

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

**CINÉTICA DO ^{65}Zn NOS TECIDOS DE OVINOS SUPLEMENTADOS COM MICRO E NANO
PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à CoC - Ciências Biológicas
como parte dos requisitos de obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aluno: Bruno Scatena Gatti

Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini

PIRACICABA-SP

Maio/2024

RESUMO

Por meio da marcação radioativa do zinco presente no óxido de zinco micrométrico e nanométrico pela técnica de ativação neutrônica, este projeto visa avaliar a cinética do zinco em ovinos, bem como suas quantidades totais, comparando os dois tamanhos de partícula, à fim de elucidar tanto o comportamento deste elemento traço no animal modelo, quanto as diferenças que podem vir a ser observadas pela diferença de tamanho ofertadas.

Oito ovelhas da raça Santa Inês serão divididas em dois grupos com quatro animais, sendo um tratado com ZnO micrométrico e o outro com ZnO nanopartícula 40 nm (ZnO-NP). A alimentação fornecida possuirá apenas taxas basais de zinco, com a única suplementação dele através de uma cápsula contendo ZnO, que passará por ativação neutrônica à fim de produzir o radioisótopo ^{65}Zn .

As ovelhas passarão por dez dias de adaptação a dieta e serão alocadas em gaiolas para estudo de metabolismo. Após o fornecimento oral do ^{65}ZnO e $^{65}\text{ZnO-NP}$ serão coletados sangue (15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h e a cada 24 horas subsequentes), fezes a cada 24 horas e ao final de dez dias as ovelhas serão sacrificadas para coleta dos órgãos.

1. INTRODUÇÃO

O zinco é o segundo elemento traço mais abundante no corpo, perdendo apenas para o ferro e bem à frente do terceiro, o cobre. No entanto, não apresenta tecido de armazenamento, sendo necessária sua ingestão diária (Zalewski et al., 2005).

Sua importância está relacionada com inúmeros processos celulares, que incluem o crescimento, desenvolvimento e proliferação celular, a síntese de DNA e de proteínas, a cicatrização, a produção de gametas, o funcionamento adequado do sistema imune, bem como a estabilização de estruturas e membranas celulares (Bonaventura et al., 2014; Yusof et al., 2019). Baseado em bioinformática, acredita-se que aproximadamente 2800 proteínas têm ligação com o zinco, exigindo-o em sua forma catiônica divalente para funções catalíticas, estruturais ou regulatórias (Maares; Haase, 2020).

De acordo com Miller (1970), os fatores mais importantes para a absorção do zinco são sua quantidade na dieta e a deficiência ou não desse mineral por parte do animal. Esse mineral pode ser suplementado tanto na forma orgânica, em quelatos como propionato de zinco e acetato de zinco, como na forma inorgânica, na forma de sulfato de zinco ou até mesmo óxido de zinco, sendo a orgânica de mais fácil absorção, mas usada em menor escala, visto que a suplementação inorgânica é mais vantajosa por seu custo reduzido (Zhao et al., 2014). Nos ruminantes, além da absorção pelo animal, o zinco será também absorvido pela microbiota ruminal.

O intestino delgado é a principal região para a absorção do zinco, no entanto as quantidades de zinco absorvidas são difíceis de quantificar, dado que nessa região há

também secreção endógena para excreção. Em ruminantes há absorção nas outras cavidades do estômago, sendo que, através do uso do radioisótopo ^{65}Zn , Wright et al. (2008) demonstrou a ocorrência de absorção no tecido ruminal em carneiros.

O transporte desse elemento pelo corpo se dá pela família de proteínas ZIP, que são caracterizadas por transportarem íons metálicos (Guerinot, 2000), e pelos transportadores de zinco (ZnTs), sendo que estas duas apresentam funções opostas para a homeostase do zinco (Roohani et al., 2013). Enquanto as ZIPs importam o Zn para o meio intracelular, os ZnTs retiram-no desse meio, transportando-o tanto para o exterior da célula quanto para organelas (Bonaventura et al., 2014)

Para manter a homeostase do zinco, são realizados principalmente ajustes na absorção total e na excreção intestinal endógena, de modo que os ajustes na absorção e excreção são sinérgicos (Roohani et al., 2013).

