Mn está presente em diversas enzimas e é responsável pela formação de tecido conjuntivo e esquelético.⁵⁷ A concentração de Mn nos ratos dos tratamento de 10 e 100 mg kg⁻¹, tiveram um aumento significativo no fígado e baço e diminuiu em torno de 12% no rim e pulmão. No pâncreas teve um aumento de 23% no tratamento de 1 mg kg⁻¹ comparado ao controle; nos demais tratamentos, a concentração permaneceu de acordo com o controle.

O Mo é constituinte de enzimas que catalisam as reações de oxidação-redução,⁵⁷ e teve uma diminuição significativa de 25% no fígado no tratamento de 10 mg kg⁻¹; no baço teve um aumento de 4% no tratamento de 1 mg kg⁻¹ e um aumento de 22% nos tratamentos de 10 e 100 mg kg⁻¹. No caso do Se, que está envolvido no metabolismo da gordura e atua como um antioxidante,⁵⁷ ocorreu um aumento de 31% da concentração no coração nos animais submetidos ao tratamento de 100 mg kg⁻¹ e um decréscimo de 33% no pâncreas nos animais com tratamento de 10 mg kg⁻¹; nos demais animais se manteve de acordo com o controle.

O Zn possui uma importante função na neurotransmissão e a redução da concentração do elemento pode prejudicar a memória.⁷⁴ Neste trabalho, a concentração de Zn no pâncreas dos animais controle teve um aumento de 20%

para o tratamento de 1 mg kg^{-1} e um decréscimo nos tratamentos de 10 e 100 mg kg^{-1} . Para os demais órgãos analisados, a concentração se manteve constante entre os animais submetidos aos tratamentos e o controle, sendo assim, não afetado pela administração das NP-La₂O₃. A biodistribuição de Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn, pode ser visualizada em cada órgão separadamente nos Anexos E, F, G, H, I, J e L, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos durante a análise elementar, pode ser observado que, de uma maneira geral, o rim e o fígado foram os órgãos mais afetados na variação de macrominerais e microminerais. Provavelmente, isso se deve ao fato de que o fígado tem como uma das funções o armazenamento e biotransformação das substâncias que recebe pela corrente sanguínea, entre elas as substâncias consideradas tóxicas para convertê-las em menos tóxicas e para isso, o fígado utiliza uma grande quantidade de enzimas. O rim é composto por milhares de unidades funcionais chamadas de néfrons, os quais auxiliam os rins a manter a homeostase de fluídos corporais e eletrólitos, bem como são responsáveis por filtrar carboidratos, proteínas e alguns íons e inclusive nanopartículas entre 10-15 nm.⁷⁵ Devido a estas funções particulares de cada órgão, pode ter ocorrido alguma alteração na composição de macro e microminerais, devido à absorção de nanopartículas de La₂O₃.

Cabe mencionar que, em um trabalho realizado por Feng *et al.*⁷⁴, a distribuição de Ca, Fe e Zn no cérebro sofreu alterações significativas após exposição de ratos à 0,1; 2 e 40 mg kg^{-1} de LaCl₃. Porém, no presente trabalho, no qual o tratamento foi feito empregando NP-La₂O₃, não foram observadas alterações na concentração desses mesmos elementos, quando comparados os animais do grupo de tratamento aos animais do grupo controle.

4.2.3 Validação dos resultados

Para avaliação da exatidão dos resultados, foi analisado um material de referência certificado de tecido biológico (NIST 1566a – *Oyster Tissue*), o qual foi digerido e analisado nas mesmas condições das amostras de tecidos de ratos. Além disso, foi determinado o limite de detecção e o limite de quantificação. O LOD e LOQ estão relacionados à quantidade mínima do analito que pode ser detectado e quantificado, respectivamente. São parâmetros frequentemente utilizados para

comparação de metodologias para análise quantitativa. Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos considerando a média e o desvio padrão de 10 medidas do branco para cada um dos analitos. O LOD foi expresso como três vezes o desvio padrão mais a concentração média do branco, enquanto que o LOQ foi expresso como dez vezes o desvio padrão mais a concentração média do branco. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados obtidos por ICP-MS em material de referência certificado e os respectivos LOD e LOQ da técnica (n = 3).

NIST 1566a				
Elemento	Valor Certificado	Valor determinado	LOD	LOQ
	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)
La	0,3*	$0,276 \pm 0,015$	0,001	0,003
Mn	$12,3 \pm 1,5$	$12,0 \pm 0,3$	0,001	0,004
Co	$0,57 \pm 0,11$	$0,53 \pm 0,09$	0,001	0,003
Cu	$66,3 \pm 4,3$	$62,9 \pm 1,8$	0,002	0,006
Se	$2,21 \pm 0,24$	$2,54 \pm 0,17$	0,022	0,073
Mo	n.i.**	$0,247 \pm 0,007$	0,001	0,002

*Valor informado

** (n.i.) Valor não informado

De acordo com a avaliação estatística (t-Student, nível $p < 0,05$), não houveram diferenças significativas entre os valores de concentração certificados e os valores determinados por ICP-MS.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As NP-La₂O₃ mostraram não ser tóxicas quando administradas oralmente em ratos na dose máxima de 2000 mg kg⁻¹ de peso corpóreo. Cabe destacar que esta toxicidade ainda não havia sido descrita na literatura para as NP-La₂O₃. De acordo com a análise histológica do fígado, as doses de 300 e 2000 mg kg⁻¹ apresentaram pequenas lesões hepáticas e os demais órgãos analisados obtiveram histologia normal.

A administração oral de NP-La₂O₃, para avaliação de toxicidade crônica, não provocou alterações significativas em parâmetros bioquímicos e na massa dos órgãos de ratos tratados com as NPs, nas concentrações de 1, 10 e 100 mg kg⁻¹ por peso corpóreo. Não foram observadas alterações comportamentais dos animais e outros aspectos visuais, como perda de pelo, desta forma não demonstrando características toxicológicas, através desse nanomaterial quando empregado em concentrações iguais ou abaixo de 100 mg kg⁻¹ por um período de 31 dias.

Em relação a distribuição de NP-La₂O₃, a partir da análise por ICP-MS, ocorreu maior acúmulo de La no fígado, rim e coração. A relação da concentração determinada nos órgãos, são crescentes de acordo com o aumento da concentração de NP-La₂O₃ administrada, sendo assim, ocorreu absorção de La proveniente das NP-La₂O₃. Em relação aos macro e microminerais, pode ser observado que o rim e o fígado foram os órgãos mais afetados na variação da concentração elementar.

Também foi mostrado que a LA-ICP-MS foi adequada para obtenção das bioimagens de distribuição espacial de La e outros elementos em fígado de rato tratado com 2000 mg kg⁻¹ de NP-La₂O₃. Porém, para melhores conclusões, é necessária a obtenção da bioimagem da distribuição dos elementos em fígado de rato controle, o que não foi feito no presente trabalho.

O que mais pode ser considerado para avaliação da interação de NPs com o organismo *in vivo*, e que não foi avaliado neste trabalho, é a solubilidade das NP-La₂O₃ no organismo e assim identificar se o La distribuído nos órgãos está na forma nanoparticulada ou iônica.

