

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Cinética do  $^{65}\text{Zn}$  nos tecidos de ovinos suplementados com micro e nano partículas de óxido de zinco**

**Bruno Scatena Gatti**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

**Piracicaba**

**2024**



**Bruno Scatena Gatti**

**Cinética do  $^{65}\text{Zn}$  nos tecidos de ovinos suplementados com micro e nano partículas de óxido de zinco**

Orientador:

Prof. Dr. **HELDER LOUVANDINI**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

**Piracicaba**

**2024**





## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Marilda e Osiris, e à minha irmã, Aline, pelo amor incondicional, apoio, ensinamentos, incentivo e por me proporcionarem todos os meios para que tivesse uma boa formação.

À minha namorada, Thatiane, pelo companheirismo, carinho e por estar sempre ao meu lado e me apoiando quando preciso.

Ao meu orientador, Dr. Helder Louvandini, pela orientação, incentivo, paciência, disponibilidade e oportunidades ao longo de toda a minha graduação.

À Dra. Elisabete Aparecida de Nadai Fernandes, ao Dr. Márcio Arruda Bacchi, e ao Laboratório de Radioisótopos, pelas análises realizadas e toda a cooperação no desenvolvimento desse projeto.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição Animal, pela amizade, auxílio nas análises e no desenvolvimento do projeto e pelos bons momentos vividos no laboratório e fora dele.

Ao Dr. Murilo Antonio Fernandes e à Karinna Camargo Scotton pelo auxílio na execução do experimento.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelas oportunidades e infraestrutura que me proporcionaram uma boa formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa e pelos fundos para o desenvolvimento deste projeto.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1. Objetivo .....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. O Zinco .....	9
2.2. Nanotecnologia.....	10
2.3. Óxido de Zinco.....	11
2.4. Absorção, transporte e homeostase do zinco.....	14
2.5. Excreção.....	16
2.6. Deficiência e excesso .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Local e CEUA .....	19
3.2. Obtenção do zinco radioativo .....	19
3.3. Animais e dieta .....	19
3.4. Ingestão do <sup>65</sup> Zn e coletas.....	20
3.5. Cálculos.....	21
3.5.1. Tempo de meia-vida biológica do <sup>65</sup> Zn .....	21
3.5.2. Atividade normalizada do <sup>65</sup> Zn.....	21
3.5.3. Atividades específicas .....	22
3.5.4. Zn nas células sanguíneas .....	22
3.6. Análises estatísticas .....	23
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Perfil do zinco estável.....	23
4.2. Atividade do <sup>65</sup> Zn no sangue .....	26
4.3. Meia-vida biológica do <sup>65</sup> Zn (T <sub>1/2</sub> ) .....	28
4.4. Excreção.....	29
4.5. Distribuição nos tecidos.....	32
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	39
REFERÊNCIAS.....	40

