

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

ANGELO SILVESTRE SACCARO

**Efeito da suplementação de nanopartículas de óxido de zinco na
microbiota ruminal em ovelhas ao desmame**

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

Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini

Piracicaba, SP

Maio/2024

RESUMO

A microbiota ruminal desempenha papel crucial na saúde e no desempenho dos ovinos, influenciando a digestão de alimentos e a absorção de nutrientes. O óxido de zinco (ZnO) é frequentemente utilizado como suplemento nutricional para suprir às exigências nutricionais de zinco (Zn) promovendo o desenvolvimento e manutenção da saúde do animal. No entanto, a utilização de nanopartículas de óxido de zinco tem recebido crescente atenção devido às suas propriedades únicas e potenciais benefícios.

Será realizado experimento utilizando 33 ovelhas suplementadas com nano-ZnO, micro-ZnO e um grupo controle (placebo). A dieta dos animais será baseada em 40% concentrado (milho, farelo de soja e farelo de algodão), além de 60% de feno Tifiton (*Cynodon* sp), ao desmame com 60 dias de lactação serão coletadas amostras de conteúdo ruminal para análise de microrganismos utilizando a técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real. Imediatamente a coleta do conteúdo ruminal será feita mensuração de pH e congelamento de duas alíquotas em nitrogênio líquido, uma para análise de qt-pcr e outra para determinação de ácidos graxos de cadeia curta. Uma terceira alíquota será mantida a temperatura ambiente para contagem dos protozoários com uso de conservante.

Os resultados obtidos poderão subsidiar novos conhecimentos sobre os efeitos da suplementação de nanopartículas de ZnO na microbiota ruminal de ovinos.

Palavras-chave: Microminerais, Rúmen, Degradabilidade, Nutrição animal.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O rúmen, o primeiro compartimento do estômago dos ruminantes, desempenha papel central na digestão de alimentos fibrosos, fornecendo condições adequadas para a fermentação microbiana. Este processo ocorre devido a presença de uma comunidade complexa de microrganismos composta por bactérias, protozoários, fungos, arqueias e vírus. A microbiota ruminal é altamente especializada na degradação de materiais vegetais complexos, convertendo-os em nutrientes absorvíveis pelo hospedeiro.

A composição e a atividade da microbiota ruminal são influenciadas por uma variedade de fatores, incluindo dieta, idade, genética e ambiente. Alterações na microbiota ruminal podem ter efeitos significativos na saúde e no desempenho dos ovinos, afetando a eficiência da digestão, a absorção de nutrientes e a produção de metabólitos importantes, como ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas do complexo B.

A integração de dados ômicos microbianos em modelos matemáticos do microbioma ruminal pode produzir novas ferramentas com maior precisão da função ruminal, juntamente com as potenciais aplicações destes modelos envolvendo inteligência artificial, incluindo estratégias de manipulação microbiana com a finalidade de melhorar a eficiência alimentar e mitigar as emissões do sector ruminante (Muñoz-Tamayo et al., 2022). Claramente há muito o que ser investigado, principalmente por conta de uma diversidade de microrganismos que estão ativos na microbiota do rúmen.

O microbioma gastrointestinal tem sido considerado como o “quinto órgão” por apresentar papel crucial no processamento de sinais e estímulos do ambiente ao hospedeiro (Dietert e Silbergeld, 2015). A colonização microbiana do rúmen é um processo complexo e ocorre simultaneamente com o desenvolvimento do animal e a maturação do sistema imunitário do hospedeiro (Marchesi et al., 2015). Os microrganismos ruminais são responsáveis pela conversão da energia armazenada na biomassa vegetal em ácidos graxos de cadeia curta, que são posteriormente metabolizados e absorvidos pelo animal (Romagnoli et al. 2017). Considerando as numerosas e complexas interações

entre o microbioma e o hospedeiro, esforços tem ocorrido na caracterização e função do microbioma gastrointestinal.