REFERÊNCIAS

1. MATTEIS, V. Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation. **Toxics** 5 (2017) 1-21.
2. BARTA, C. A. et al. Lanthanide containing compounds for therapeutic care in bone resorption disorders. **Dalton Trans.** (2007) 5019-5030.
3. HAQUE, N. et al. Rare Earth Elements: Overview of Mining, Mineralogy, Uses, Sustainability and Environmental Impact. **Resources** 3 (2014) 614-635.
4. BALUSAMY, B. et al. Characterization and bacterial toxicity of lanthanum oxide bulk and nanoparticles. **J. Rare Earths** 30 (2012) 1298-1302.
5. YANG, T. et al. Metabolizable lanthanum-coordination nanoparticles as efficient radiosensitizers for solid tumor therapy. **J. Mat. Chem. B** 5 (2017) 5137-5144.
6. TIWARI, S. et al. L-cysteine capped lanthanum hydroxide nanostructures for non-invasive detection of oral cancer biomarker. **Biosens. Bioelectron.** 89 (2017) 1042-1052.
7. YADAV, A. et al. Amperometric CO₂ gas sensor based on interconnected web-like nanoparticles of La₂O₃ synthesized by ultrasonic spray pyrolysis. **Microchim. Acta** 184 (2017) 3713-3720.
8. BECKER, J. S. et al. Detection of Zn-containing proteins in slug (Genus Arion) tissue using laser ablation ICP-MS after separation by gel electrophoresis. **Int. J. Mass Spectrom.** 307 (2011) 66-69.
9. BECKER, J. S. et al. Imaging of metals and metal-containing species in biological tissues and on gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): A new analytical strategy for applications in life sciences. **Pure Appl. Chem.** 80 (2008) 2643-2655.
10. WU, B.; BECKER, J. S. Imaging techniques for elements and element species in plant science. **Metallomics** 4 (2012) 403-416.
11. SADAUSKAS, E. et al. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. **Part. Fibre Toxicol.** 4 (2007) 10-17.
12. PARIVAR, K. et al. Evaluation of Iron Oxide Nanoparticles Toxicity on Liver Cells of BALB/c Rats. **Iran. Red. Crescent Med. J.** 18 (2016) e28939.
13. LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chem. Rev.** 108 (2008) 2064-2110.

14. BROCK, S. L., **Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications**. Londres: World Scientific Publishing, 2004.
15. TIWARI, J.; TIWARI, R.; KIM, K. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. **Prog. Mater. Sci.** 57 (2012) 724-803.
16. WANG, Y.; XIA, Y. Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals. **Nano Lett.** 4 (2004) 2047-2050.
17. SALATA, O. V. Application of nanoparticles in biology and medicine. **J. Nanobiotechnol.** 2 (2004) 1-6.
18. OLIVEIRA, L. F. et al. Functionalized silica nanoparticles as an alternative platform for targeted drug-delivery of water insoluble drugs. **Langmuir** 32 (2016) 3217-3225.
19. SCHLORF, T. et al. Biological properties of iron oxide nanoparticles for cellular and molecular magnetic resonance imaging. **Int. J. Mol. Sci.** 12 (2011) 12-23.
20. SHRIVASTAVA, S. et al. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology** 18 (2007) 225103.
21. OLIVEIRA, E. M. N. et al. Iron oxide nanoparticles labeled with an excited-state intramolecular proton transfer dye. **ChemPhysChem** 17 (2016) 3176-3180.
22. UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE. POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; JAGER, A. **Nanoparticle system comprising a oil and UV filter**. US2016256372A1. 08 set. 2016
23. SALAVATI-NIASARI, M.; HOSSEINZADEH, G.; DAVAR, F. Synthesis of lanthanum hydroxide and lanthanum oxide nanoparticles by sonochemical method. **J. Alloy. Compd.** 509 (2011) 4098-4103.
24. FRICKER, S. P. The therapeutic application of lanthanides. **Chem. Soc. Rev.** 35 (2006) 524-533.
25. CHAN, M. R. et al. Pilot Study of the Effect of Lanthanum Carbonate (Fosrenol®) In Patients with Calciphylaxis: A Wisconsin Network for Health Research (WiNHR) Study. **J. Nephrol. Ther.** 4 (2014) 162-165.
26. BRABU, B. et al. Biocompatibility studies on lanthanum oxide nanoparticles. **Toxicol. Res.** 4 (2015) 1037-1044.
27. LIU, J. et al. Antiviral activity of mixed-valence rare earth borotungstate heteropoly blues against influenza virus in mice. **Antivir. Chem. Chemother.** 11 (2000) 367-372.