A deficiência de Zn foi reconhecida pela primeira vez em humanos, quando Prasad (1961) estudou uma população iraniana que apresentava anemia, hepatoesplenomegalia, hipogonadismo, nanismo e geofagia. Desde então, muitos estudos foram realizados à fim de compreender a deficiência desse micronutriente em diversas espécies.

Os sintomas mais característicos em animais com baixa ingestão de zinco estão relacionados com reduções de apetite, atrasos no crescimento, letargia, cicatrização lenta, menor peso corporal e baixa espermatogênese e libido (Giugliano; Millward, 1984; Miller, 1970; Suttle, 2010). No entanto, o diagnóstico da deficiência de zinco fora de um ambiente controlado é difícil, por conta dos seus sintomas não específicos e a ausência de indicadores dos níveis desse mineral (Maywald; Wessels; Rink, 2017). Ainda assim, essa condição é facilmente tratada com adequação desse elemento na dieta.

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, a suplementação do zinco vem sendo reavaliada, através de estudos que utilizam esse elemento na forma nanométrica, com moléculas entre 1 e 100 nanômetros, à fim de verificar se esse tamanho diminuto pode trazer benefícios aos animais. Nesse tamanho, há uma variação no comportamento das moléculas, com muitas de suas propriedades físicas, químicas e biológicas sendo diferentes daquelas observadas em suas correspondentes de tamanho micrométrico (Scott, 2005).

Com tamanho comparável às moléculas biológicas que ocorrem naturalmente, essas partículas podem adentrar o meio celular com mais facilidade, bem como interagir com biomoléculas na superfície da célula (Rasmussen et al., 2011). Os principais motivos para essas variações no comportamento das nanopartículas estão relacionados com uma maior área de superfície relativa, maior porcentagem de átomos na área de superfície e maior possibilidade de efeitos quânticos afetarem a reatividade química.

O óxido de zinco é considerado uma substância geralmente reconhecida como segura pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2015), no entanto essas classificações

estão associadas com materiais de tamanhos encontrados na natureza, de modo que isso pode variar em se tratando de nanopartículas.

O tamanho da nanopartícula potencializa o zinco, de modo que as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) podem ser uma alternativa para a redução das quantidades usadas desse mineral (Sindhura et al., 2014). Ao sintetizar o ZnO nano, é essencial que seja realizado um bom controle de qualidade, para determinar que a morfologia, pureza, quantidade, qualidade e tamanho da partícula sejam adequados. Outro ponto que pesa a favor da utilização do ZnO-NP é a possibilidade de sintetizá-lo tanto física, química, quanto biologicamente, sendo este último método mais ecológico (Swain et al., 2015).

Diversos experimentos com ZnO-NPs têm sido realizados, indicando que ela proporciona maior ganho de massa corporal, ajuda no controle de mastite, aumenta a produtividade leiteira, favorece o crescimento e a eficiência da microbiota ruminal, traz melhoras significantes na saúde, favorece a viabilidade, fertilidade e motilidade de espermatozoides, além de apresentar atividade antibactericida (Swain et al., 2016). Todavia, foram verificados também efeitos negativos, como verificado por Najafzadeh et al. (2013) como mudanças histopatológicas irreversíveis no fígado e nefrite intersticial multifocal nos rins de cordeiros suplementados com dose de 20mg/kg de peso corporal durante 25 dias.

2. JUSTIFICATIVA

Podendo ser considerado relativamente recente o reconhecimento da importância do zinco como micronutriente essencial para o desenvolvimento e manutenção do bom funcionamento corporal, muitos estudos ainda precisam ser feitos para elucidar o seu comportamento em animais.

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, novas maneiras de suplementação desse mineral surgem, trazendo benefícios associados ao tamanho da partícula, que se aproxima dos tamanhos de moléculas biológicas, mas que requerem estudos relativos à toxicidade para determinar sua biossegurança.