A saúde e desempenho produtivo dos ovinos são fatores consideráveis influenciados pela composição e atividade da microbiota ruminal. O objetivo pelo qual se busca a manipulação do processo de fermentação ruminal é melhorar o desempenho animal por meio da dieta, sendo este foco de pesquisas com várias espécies. (Santos, 2018). A suplementação dietética com minerais é um dos inúmeros fatores cuja capacidade de influenciar a composição da comunidade microbiana foi examinada em detalhes; o interesse reside na possibilidade de os minerais servirem como moduladores dos processos de fermentação no rúmen.

Os sais de zinco são normalmente adicionados aos alimentos para animais devido à sua atividade antimicrobiana, reduzindo as infecções e melhorando o crescimento dos animais. Em termos de suplementação animal, o óxido de zinco é frequentemente utilizado como uma fonte de zinco na dieta devido à sua estabilidade e biodisponibilidade controlada. Quando consumido pelos animais, o óxido de zinco pode ser solubilizado gradualmente no trato gastrointestinal, liberando íons Zn^{2+} para serem absorvidos pelo organismo. Isso permite uma absorção mais controlada e eficiente do zinco em comparação com outras formas menos estáveis.

Tradicionalmente, a suplementação de Zn tem sido realizada utilizando compostos convencionais, como o ZnO micrométrico. No entanto, avanços recentes na tecnologia de nanopartículas oferecem uma abordagem inovadora para a suplementação mineral, com potenciais vantagens em termos de biodisponibilidade e eficácia. É fisiologicamente relevante estudar as alterações do microbioma intestinal após a exposição ao Nano-ZnO (Zhu et al., 2022). Óxido de zinco adicionado a dietas para suínos tem sido eficaz na redução da diarreia pós-desmame (Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011; Vahjen et al., 2015). É um mineral essencial com importantes funções fisiológicas em animais ruminantes, incluindo ovinos.

A incorporação do zinco na dieta pode ser na forma de sais inorgânicos, como o ZnO e o sulfato de Zn ($ZnSO_4$), e de quelatos orgânicos, como o propionato de Zn e o acetato de Zn. No entanto, a utilização de quelatos orgânicos de Zn em dietas para animais é limitada devido ao seu custo mais elevado (Kiefer, 2014). Além disso, níveis mais elevados de Zn excretados por

animais suplementados também suscitaram preocupações relacionadas com a poluição ambiental (Feng et al., 2010).

O período de lactação é quando as ovelhas têm suas exigências nutricionais aumentadas, e as fêmeas geralmente sofrem declínio no peso e condição corporal devido a um estado fisiológico conhecido como balanço energético negativo (Manzoni et al., 2017). Esta fase é, talvez, a mais importante para as fêmeas ovinas, não apenas pelo desequilíbrio metabólico, mas por toda a influência que essa fase exerce sobre o sucesso reprodutivo, por isso a relevância em termos de manejo nutricional, podendo influenciar diretamente na condição das crias e na produção dos cordeiros.

O conhecimento gerado por este estudo poderá contribuir significativamente para o entendimento dos mecanismos subjacentes aos efeitos da suplementação de nanopartículas de Zn sobre a microbiota ruminal e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de estratégias nutricionais mais eficazes para a melhoria da saúde e do desempenho produtivo de ovinos.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da suplementação de nanopartículas de óxido de zinco na microbiota ruminal em ovelhas ao desmame.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos com os animais a serem utilizados neste experimento foram aprovados pela Comissão de Utilização de Animais do CENA (processo número 001/2021). O experimento será conduzido no biotério do Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), em Piracicaba – SP, Brasil.