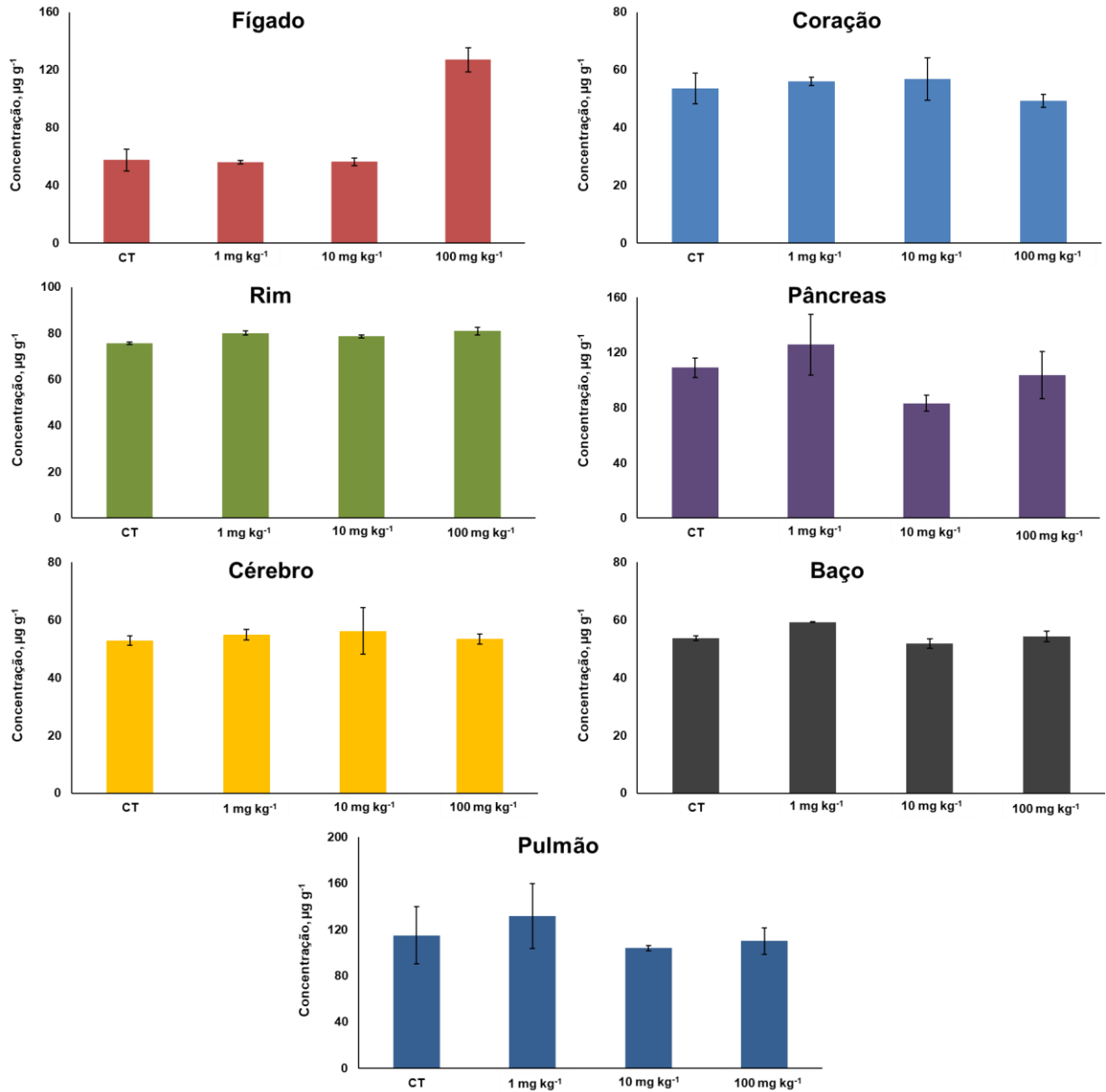
28. ADABI, M. et al. Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine. **Artif. Cell. Nanomed. Biotechnol.** 45 (2017) 833-842.
29. SHARIFI, S. et al. Toxicity of nanomaterials. **Chem. Soc. Rev.** 41 (2012) 2323-2343.
30. ZENG, C. J. et al. Emergence of hierarchical structural complexities in nanoparticles and their assembly. **Science** 354 (2016) 1580-1584.
31. NANCE, E. et al. Brain-penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration. **ACS Nano** 8 (2014) 10655-10664.
32. SISLER, J. D. et al. Toxicological Assessment of CoO and La₂O₃ Metal Oxide Nanoparticles in Human Small Airway Epithelial Cells. **Toxicol. Sci.** 150 (2016) 418-428.
33. Al, J. et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. **Int. J. Nanomed.** 6 (2011) 1117-1127.
34. LI, X. et al. Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity: effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity. **J. Biomed. Mater. Res. A** 103 (2014) 2499-2507.
35. LIMBECK, A. et al. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. **Anal. Bioanal. Chem.** 407 (2015) 6593-6617.
36. KERMANIZADEH, A. et al. Nanomaterial translocation-the biokinetics, tissue accumulation, toxicity and fate of materials in secondary organs-a review. **Crit. Rev. Toxicol.** 45 (2015) 837-872.
37. IAVICOLI, I.; FONTANA, L.; NORDBERG, G. The effects of nanoparticles on the renal system. **Crit. Rev. Toxicol.** 46 (2016) 490-560.
38. HALL, J. B. et al. Characterization of nanoparticles for therapeutics. **Nanomedicine** 2 (2007) 789-803.
39. YAH, C. S.; SIMATE, G. S.; IYUKE, S. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. **Pak. J. Pharm. Sci.** 25 (2012) 477-491.
40. KUMARI, M. et al. Genotoxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** 775 (2014) 7-19.
41. DUMALA, N. et al. Genotoxicity study of nickel oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. **Mutagenesis** 32 (2017) 417-427.
42. SRINIVAS, A. et al. Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. **Toxicol. Lett.** 205 (2011) 105-115.

43. NIU, J. L. et al. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. **Cardiovasc. Res.** 73 (2007) 549-559.
44. SISLER, J. D. et al. Differential pulmonary effects of CoO and La₂O₃ metal oxide nanoparticle responses during aerosolized inhalation in mice. **Part. Fibre Toxicol.** 13 (2016) 42-59.
45. AILLON, K. L. et al. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 61 (2009) 457-466.
46. OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology.** 245 (2008) 194-205.
47. HAUCK, T. S. et al. In vivo quantum-dot toxicity assessment. **Small.** 6 (2010) 138-144.
48. SA, L. T. et al. Biodistribution of nanoparticles: initial considerations. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 70 (2012) 602-604.
49. OCSOY, I. et al. Biomolecules incorporated metallic nanoparticles synthesis and their biomedical applications. **Mater. Lett.** 212 (2018) 45-50.
50. SAPTARSHI, S. R.; DUSCHL, A.; LOPATA, A. L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **J. Nanobiotechnol.** 11 (2013) 26.
51. GIL, A. G. et al. Toxicity and biodistribution of orally administered casein nanoparticles. **Food Chem. Toxicol.** 106 (2017) 477-486.
52. MAI, F. D. et al. Imaging of single liver tumor cells intoxicated by heavy metals using ToF-SIMS. **Appl. Surf. Sci.** 252 (2006) 6809-6812.
53. PUNSHON, T. et al. Application of synchrotron x-ray microbeam spectroscopy to the determination of metal distribution and speciation in biological tissues. **Spectrosc. Lett.** 38 (2005) 343-363.
54. 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. **Appl. Radiat. Isot.** 77 (2013) 68-75.
55. LOZANO, O. et al. Effects of SiC nanoparticles orally administered in a rat model: biodistribution, toxicity and elemental composition changes in feces and organs. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 264 (2012) 232-245.
56. CHO, W. S. et al. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. **Part. Fibre Toxicol.** 10 (2013) 1-9.