Desta forma, com o auxílio do método analítico da ativação neutrônica, que possibilita alto grau de precisão na medição das quantidades desse elemento, é possível determinar a cinética do zinco proveniente de ZnO pela ingestão oral, além de podermos comparar ao mesmo tempo nanopartícula e micropartícula, à fim de evidenciar as diferenças na assimilação dessas duas espécies de ZnO.

3. OBJETIVOS

Objetiva-se com este trabalho avaliar a cinética de distribuição do zinco nos tecidos de ovinos suplementados com óxido de zinco micrométrico e nanopartícula marcado com ⁶⁵Zn por ativação neutrônica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento está sendo desenvolvido no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, São Paulo, em colaboração com o Laboratório de Radioisótopos (CENA/USP). Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do CENA (001/2021).

Quatro amostras de cada tratamento, ZnO 40 nanômetros e ZnO micrométrico, com 50mg cada serão enviadas para o reator do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) em São Paulo, para marcação radioativa com ^{65}Zn pela técnica de ativação neutrônica, obtendo-se atividade média por amostra de 54,85 kBq.

Serão utilizadas oito ovelhas da raça Santa Inês, divididas em dois tratamentos: um com $^{65}\text{ZnO-40nm}$ (N) e outro com $^{65}\text{ZnO } \mu\text{m}$ (M). Após controle coproparasitário e vermifugação, os animais serão alocados em baias individuais para um período de adaptação à dieta de dez dias. A dieta utilizada na alimentação dos animais será composta de 900g/animal/dia de feno de *Cynodon dactylon*, 450g/animal/dia de mistura concentrada (70% de milho em grão e 30% de farelo de soja) e 13,55g/animal/dia de mistura de minerais (6,34g de CaHPO_4 ; 3,45g de NaCl ; 161g de MgO ; 0,457g de S; 0,148g de MnSO_4 ; 0,03g de CuSO_4 ; 0,009g de KI ; 0,009g de Se; e 0,0008g de CoSO_4), com exceção do Zn, seguindo recomendações do NRC (2007) para ovinos em crescimento. A alimentação será fornecida pela manhã, às 08:00 horas, em cochos separados de volumoso e concentrado, com acesso *ad libitum* à água.

A análise bromatológica da dieta foi feita de acordo com os protocolos analíticos da *Association of Official Analytical Chemists* (2016) para os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados sequencialmente de acordo com Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e adaptado por Mertens (2002).

Os teores de zinco nos alimentos foram realizados através de análises por ativação neutrônica, à fim de determinar as quantidades ingeridas na dieta, além do ^{65}Zn fornecido, como consta na tabela 1.

Tabela 1 – Teores de zinco nos ingredientes da dieta em mg/kg de matéria seca.

	Feno	Mistura concentrada
Zinco	33	27

Após o período de adaptação, os animais serão transferidos para gaiolas de estudo de metabolismo e administrados via oral cerca de 54,85 kBq de ⁶⁵Zn/animal nos tratamentos N e M. Em seguida, amostras de sangue com heparina serão colhidas aos 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h e a cada 24h subsequentes por dez dias.

Será colhido 10 mL de sangue total e obtido 2,5 mL de plasma por centrifugação do sangue total durante 10 min por 5000 rpm. Em seguida serão congelados a -20°C para posterior contagem do ⁶⁵Zn. Durante este período será monitorado o consumo diário de alimento, excreção de fezes e urina, com amostragem de 10% das fezes e urina, que serão congeladas a -20°C para contagem do ⁶⁵Zn no Laboratório de Radioisótopos/CENA.

Decorridos os dez dias após a ingestão da cápsula radioativa, os animais serão sacrificados conforme recomendação do MAPA, para colheita de pelos e dos seguintes tecidos: baço, cérebro, coração, fígado, músculo, osso, ovário, pâncreas, pele, pulmões e rins, que serão pesados, amostrados, congelados a -20°C e liofilizados para contagem do ⁶⁵Zn em detector tipo poço, modelo GWL22015. O teor total de Zn nas amostras coletadas será realizado pela técnica de ativação neutrônica no IPEN/USP.