Trinta e três ovelhas multíparas da raça Santa Inês após ao desmame serão divididas em três tratamentos: Um grupo (n=11) sem suplementação de Zn (controle = CO), segundo grupo (n=11) com ZnO micrométrico (Zn), terceiro grupo (n=11) com Zn-NP (NP). As ovelhas receberão suplementação de 300 mg de ZnO/animal/dia. Serão fornecidos água de forma irrestrita e a dieta dos

animais será baseada em 40% concentrado (milho, farelo de soja e farelo de algodão), além de 60% de feno Tifiton (*Cynodon* sp), incluindo os momentos em que os animais serão direcionados as pastagens. Sessenta dias após o parto (desmame) serão coletadas amostras de conteúdo ruminal das ovelhas por sonda esofágica, após quatro horas da oferta do concentrado. No momento da coleta do conteúdo ruminal será medido pH, e separadas alíquotas para contagem de protozoários, determinação dos ácidos graxos de cadeia curta e qPCR, que serão congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em ultra-freezer -80°C até sua análise, com exceção para a contagem de protozoários que serão preservados por uma solução de M.F.S.

3.1. Análise da dieta

A dieta das ovelhas será composta por pastagem (*Panicum maximum*), feno de Tifiton (*Cynodon* sp) e concentrado (70% de milho, 15% farelo de soja e 15% de farelo de algodão). Será utilizada a metodologia descrita pela Association of Official Analytical chemists – AOAC (Helrich, 1990) para determinação da matéria seca (MS), da matéria mineral (MM), da matéria orgânica (MO), do extrato etéreo (EE) e da proteína bruta (PB); da fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA).

3.2. Extração de DNA

Para as análises moleculares serão selecionados os melhores animais. As amostras de conteúdo ruminal serão descongeladas à temperatura ambiente e 200 µL de subamostra serão usados para isolar DNA total usando o *QIAamp DNA Stool Mini Kit comercial* (Qiagen, Valencia, EUA) com uma etapa de incubação adicional inicial a 95 ° C por 6 min para maximizar a lise microbiana. As demais etapas serão realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e integridade do DNA serão avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e espectrofotômetro *4 Nanodrop 8000* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, EUA). O fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) será utilizado para medir a quantidade de DNA.

3.3. Real time PCR (qPCR)

As análises de PCR quantitativo (qPCR) serão realizadas utilizando o equipamento *QuantStudio5 Real-Time PCR system* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*). *Primers* gene específico de 16S rRNA serão utilizados para quantificar o número de cópias de: Bacterias totais, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium sp*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amilophylum*, *Selenomonas ruminantium* e 18S rRNA para Protozoários e Fungos totais. Todas as reações serão efetuadas em triplicata, utilizando 5µL de *SYBR Green ROX qPCR Master Mix* (*Thermo Scientific, Waltham, EUA*), 1µL de DNA (10 ng), 5pmol de cada *primer* e água até um volume total de 10 µL por reação. As curvas padrão de DNA serão geradas por diluição seriada de 10² a 10⁸ cópias µL⁻¹. O número de cópias de genes será expresso como números de cópias logarítmicas de genes por 10 ng de DNA.

3.4. Delineamento experimental e análise estatística

Será utilizado experimento inteiramente ao acaso com 3 tratamentos e 11 repetições (ovelhas) por tratamento. Os dados obtidos por meio da técnica de qPCR serão analisados no qPCR QuantStudio™ *Design & Analysis Software* v1.5.2 (*Applied Biosystem™*), e as comparações entre as abundâncias serão realizadas utilizando Sistema de Análise Estatística (*SAS® Institute, Cary, NC, USA, version 9.3*), utilizando o modelo linear generalizado (GLM), considerando $P \leq 0,05$.

4. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

ATIVIDADE	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
Revisão de literatura	X	X	X	X		
Experimento em campo	X	X				
Tabulação dos dados		X	X	X		
Elaboração do relatório final				X	X	X
Análise de dados			X	X	X	X
Revisão					X	X
Apresentação do TCC						X

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN T, LIU HX, YAN HY, WU DM, PING J. Developmental origins of inflammatory and immune diseases. Mhr: Basic Science of Reproductive Medicine. v. 22, p. 858-865, 2016.