## RESUMO

### Cinética do $^{65}\text{Zn}$ nos tecidos de ovinos suplementados com micro e nano partículas de óxido de zinco

O emprego da nanotecnologia na suplementação de zinco visa aumentar a eficiência, diminuindo as quantidades ofertadas, propiciando redução de custos e menor prejuízo ao ambiente. O experimento foi realizado, portanto, a fim de elucidar a cinética do zinco proveniente de óxido de zinco micrométrico e nanométrico, pela radiomarcagem desse mineral utilizando a técnica de ativação neutrônica. Foram utilizadas oito ovelhas da raça Santa Inês, com cerca de 340 dias de idade e  $23,62 \pm 1,97$  kg de peso corporal, divididas em dois tratamentos, com quatro animais cada, e alocadas em baias individuais por dez dias para adaptação à dieta. A alimentação consistiu em 900 g/animal/dia de feno de *Cynodon dactylon*, 450 g/animal/dia de mistura concentrada (70% grãos de milho e 30% farelo de soja) e 13,55 g/animal/dia de mistura mineral sem zinco, ofertada às 08:00 horas em cochos separados, além de acesso *ad libitum* à água. Após o período de adaptação, os animais foram transferidos para as gaiolas de estudo de metabolismo e receberam uma única vez, via oral, as cápsulas contendo 50 mg de  $^{65}\text{ZnO}$ , com atividade aproximada de 54,85 kBq, micro ou nano métrico de acordo com seus tratamentos. Após a ingestão das cápsulas, iniciaram-se as coletas de sangue, fezes e urina, até o décimo dia, quando os animais foram eutanasiados e houve a coleta de tecidos (baço, cérebro, coração, fígado, músculo, osso, pâncreas, pele, pelo, pulmões e rins) e de seus conteúdos digestivos (ruminal, abomasal e intestinais) para detecção do  $^{65}\text{Zn}$ . Foram determinadas as concentrações de Zn estável no sangue, plasma, nas fezes, urina e em todos os tecidos coletados. O  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico apresentou tempo de meia-vida biológica 12 horas mais longo em relação ao  $^{65}\text{ZnO}$  micrométrico, embora sem diferença entre eles ( $P > 0,05$ ), sugerindo maior tempo de permanência no animal. Em relação a excreção nas fezes, as ovelhas do tratamento nanométrico apresentaram maior taxa de recuperação, possivelmente associada com maior rapidez no trânsito intestinal. No geral, a distribuição do  $^{65}\text{Zn}$  para os tecidos foi semelhante em ambos os tratamentos, com exceção do baço, que apresentou maiores teores de  $^{65}\text{Zn}$  no tratamento micrométrico ( $P < 0,05$ ). Embora sejam necessários mais ensaios avaliando outros parâmetros, acredita-se que o ZnO nanométrico possa substituir o seu correspondente de tamanho micrométrico numa suplementação contínua de zinco.

Palavras-chave: Santa Inês, Radionuclídeo, Suplementação, Oral, Ativação Neutrônica



## ABSTRACT

### Kinetics of $^{65}\text{Zn}$ in sheep tissues supplemented with micro and nano particles of zinc oxide

The use of nanotechnology in zinc supplementation aims to increase efficiency, by reducing offered amounts, allowing for cost reduction and a reduced damage to the environment. This work was therefore made to elucidate the kinetics of the zinc derived from micrometric and nanometric zinc oxide, by radiolabeling this mineral through neutronic activation technique. Eight Santa Inês ewes were used, around 340 days old and  $23.62 \pm 1.97$  kg of body weight, split in two treatments with four animals each, and allocated in individual bays for diet adaptation for ten days. The feeding consisted in 900 g/animal/day of hay (*Cynodon dactylon*), 450 g/animal/day of a concentrated mix (70% corn grains and 30% soybean meal) and 13.55 g/animal/day of mineral mix without zinc, given at 08:00 a.m. in separated troughs, with *ad libitum* water access. After the adaptation phase, the animals were transferred to cages for metabolism evaluation and then received the capsules containing 50 mg of  $^{65}\text{ZnO}$ , with an approximate activity of 54.85 kBq, micro- or nanometric according to their treatments, on a single oral dose. After the capsules' ingestion, collections of blood samples, feces and urine started, happening everyday through the tenth day, when the animals were euthanized and the tissues (spleen, brain, heart, liver, muscle, bone, pancreas, skin, fur, lung and kidneys) and gastrointestinal contents (ruminal, abomasal and intestinal) collected for  $^{65}\text{Zn}$  count. The stable Zn levels in the blood tissue, feces, urine and in every tissue collected was also determined. The nanometric  $^{65}\text{ZnO}$  had a biological half-life 12 hours longer than the micrometric  $^{65}\text{ZnO}$ , albeit without statistical difference ( $P > 0.05$ ), suggesting a longer stay in the animal. About the Zn excretion in the feces, the ewes of the nanometric treatment had larger recovery levels, possibly related to a faster intestinal transit. Generally, the  $^{65}\text{Zn}$  distribution was similar in both treatments, except for the spleen, that had higher levels of  $^{65}\text{Zn}$  in the micrometric treatment ( $P < 0.05$ ). Although further assays evaluating more parameters are needed, we herein believe that the nanometric ZnO may be able to substitute its micrometric counterpart in a continuous zinc supplementation.

Keywords: Santa Inês, Radionuclide, Supplementation, Oral, Neutronic Activation

## 1. INTRODUÇÃO

O zinco (Zn) é um micronutriente essencial para a manutenção da vida, sendo onipresente nos tecidos dos animais, participando desde funções metabólicas até funções no sistema imunitário.