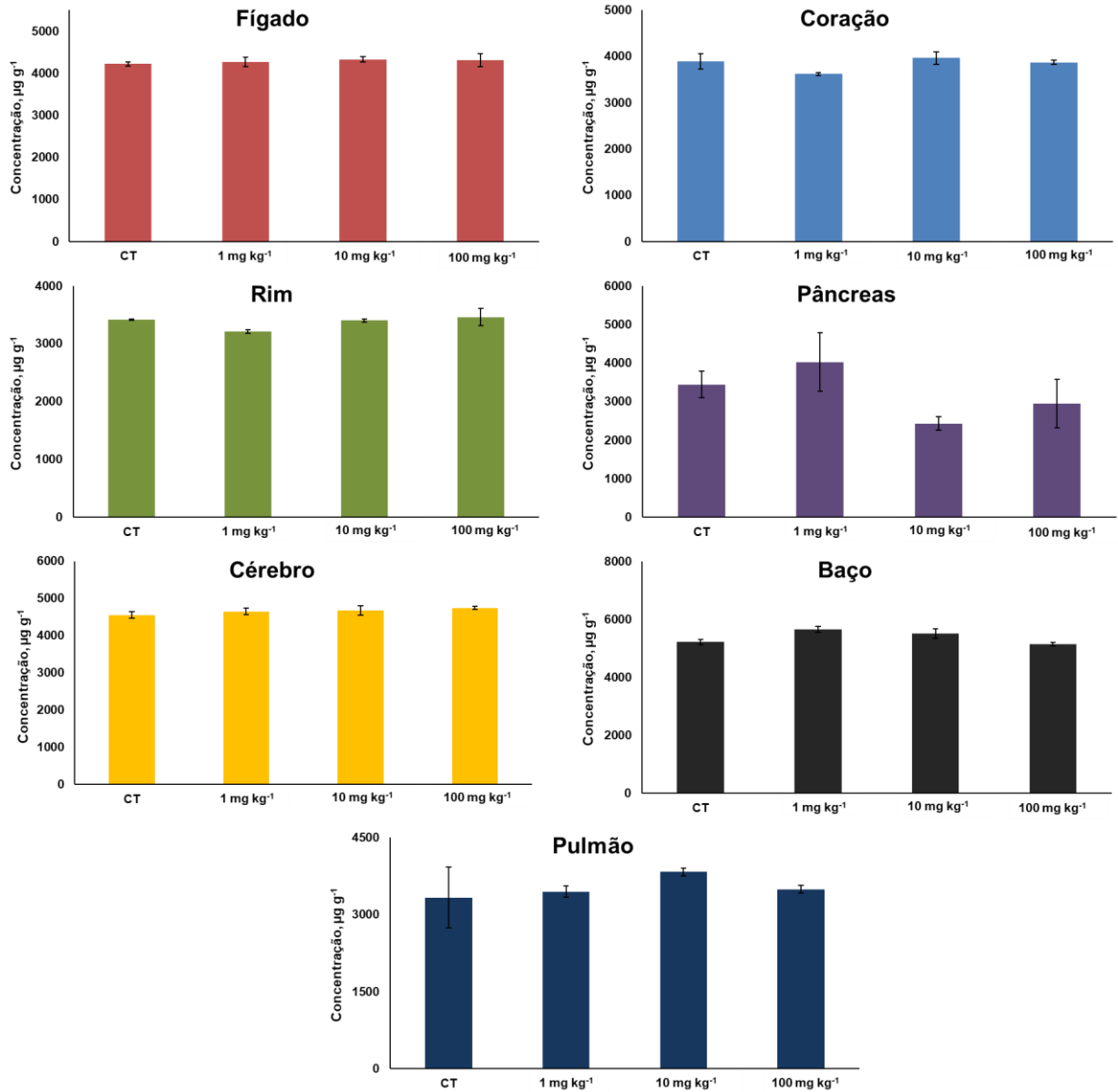
57. MAHAN, L. K., Krause: **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2005.
58. ABDULLA, M.; CHMIELNICKA, J. New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals. **Biol. Trace Elem. Res.** 23 (1989) 25-53.
59. WANDZILAK, A. et al. X-ray fluorescence study of the concentration of selected trace and minor elements in human brain tumours. **Spectroc. Acta Part. B-Atom. Spectr.** 114 (2015) 52-57.
60. POZEBON, D. et al. Biomonitoring of essential and toxic elements in small biological tissues by ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.** 23 (2008) 1281-1284.
61. BAKIRCIOGLU, D. et al. Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey. **Microchem. J.** 136 (2018) 133-138.
62. TAYLOR, A. et al. Atomic spectrometry update: review of advances in the analysis of clinical and biological materials, foods and beverages. **J. Anal. At. Spectrom.** 32 (2017) 432-476.
63. WEHE, C. A. et al. Elemental bioimaging by means of fast scanning laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 26 (2015) 1274-1282.
64. 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. **J. Anal. At. Spectrom.** 29 (2014) 2204-2228.
65. DURRANT, S. F. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects. **J. Anal. At. Spectrom.** 14 (1999) 1385-1403.
66. JUROWSKI, K. et al. A standard sample preparation and calibration procedure for imaging zinc and magnesium in rats' brain tissue by laser ablation-inductively coupled plasma-time of flight-mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** 29 (2014) 1425-1431.
67. NUNES, M. A. et al. External calibration strategy for trace element quantification in botanical samples by LA-ICP-MS using filter paper. **Anal. Chim. Acta** 905 (2016) 51-57.
68. SARKAR, B. Treatment of Wilson and Menkes diseases. **Chem. Rev.** 99 (1999) 2535-2544.

69. OECD, **Guideline 425**, Guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity - Up-and-Down Procedure, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.
70. URGAST, D. S.; BEATTIE, J. H.; FELDMANN, J. Imaging of trace elements in tissues: with a focus on laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care** 17 (2014) 431-439.
71. GEISER, M.; KREYLING, W. G. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. **Part. Fibre Toxicol.** 7 (2010) 1-17.
72. PARK, E. J. et al. Comparison of distribution and toxicity following repeated oral dosing of different vanadium oxide nanoparticles in mice. **Environ. Res.** 150 (2016) 154-165.
73. PEIXOTO, N. C. et al. Changes in levels of essential elements in suckling rats exposed to zinc and mercury. **Chemosphere** 72 (2008) 1327-1332.
74. FENG, L. et al. Neurotoxicological consequence of long-term exposure to lanthanum. **Toxicol. Lett.** 165 (2006) 112-120.
75. ARAMI, H. et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. **Chem. Soc. Rev.** 44 (2015) 8576-8607.

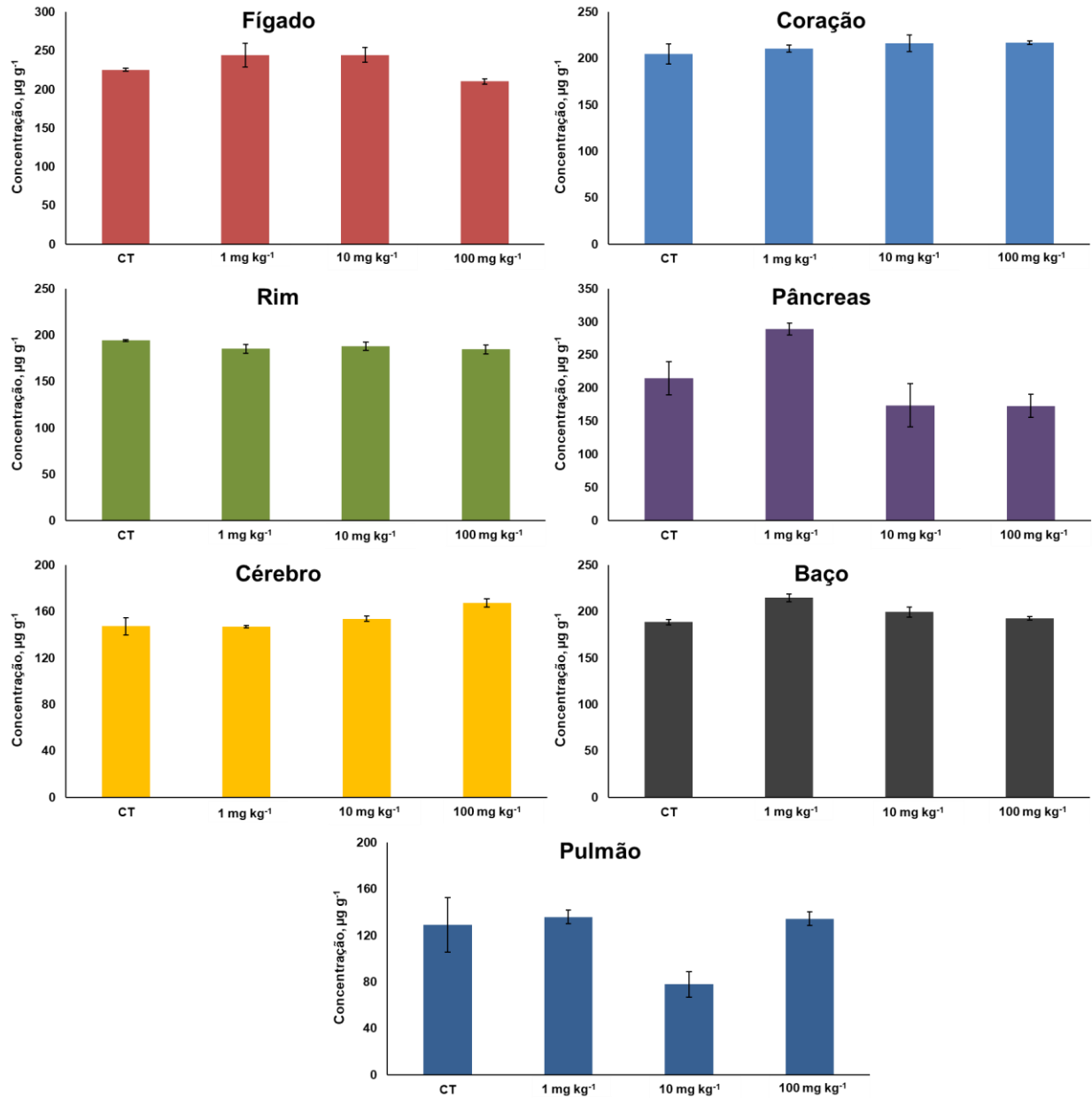
ANEXO A - BIODISTRIBUIÇÃO DE CÁLCIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