DIETERT, R R AND SILBERGELD, E K. Biomarkers for the 21st Century: Listening to the Microbiome. Toxicological Sciences, v. 144, n.3, p. 208–216. 2015.

HELRICH, K. (Ed.). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Gaithersburg, MD: AOAC, 1990. v. 1. 673 p.

FENG, J., MA, W.Q., NIU, H.H., WU, X.M. AND WANG, Y. Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers. Biological trace element research, v. 133, n.2, p. 203-211, 2010.

KIEFER, C. Minerais quelatados na nutrição de aves e suínos. Revista Eletrônica Nutritime, v.2, n°3, p.206 –220, 2005.

MANZONI, V.G. et al. Eficiência produtiva de ovelhas com diferentes características conformacionais sob pastejo. Cienc. anim. bras., Goiânia, v.18, p. 1-11, 2017.

MARCHESI, J R, ADAMS, D H, FAVA, F, HERMES, G D A, HIRSCHFIELD, G M, HOLD, G, QURAIISHI, M N, KINROSS, J., SMIDT, H, TUOHY, K M, THOMAS, L V, ZOETENDAL, E G, HART, A. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier Gut, v.65, p. 330-339, 2015.

MAZAHERI N FR., HEUZENROEDER, M W, BARTON. M D. Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. Vet. Microbiol. v.148, p. 276–282, 2011.

MUÑOZ-TAMAYO, R. et al. Review: Towards the next-generation models of the rumen microbiome for enhancing predictive power and guiding sustainable production strategies. Animal: an international journal of animal bioscience, v. 17 Suppl 5, p. 100984, 2023.

ROMAGNOLI, E. M., KMIT, M. C. P., CHIARAMONTE, J. B., ROSSMANN, M., MENDES, R. Ecological Aspects on Rumen Microbiome. Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. 1ed.: Springer International Publishing, p. 367-389, 2017.

SANTOS, M. V. Microbiota ruminal de novilhos mantidos a pasto, suplementados com quitosana e digestibilidade *in vitro* de diferentes dietas para ruminantes. Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Faculdade de ciências agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 65f, 2018.

VAHJEN, W., D. PIETRUSZYŃSKA, I. C. STARKE, AND J. ZENTEK. High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and

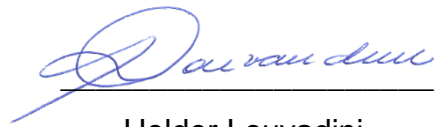
sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. Gut Pathog. v. 7, 2015.

ZHU, X. et al. Evaluation of the gut microbiome alterations in healthy rats after dietary exposure to different synthetic ZnO nanoparticles. Life sciences, v. 312, n. 121250, p. 121250, 2023.



Angelo Silvestre Saccaro

Aluno



Helder Louvadini

Orientador



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus "Luiz de Queiroz"
Centro de Energia Nuclear na Agricultura



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, n° **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 n° 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n° 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
N° de animais	148
Idade/Peso	(Ovelhas) 02-04 anos - 35 – 40 kg (Cordeiros) 0-08 meses - do nascimento até puberdade (±3-40kg) (Cameiros) 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 n° **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

Av. Centenário, 303 • C.P. 96 • Piracicaba, SP • 13400-970 • Brasil
Fone: (19) 3429-4611 • Fax (19) 3429-4610 • e-mail: diretoria@cena.usp.br - www.cena.usp.br

**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 **Efeito da suplementação de nanopartículas de óxido de zinco na microbiota ruminal em ovelhas ao desmame**, desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de Prof. Dr. Helder Louvandini e com execução parcial ou total sob responsabilidade de **Angelo Silvestre Saccaro**, 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.

quarta-feira, 29 de maio de 2024

Assinam:



Helder Louvandini
Docente Orientador(a)



Angelo Silvestre Saccaro
Aluna(o)