Desta maneira, determinar-se-á a atividade específica do Zn nos tecidos e a cinética da distribuição desse elemento nos tecidos.

5. FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS

O delineamento experimental adotado será inteiramente ao acaso, com dois tratamentos e quatro repetições (animais). As análises estatísticas dos resultados serão realizadas com o uso do programa SAS, adotando-se nível de significância de 5%.

6. CRONOGRAMA

Atividades	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X
Elaboração e análise da dieta	Etapa já realizada					
Experimento a campo	X	X				
Análises laboratoriais	X	X	X	X	X	
Tabulação dos dados	X	X	X	X	X	
Análise dos resultados	X	X	X	X	X	X
Apresentação						X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONAVENTURA, P. et al. Zinc and its role in immunity and inflammation. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 4, p. 277–285, 2014. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.11.008.
- FDA. FDA (Food and Drug Administration), Washington DC, USA, 2015. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Zinc Salts 2015. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.8991>>.
- GIUGLIANO, R.; MILLWARD, D. J. Growth and zinc homeostasis in the severely Zn-deficient rat. **British Journal of Nutrition**, v. 52, p. 545-560, 1984. DOI: 10.1079/bjn19840122.
- GUERINOT, M. L. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, p. 190-198, 2000. DOI: 10.1016/s0005-2736(00)00138-3.
- MAARES, M.; HAASE, H. A guide to human zinc absorption: General overview and recent advances of *in vitro* intestinal models. **Nutrients**, v.12, n. 762, 2020. DOI: doi:10.3390/nu12030762.
- MAYWALD, M.; WESSELS, I.; RINK, L. Zinc Signals and Immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2222, 2017. DOI: 10.3390/ijms18102222.ORENO-.
- MILLER W. J. Zinc nutrition of cattle: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 8, p. 1123-1135, 1970. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(70)86355-X
- NAJAFZADEH, H. et al. Serum biochemical and histopathological changes in liver and kidney in lambs after zinc oxide nanoparticles administration. **Veterinary World**, v. 6, n. 8, p. 534-537, DOI: 10.5455/vetworld.2013.534-537.
- PRASAD, A. S. et al. Syndrome of Iron deficiency, anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. **American Journal of Medicine**, v. 31, 1961. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(61\)90137-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(61)90137-1).
- RASMUSSEN, J. W. Zinc Oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 9, p. 1063-1077. DOI: 10.1517/17425247.2010.502560.
- ROOHANI, N. et al. Zinc and its importance for human health: An integrative review. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 2, p. 144-157, 2013. PMID: 23914218; PMCID: PMC3724376.
- SCOTT, N. R. Nanotechnology and animal health. **Revue Scientifique et Technique**, v. 24, n. 1, p. 425-432, 2005. DOI: 10.20506/rst.24.1.1579.
- SINDHURA, K. S. et al. Synthesis, characterization and evaluation of effect of phytogenic zinc nanoparticles on soil exo-enzymes. **Applied Nanosciences**, v. 4, p. 819-827, 2013. DOI: 10.1007/s13204-013-0263-4.
- SUTTLE, N. F. **Mineral nutrition of livestock**. 4 ed. Penicuik: CABI, 2010.

SWAIN, P. S. et al. Preparation and effects of nanomineral particle feeding in livestock: A review. **Veterinary World**, v. 8, n. 7, p. 888-891, 2015. DOI: 10.14202/vetworld.2015.888-891.

SWAIN, P. S. et al. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 134–141, 2016. DOI: 10.1016/j.aninu.2016.06.003.

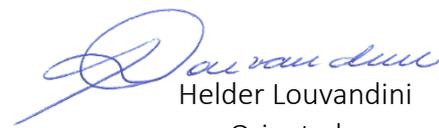
WRIGHT, C. L. et al. Uptake of Zinc from Zinc Sulfate and Zinc proteinate by ovine ruminal and omasal epithelia. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1357-1363, 2008. DOI: 10.2527/jas.2006-650.

YUSOF, H. M. et al. Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 57, 2019. DOI: 10.1186/s40104-019-0368-z.