Por ser indispensável ao desenvolvimento dos animais, a ausência de zinco na dieta pode acarretar prejuízos em sistemas produtivos. Além disso, o seu teor diário mínimo de ingestão pode não ser atingido numa dieta baseada em forragem. Desta forma faz-se necessária a suplementação desse mineral.

A suplementação pode ocorrer de diversas formas, cujo custo está atrelado principalmente ao preço da fonte de Zn, além disto, o excesso na dieta pode aumentar a excreção via fezes e o acúmulo desse mineral na natureza. Assim, há a necessidade de realizar aporte suplementar de maneira eficiente tanto no âmbito econômico, quanto para a fisiologia do animal e preservação do ambiente.

O desenvolvimento da nanotecnologia tem como finalidade propiciar justamente isso, com partículas com maior reatividade e área de superfície, que podem potencializar a ação de princípios ativos. Entretanto, pouco se sabe sobre sua biossegurança, com pesquisas nanotoxicológicas emergindo a fim de compreender os possíveis efeitos negativos dessas moléculas diminutas. Nesse contexto, estudos vêm sendo realizados para compreender os benefícios das nanopartículas e contornar os seus malefícios.

O ZnO é uma molécula já estabelecida para a suplementação de Zn e, com um semelhante nanométrico de fácil e ecológica síntese, pode amplificar os benefícios das nanopartículas. Por consequência, comparar dois tamanhos de ZnO pode trazer informações valiosas. Por conta da excreção endógena do Zn predominantemente via fezes, não se sabe ao certo o caminho seguido pelas quantidades ingeridas, portanto o uso de técnicas isotópicas de avaliação traz informações ímpares sobre sua cinética.

## **1.1. Objetivo**

Objetivou-se avaliar a cinética do  $^{65}\text{Zn}$  oriundo da administração oral com ZnO micro e nanométrico obtido por ativação neutrônica nos tecidos de ovinos da raça Santa Inês.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O zinco

O zinco é um elemento metálico de número atômico 30 e massa de 65,38 u. Sua forma iônica é  $Zn^{2+}$  e é o 24º elemento mais abundante na crosta terrestre, com abundância de cerca de 75 mg/kg (KABATA-PENDIAS e SZTEKE, 2015). Têm grande importância para os sistemas biológicos, sendo um micronutriente essencial para a vida.

Em mamíferos, o Zn 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). Para atingir as quantidades diárias de ingestão desse micromineral, pode ser realizada a suplementação dele na dieta.

Sua importância está relacionada com inúmeros processos celulares, que incluem crescimento, desenvolvimento e proliferação celular, síntese de DNA e de proteínas, produção de gametas, funcionamento adequado do sistema imune, estabilização de estruturas e membranas celulares, regulação redox e controle da apoptose (MAYWALD, WESSELS e RINK, 2017), além de cicatrização (BONAVENTURA et al., 2014) e funcionamento adequado do sistema reprodutivo (SUTTLE, 2010). Acredita-se que cerca de 2800 proteínas se ligam ao zinco (ANDREINI et al., 2005 *apud* MAARES e HAASE, 2020), enquanto mais de 300 enzimas são dependentes dele (SUTTLE, 2010). Para citar algumas das metaloenzimas que são compostas por esse mineral, temos: fosfatase alcalina (ALP), lactato desidrogenase, DNA e RNA polimerases, transcriptase reversa, superóxido dismutase (SOD) e etc. (SWAIN et al., 2016), além do zinco ser essencial para os fatores de transcrição denominados dedos de zinco (SUTTLE, 2010).

Por estar associado com muitos processos celulares essenciais, o zinco deve estar presente em todas as células do corpo. Sua distribuição se dá, principalmente, nos ossos e músculos ( $\pm 86\%$ ), seguido da pele ( $\pm 4\%$ ) e fígado ( $\pm 3\%$ ) com o restante distribuído nos outros tecidos (MAARES e HAASE, 2020). Entretanto, por apresentar excreção endógena principalmente via fezes, a farmacocinética do zinco ingerido não é completamente conhecida.

Com uma das maiores concentrações de Zn no corpo (SALGUEIRO et al., 2000), acreditava-se que os ossos pudessem servir como reservatório de Zn, no entanto, Murray e Messer (1981) obtiveram resultados desfavoráveis a essa hipótese.