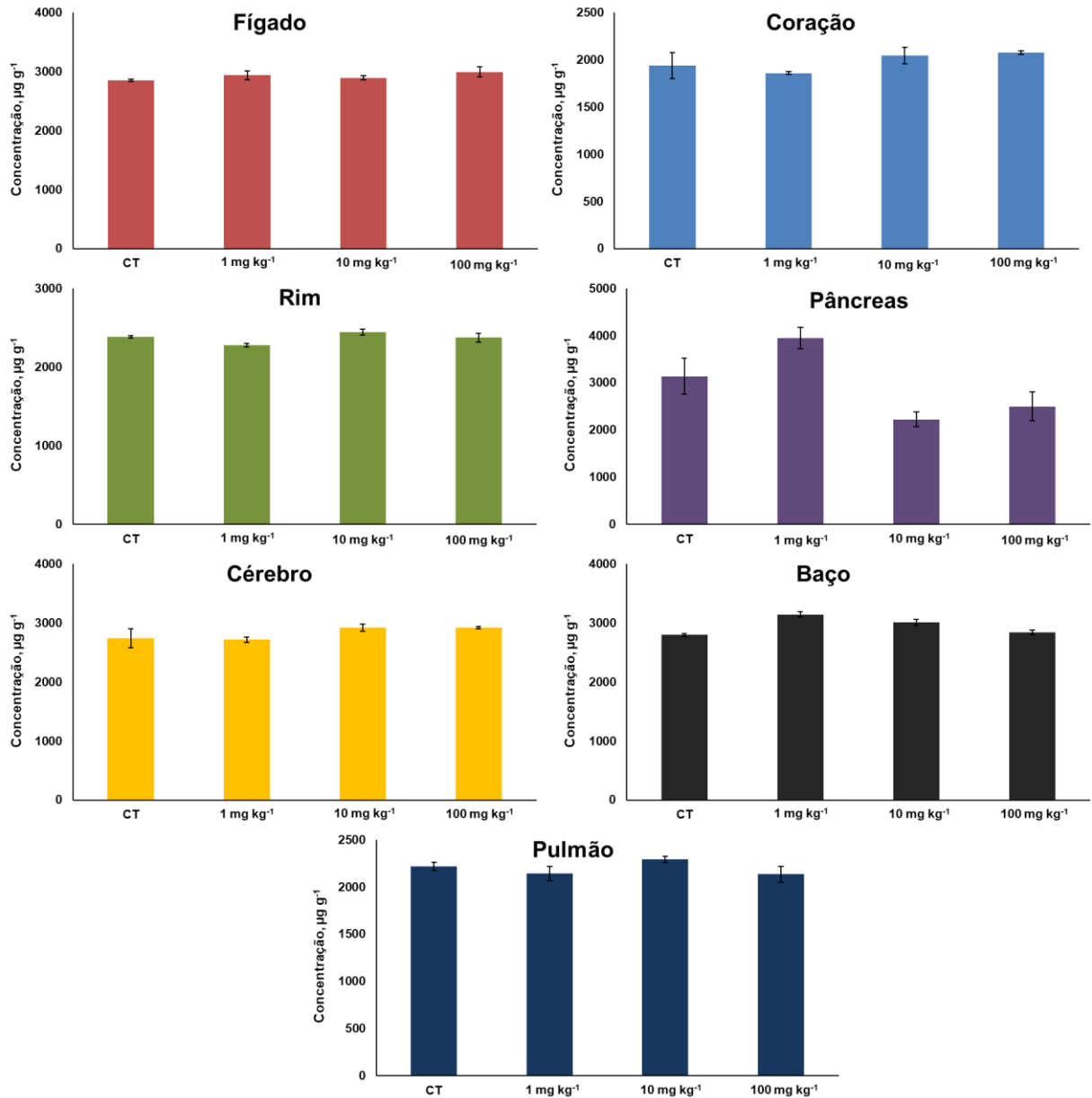
ANEXO B - BIODISTRIBUIÇÃO DE POTÁSSIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



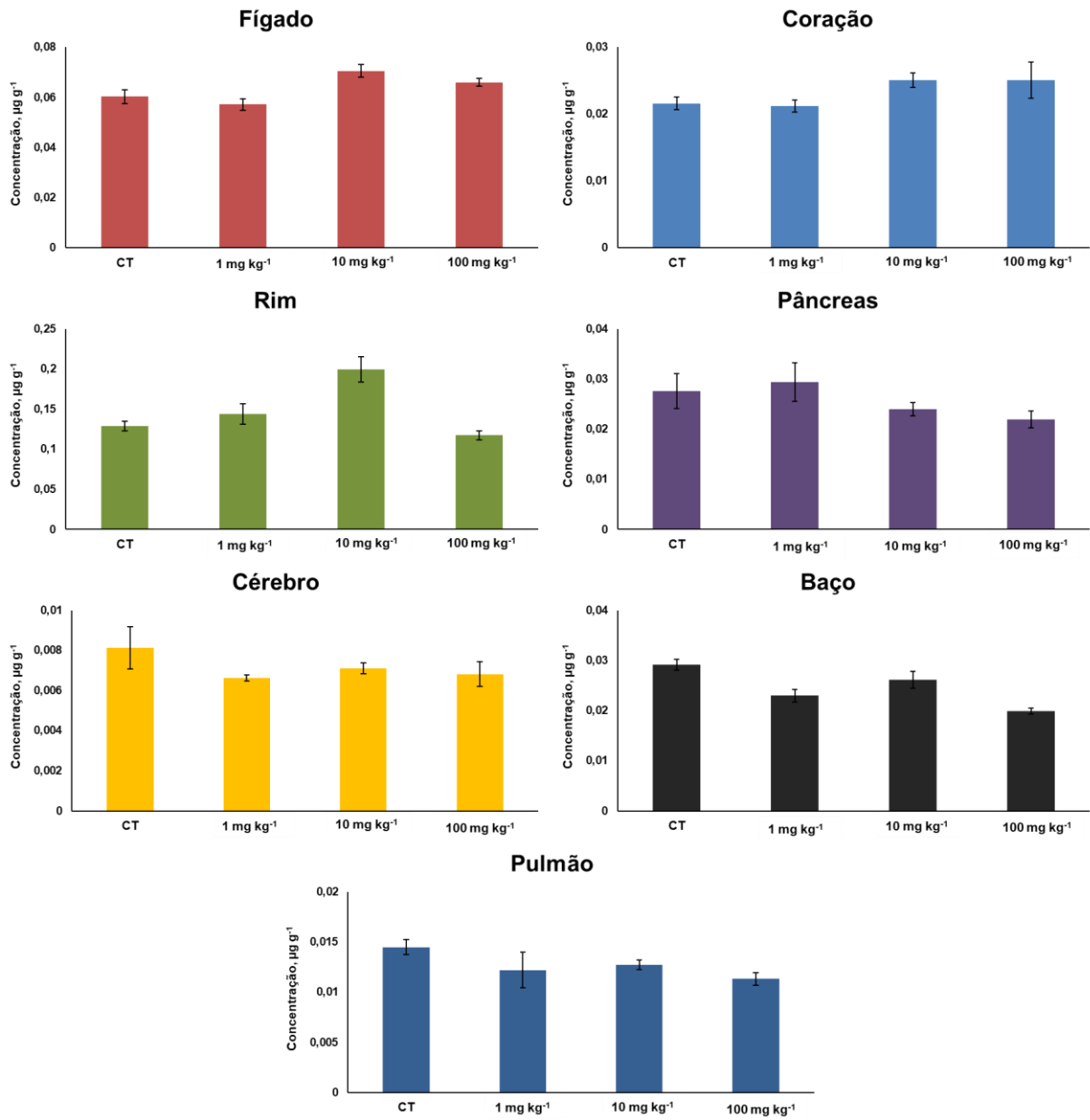
ANEXO C - BIODISTRIBUIÇÃO DE MAGNÉSIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