ZALEWSKI, P. D. et al. Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: Basic mechanisms and clinical targets, a review. **Pharmacology and Therapeutics**, p. 127-149, 2005. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2004.09.004.

ZHAO, C.Y. et al. Effects of dietary Zinc Oxide nanoparticles on growth performance and antioxidative status in broilers. **Biological Trace Element Research**, n. 160, p. 361-367, 2014. DOI: 10.1007/s12011-014-0052-2.


Bruno Scatena Gatti
Aluno


Helder Louvandini
Orientador

**TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL E DEMAIS
PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO DE PESQUISA**

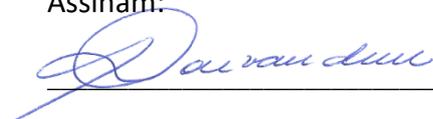
À Comissão de Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Coc CB
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ-USP

Com relação ao projeto de título Cinética do ⁶⁵Zn nos tecidos de ovinos suplementados com micro e nano partículas de óxido de zinco, desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de Prof. Dr. Helder Louvandini e com execução parcial ou total sob responsabilidade de Bruno Scatena Gatti, declaramos que:

1. Estamos cientes do conteúdo e assumimos o compromisso de cumprir os termos das Leis e Decretos complementares (Lei No 6.894 de dezembro de 1980, Lei N 7.803 de 18 de julho de 1989, Lei No 9.985 de 18 de julho de 2000, Lei No 9.974 de 6 de junho de 2000, Decreto No 99.556 de 1 de Outubro de 1990, Decreto No 4.340 de 22 de agosto de 2002, Instrução Normativa N 154 de 01 de março de 2007, Decreto N 4.074 de 4 de janeiro de 2002, Instrução Normativa N 169/2008, ABNT-NBR10004 2004, Resolução ANVISA RDC 306 - 07 de dezembro de 2004, Resolução No 358, de 29 de abril de 2005) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas posteriores relativos aos assuntos ambientais pertinentes. Também cientes, que apresentaremos todas as declarações e documentos exigidos pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa CEAP-ESALQ se solicitados;
2. Todos os procedimentos, organismos, insumos, equipamentos e quaisquer outros itens que serão utilizados direta ou indiretamente nesta pesquisa serão adquiridos e empregados segundo a legislação/normas dos órgãos competentes;
3. O projeto prevê recursos financeiros, se necessários, para o gerenciamento dos resíduos oriundos da pesquisa;
4. Todo impacto ambiental decorrente da má condução do projeto é de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto;
5. Estamos cientes das normas estabelecidas pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da ESALQ (PGRQ-ESALQ) e comprometemo-nos com o seu cumprimento na sede da instituição responsável pela condução do projeto, colaborando para sua adequada realização;
6. Comprometemo-nos a providenciar, quando exigido em função da natureza do projeto de pesquisa, todos os documentos/autorizações exigidos por órgãos públicos ou privados.

Piracicaba, 22 de maio de 2024

Assinam:



Helder Louvandini

Docente Orientador



Bruno Scatena Gatti

Aluno



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
www.cena.usp.br – fone (19) 3429-4683

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: "Nanopartícula de óxido de zinco como alimento funcional", registrada com o número de protocolo, nº 001-2021, sob a responsabilidade do Prof. Helder Louvandini, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal-CONCEA, e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, em reunião **online** no dia 10 de fevereiro de 2021.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	01/03/2021 a 30/09/2026
Espécie/Linhagem/raça	Ovinos/Ovelhas/Cordeiros/Santa Inês
Nº de animais	148
Idade/Peso	(Ovelhas) 02-04 anos - 35 – 40 kg (Cordeiros) 0-08 meses - do nascimento até puberdade (±3-40kg) (Carneiros) 2 anos - ± 67 kg
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério LANA - CENA/USP

CERTIFICATE

This is to certify that study: "Nanoparticle of zinc oxide as a functional feed", protocol number nº 001-2021 under the responsibility of Professor Helder Louvandini, has been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Center for Nuclear Energy in Agriculture, Piracicaba, SP, Brazil, University of São Paulo.

Piracicaba February 10th, 2021



Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla
Coordenador da CEUA-CENA/USP