Para que seja distribuído por todo o corpo, o zinco depende de um sistema complexo de transporte, que ocorre por proteínas específicas, e é regulado pelo *status* de zinco corporal, que, junto com outros fatores, influenciará e determinará as taxas de absorção desse mineral (ROOHANI et al., 2013; MAARES e HAASE, 2020).

## **2.2. Nanotecnologia**

De acordo com o National Science and Technology Council (2004), a nanotecnologia consiste na pesquisa e desenvolvimento de materiais com dimensões entre, aproximadamente, 1 a 100 nm, que, por seu tamanho diminuto, apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas que diferem de maneira fundamental de seus correspondentes maiores encontrados naturalmente. Essa tecnologia engloba áreas como a microfluídica, bioengenharia de ácidos nucleicos, sistemas inteligentes de entrega de medicamentos, nanossensores e nanomateriais (SCOTT, 2005).

As propriedades dos materiais em nanoescala estão associadas com sua área de superfície elevada, composição química, estrutura de superfície, reatividade, solubilidade, forma e agregação (NEL et al., 2006), que possibilitam uma gama de novas interações, bem como aumentam o potencial dos ingredientes ativos, podendo reduzir suas quantidades utilizadas (SINDHURA et al., 2013).

O tamanho em que a nanotecnologia opera é comparável ao verificado em biomoléculas encontradas nas células e bem menor do que o diâmetro médio de uma célula humana, em torno de 7  $\mu\text{m}$  (RASMUSSEN et al., 2010), o que pode facilitar sua interação com as próprias células e biomoléculas em sua superfície, bem como diminuir a necessidade de transportadores específicos para o meio intracelular. Desta forma, o uso de nanomateriais vêm sendo testado a fim de comprovar os seus benefícios e possibilitar o uso em larga escala.

No entanto, apesar dos diversos benefícios que a nanotecnologia apresenta, é necessária a avaliação da toxicidade desses materiais em sistemas biológicos. As mesmas propriedades que tornam os materiais nanométricos eficientes naquilo que

são empregados, podem torná-los tóxicos. Nesse contexto, a pesquisa nanotoxicológica fornece dados para a compreensão dos efeitos negativos das nanopartículas, bem como pode fornecer informações que possibilitem a redução destes efeitos (OBERDÖSTER et al., 2005).

### 2.3. Óxido de zinco

O óxido de zinco (ZnO) é um composto inorgânico branco, com baixa solubilidade em água, mas altamente solúvel em meios ácidos e alcalinos. É um material multifuncional por suas propriedades físico-químicas únicas e, aliando-se a isso possui biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, o que o torna um material de interesse no campo da biomedicina (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA e JESIONOWSKI, 2014).

Por suas propriedades e facilidade de produção, o ZnO é amplamente utilizado, numa variedade de atividades, como na indústria da borracha, nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, na indústria têxtil, em eletrônica e nas indústrias eletro tecnológicas, em fotocatalise, dentre outras aplicações variadas (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA e JESIONOWSKI, 2014).

Com a nanotecnologia, a necessidade de reduzir custos de produção e as quantias de Zn que prejudicam o ambiente numa suplementação pouco eficiente, o óxido de zinco nanopartícula (ZnO-n) surge como alternativa viável na suplementação de zinco por, em princípio, solucionar entraves da suplementação convencional. Além disso, as diversas formas como pode ser sintetizado, através de métodos químicos, físicos e biológicos (SWAIN et al., 2015) facilitam sua produção, e permitem maior controle na qualidade das propriedades da partícula. O método empregado para a produção do ZnO-n determinará o formato de sua partícula, que pode variar desde partículas unidimensionais até partículas tridimensionais (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA e JESIONOWSKI, 2014). Além disso, os métodos biossintéticos têm se mostrado *eco-friendly*, além de usarem menos compostos tóxicos e serem mais eficientes do ponto de vista energético, sendo uma alternativa interessante aos métodos físicos e químicos (SINDHURA et al., 2013; YUSOF et al., 2019).