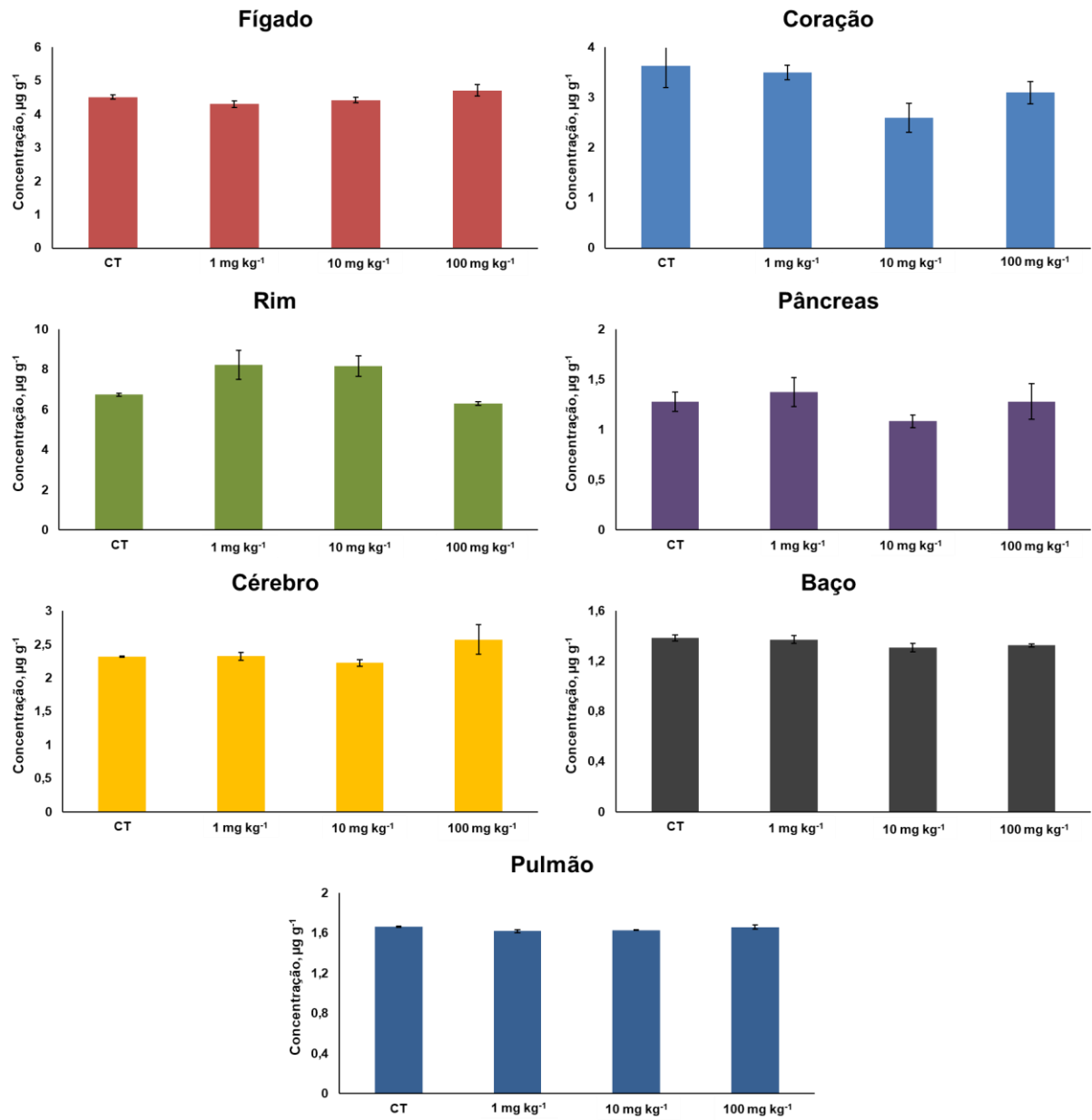
ANEXO D - BIODISTRIBUIÇÃO DE FÓSFORO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