O ZnO é considerado uma “substância geralmente reconhecida como segura” (GRAS) pelo FDA (2015). No entanto, essa classificação refere-se às formas amplamente utilizadas, não se referindo às nanopartículas de ZnO. Desta forma, há a necessidade de compreensão dos mecanismos de interação do ZnO-n para determinar a sua biossegurança. Diversos estudos, já realizados e em desenvolvimento, buscam elucidar o comportamento dessa nanomolécula em sistemas biológicos, mas por se tratar de uma molécula capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) (NEL et al., 2006) ao mesmo tempo em que contém um micronutriente essencial para os animais, muitos avanços em seu entendimento ainda têm de ocorrer para a comprovação de sua segurança.

Hosseini-Vardanjani *et al.* (2020) ao compararem os efeitos da suplementação com ZnO micro e nanométrico em ovelhas, com cerca de 61 kg de peso corporal (PC), recebendo suplementação adicional de 30 a 40 mg de Zn/kg de matéria seca de um dos dois tamanhos do óxido de zinco, além de cerca de 23,4 mg de Zn/kg de matéria seca, enquanto os animais do tratamento controle receberam apenas cerca de 23,4 mg de Zn/kg de matéria seca, obtiveram resultados semelhantes para os dois tamanhos de zinco, com ambos sendo superiores ao tratamento controle, com os animais apresentando maior ingestão e digestibilidade de matéria seca, maior capacidade antioxidante total, aumento na produção de leite e redução na contagem de células somáticas no leite em relação a esse último.

Rajendran *et al.* (2013) verificaram aumento da produção de leite e da ação imune no controle de mastite subclínica, com contagem de células somáticas no leite inferiores à 0,2 milhões de células/mL, em vacas Holstein-Frísia suplementadas com ZnO-n.

Szuba-Trznadel *et al.* (2021) analisaram os efeitos da suplementação com ZnO-n em comparação com ZnO-m (óxido de zinco micropartícula) e ZnSO<sub>4</sub>, em concentrações semelhantes entre estas três moléculas, de cerca de 150 mg de Zn/kg de alimento após o início do experimento, em leitões desmamados com cerca de 8,2 kg de PC. Os seus resultados indicam maior taxa de ganho de peso corporal total e diário nos animais tratados com ambos ZnO em relação àqueles tratados com ZnSO<sub>4</sub>, mas sem diferença entre os dois tratamentos de ZnO. Além disso, os leitões tratados com ZnSO<sub>4</sub> apresentaram maior mortalidade, o que, de acordo com os autores, está

associado às maiores taxas de diarreia apresentadas nesse tratamento, em comparação com ambos ZnO. Desta forma, esse estudo indica eficiência do ZnO em comparação com outra fonte de Zn, o ZnSO<sub>4</sub>, além de apresentar resultados semelhantes entre ZnO-m e ZnO-n quando em doses semelhantes.

Efeitos negativos do uso de ZnO-n de 25 nm foram verificados por Najafzadeh *et al.* (2013), e incluíam mudanças histopatológicas irreversíveis no fígado e nefrite intersticial multifocal nos rins de cordeiros, que possuíam cerca de 19 kg de PC e foram suplementados com dose elevada, de 20 mg/kg de PC de ZnO-n ( $\pm 380$  mg/animal/dia) durante 25 dias.

Com base nesses estudos, o ZnO-n tem se mostrado seguro para uso, desde que em doses semelhantes às aquelas usadas em outras fontes de Zn, com esta molécula nanométrica apresentando efeitos negativos quando em doses elevadas.

Chen *et al.* (2010), Baek *et al.* (2012) e Yeh *et al.* (2012) avaliaram as rotas de distribuição de nanopartículas de ZnO, avaliando sua cinética, tempo de permanência no organismo, concentrações no sangue e tecidos, taxas de excreção e alguns outros parâmetros. Baek *et al.* (2012) não verificaram mortalidade, perda de peso corporal ou sintomas em ratos tratados com nanopartículas de ZnO de 20 e 70 nm administradas via oral, em doses de 50 e 300 mg/kg de PC, tendo recebido cerca de 6,5 ou 39 mg de Zn cada animal. Ainda de acordo com eles, a dosagem é um fator importante na absorção, distribuição nos tecidos e tempo de meia-vida biológica. Além disso, constataram maior acúmulo do ZnO-n no fígado, pulmão e rins, sendo que a maior parte do Zn foi absorvido em sua forma iônica.