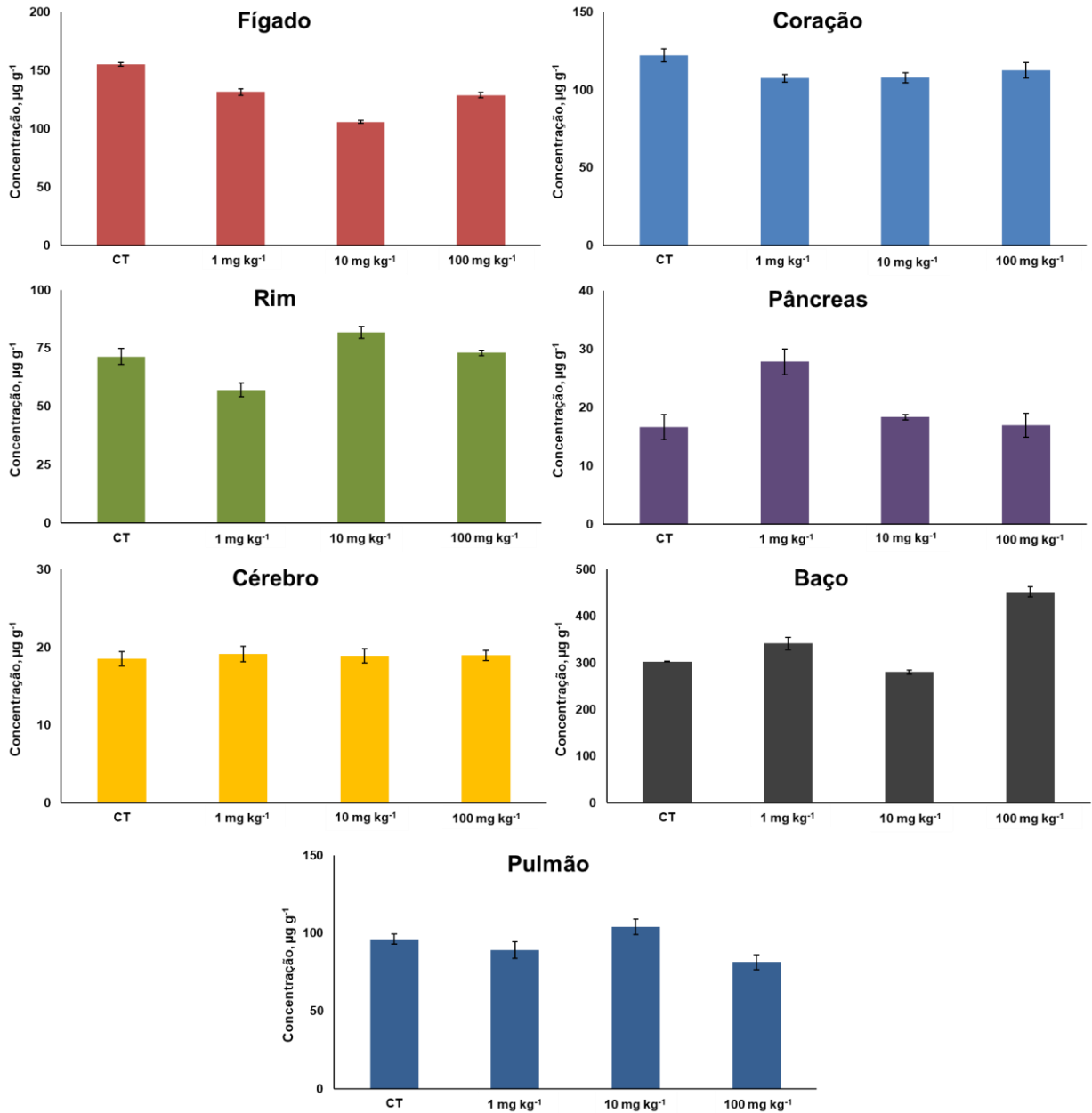
ANEXO E - BIODISTRIBUIÇÃO DE COBALTO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



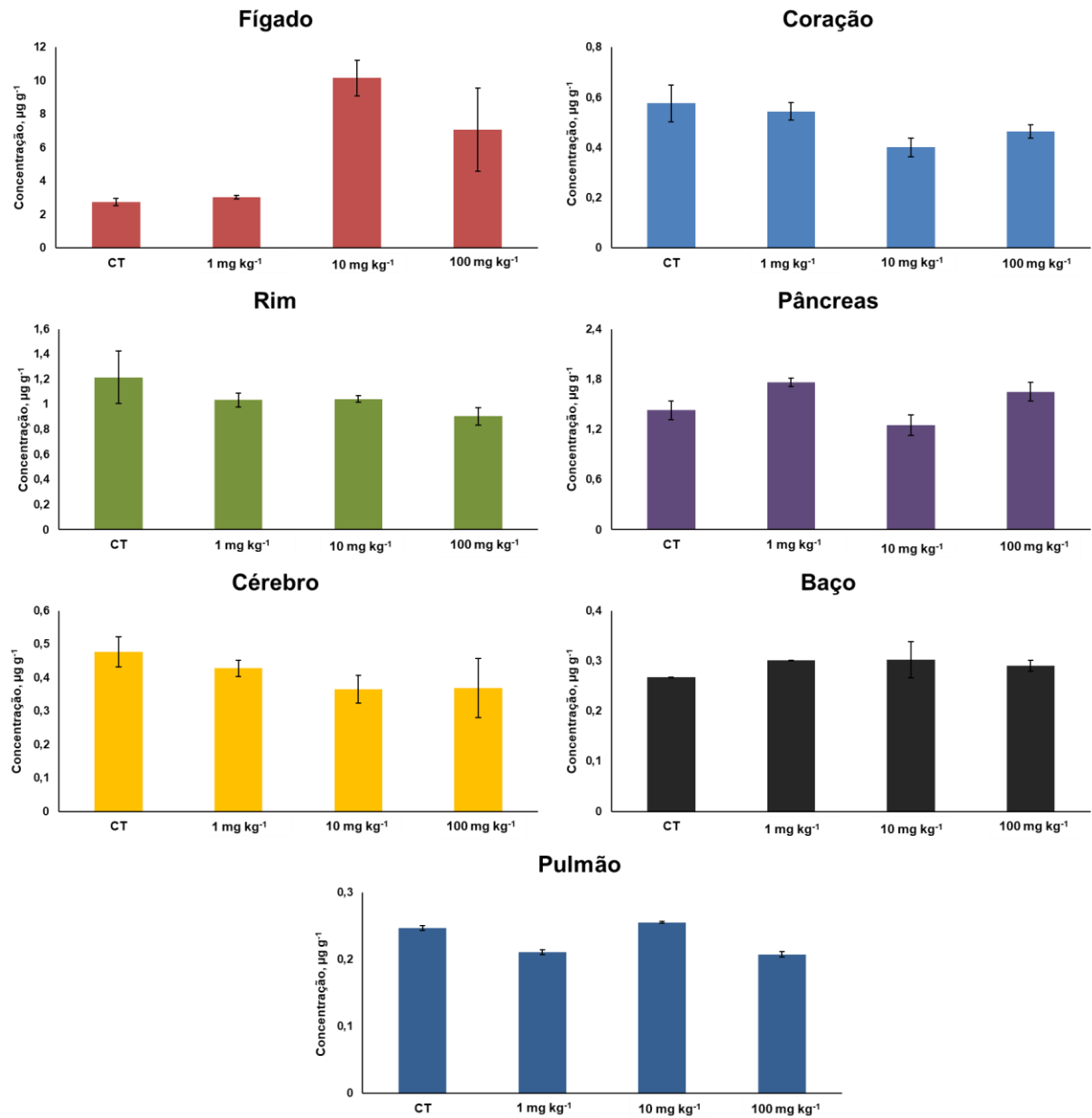
ANEXO F - BIODISTRIBUIÇÃO DE COBRE APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