Chen *et al.* (2010) realizaram análise dos perfis de biodistribuição de ZnO-n injetado intravenosamente em ratos de 8 meses com cerca de 33,7 g de peso corporal, através da técnica de ativação neutrônica. Eles verificaram maiores concentrações 1 hora após injeção, no pulmão, pâncreas e fígado e, 24 horas após injeção, no pulmão, pâncreas, fígado e baço, além de altas concentrações excretadas pelas fezes. No sangue, as concentrações medidas por eles estiveram estáveis.

Yeh *et al.* (2012), ao compararem <sup>65</sup>ZnO-n 10 nm, <sup>65</sup>ZnO-n 71 nm e <sup>65</sup>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> em ratos que tinham em torno de 25 g de PC e receberam doses de 120 µg de uma das moléculas citadas intravenosamente, verificaram menores tempos de meia-vida



para a nanopartícula. Eles verificaram maior bioacumulação das três moléculas na carcaça 28 dias após a injeção intravenosa, ao passo que os  $^{65}\text{ZnO-n}$  10 e 71 nm apresentaram altas concentrações também no fígado, baço, rins e pulmão, enquanto o  $^{65}\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  apresentou maiores concentrações nos rins, osso e trato gastrintestinal. Por conta da diferença nas concentrações no fígado e baço entre o  $^{65}\text{ZnO-n}$  e o nitrato de  $^{65}\text{Zn}$ , os autores sugerem que o óxido de zinco nanométrico se mantém na forma particulada, sendo absorvido por fagocitose nesses dois órgãos.

Desta forma, estes estudos convergem em muitos pontos, como na excreção, que ocorre principalmente pelas fezes, com valores diminutos na urina, no aumento da eficiência de absorção com o decréscimo do tamanho das partículas, mas divergem na forma com que a partícula é absorvida, iônica ou particulada, e nas concentrações nos órgãos, sendo os principais órgãos-alvo o fígado, o baço, os rins, o pulmão e o pâncreas.

#### **2.4. Absorção, transporte e homeostase do zinco**

A absorção do zinco está atrelada a dois fatores principais: a quantidade ofertada na dieta e o *status* de zinco corporal (MILLER, 1970; ROOHANI et al., 2013). Além disso os ajustes da absorção do zinco e sua excreção endógena, biliar e intestinal, com reabsorção são os principais métodos de controle de sua homeostase (ROOHANI et al., 2013).

Pelo impacto da quantidade ingerida e pela necessidade de ingestão diária do Zn, além de seus valores serem muito baixos nos componentes da dieta de animais esse mineral pode ser suplementado a fim de evitar quaisquer deficiências. A suplementação pode ocorrer na forma orgânica, em quelatos como propionato de zinco e acetato de zinco, ou na forma inorgânica, como sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) ou óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ), sendo a forma orgânica de mais fácil absorção, mas usada em menor escala por apresentar maior custo (ZHAO et al., 2014).

Ainda, a administração do Zn em soluções aquosas facilita a sua absorção (ROOHANI et al., 2013), de modo que compostos com alta solubilidade são mais eficientes, enquanto compostos com baixa solubilidade em água, como o óxido de zinco, podem apresentar dificuldades na absorção.

Outro fator que pode impactar negativamente a absorção do Zn, é a presença de fitatos, que formam complexos estáveis com o zinco, reduzindo sua disponibilidade no intestino (MAARES e HAASE, 2020). Em ruminantes, deficiências geradas pela presença de fitato são incomuns, pela capacidade de degradação dessa molécula no rúmen (SUTTLE, 2010).

A absorção do Zn ocorre, em mamíferos de maneira geral, principalmente no intestino delgado (ROOHANI et al., 2013; SWAIN et al., 2016), enquanto em ruminantes ocorre também no abomaso (SWAIN et al., 2016), sendo que Wright *et al.* (2008) verificaram absorção ainda no rúmen. Em ruminantes, há também a absorção do Zn pela microbiota ruminal, de modo que, antes mesmo de ser absorvido pelo animal, pode desempenhar papel importante em sua fisiologia.

Como demonstrado por Baek *et al.* (2012) e Yeh *et al.* (2012) em ratos tratados com ZnO-n, partículas menores tendem a ser absorvidas mais facilmente. No entanto, pela complexidade do sistema digestório de ruminantes, esses resultados podem apresentar variações, sendo necessárias verificações específicas nesses animais.