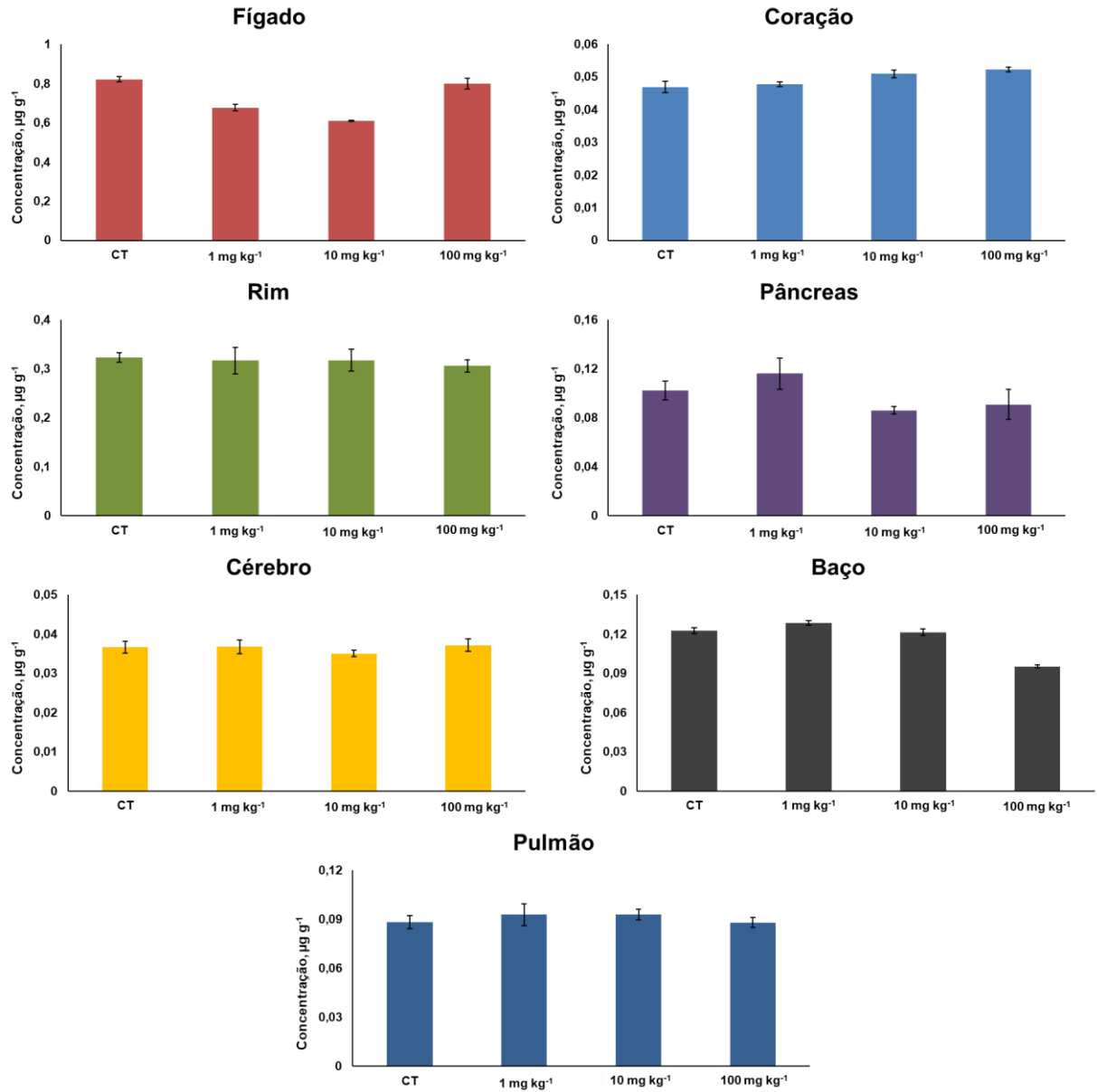
ANEXO G - BIODISTRIBUIÇÃO DE FERRO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



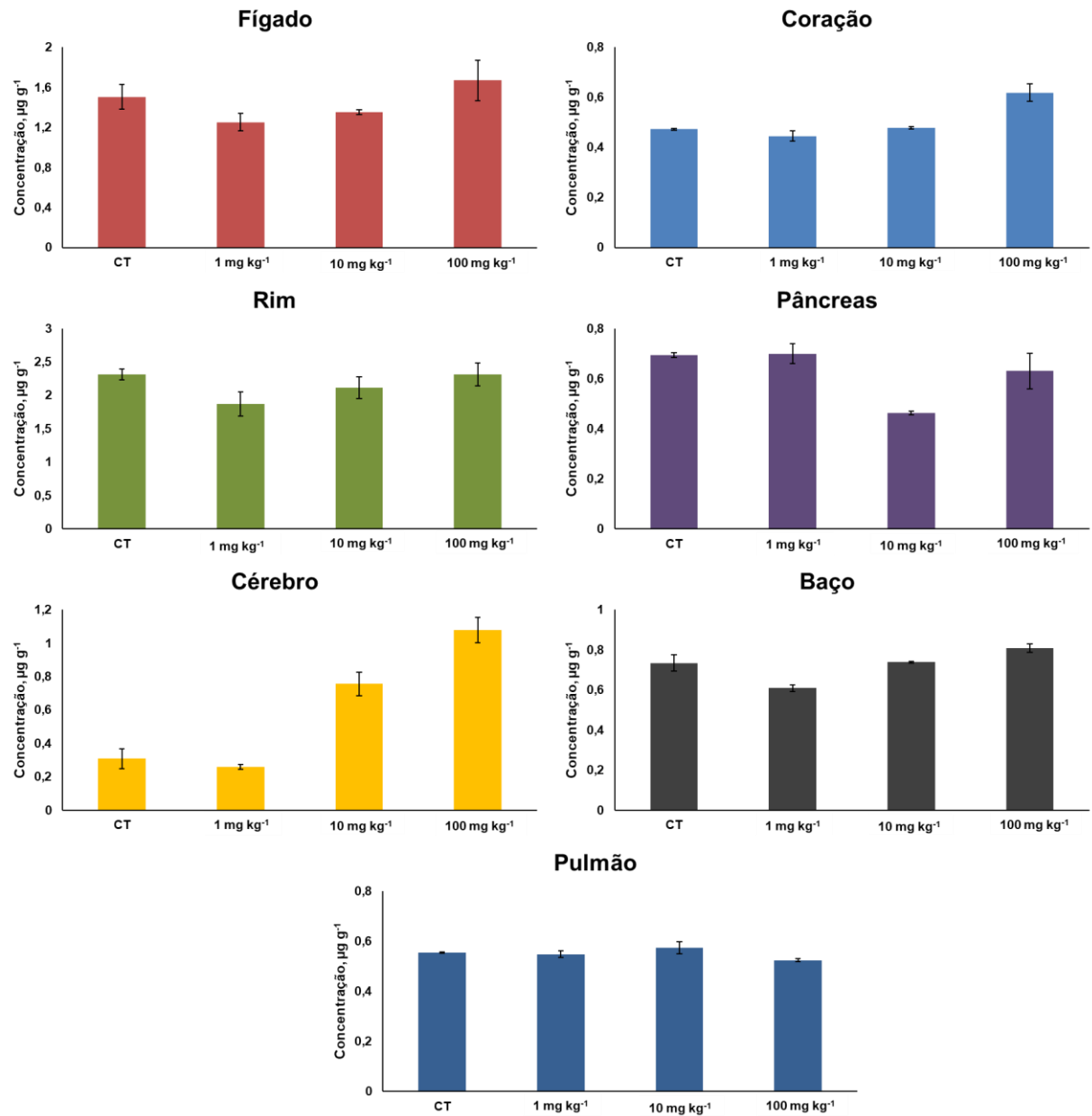
ANEXO H - BIODISTRIBUIÇÃO DE MANGANÊS APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



ANEXO I - BIODISTRIBUIÇÃO DE MOLIBDÊNIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



ANEXO J - BIODISTRIBUIÇÃO DE SELÊNIO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)



ANEXO L - BIODISTRIBUIÇÃO DE ZINCO APÓS 31 DIAS DE EXPOSIÇÃO DE NPs-La₂O₃ (n = 3)