Em ruminantes, a absorção está também atrelada a taxa de passagem dos alimentos, que determina o tempo que o alimento estará nas cavidades estomacais e intestinais do animal. A taxa de passagem é determinada pela composição da dieta e pela densidade e tamanho das partículas (DE VEGA e POPPI, 1997). Ainda, de acordo com Van Soest (1994), a porção sólida da dieta apresenta taxa de passagem mais lenta do que líquidos. Desta forma, nanopartículas em ruminantes podem apresentar menores taxas de passagem, de modo que as partículas de interesse podem apresentar taxas de absorção diferentes das esperadas.

Apesar do conhecimento acerca dos mecanismos de absorção do zinco, mesmo que não totalmente elucidado, a quantificação do total absorvido é dificultada pela excreção endógena dele no intestino delgado (ROOHANI et al., 2013).

Para a captação celular do zinco, a absorção e o seu transporte, ele depende de um sistema complexo de transportadores, que serão responsáveis pela sua mobilização do meio extracelular para o intracelular, para as organelas celulares e pelo citosol, mantendo a homeostase desse elemento. Os responsáveis por esse controle são as metalotioneínas (MTs) e duas famílias de transportadores de Zn, as

Zrt- e Irt-*like proteins* (ZIPs, SLC39A), proteínas associadas com o transporte de vários cátions, incluindo o Zn (Guerinot, 1999) e os transportadores de Zn (ZnTs, SLC30A) (BONAVENTURA et al., 2014; KIMURA e KAMBE, 2016).

As ZIPs e as ZnTs desempenham papel fundamental como rota de transporte em membranas, desempenhando papéis antagônicos (KIMURA e KAMBE, 2016). As ZIPs são responsáveis pelo transporte do Zn para o citosol, podendo esse ser oriundo do meio extracelular ou de vesículas e membranas intracelulares. As ZnTs estão, por sua vez, associadas com o inverso, balanceando os níveis de zinco nas células ao destiná-lo para o meio extracelular, ou para as organelas das células (BONAVENTURA et al., 2014; KIMURA e KAMBE, 2016).

As MTs são proteínas capazes de se ligarem ao zinco, e a alguns outros metais, e movê-los no meio intracelular (KIMURA e KAMBE, 2016), podendo estar ligadas com até sete íons de Zn, totalizando até cerca de 20% do Zn no interior das células (CHASAPSIS et al., 2020). Ainda, as MTs podem estar envolvidas com o *buffering* e o *muffling* do Zn, sendo o primeiro associado, em condições estáveis, com o tamponamento do conteúdo de zinco em faixas picomolares, enquanto o segundo está associado com a restauração dos níveis de zinco inicial no citoplasma pela retirada dele da célula para o meio externo ou para organelas (BONAVENTURA et al., 2014).

Uma vez captado pelas células e absorvido, o zinco será distribuído pelo corpo pela corrente sanguínea, onde se liga em maiores quantidades em albumina, e em menores quantidades em  $\alpha$ -2-macroglobulina e transferina (ROOHANI et al., 2013; KABATA-PENDIAS e SZTEKE, 2015; MAARES e HAASE, 2020). Menos de 1% de todo o zinco corporal está na corrente sanguínea, mas os teores biodisponíveis nesse tecido permitem um *pool* de zinco com uma rápida taxa de troca para todos os tecidos de um animal (MAARES e HAASE, 2020).

## 2.5. Excreção

A excreção do zinco inclui as quantidades ingeridas e não absorvidas do mineral e as quantidades excretadas endogenamente que não serão reabsorvidas. Este Zn que não será mais absorvido pode seguir algumas rotas para o exterior do animal, podendo ser através das fezes, da urina, dos pelos, e de outros fluidos

corporais (KREBS, 2000; IZINCG, 2004; SUTTLE, 2010, ROOHANI et al., 2013; MAARES e HAASE, 2020). Enquanto todos os outros serão em algum momento expelidos, o pelo se diferencia por permanecer, mesmo que eventualmente se solte, no corpo do animal. No entanto, mesmo mantendo-se no animal, é um zinco imóvel e indisponível.

Chen *et al.* (2010) avaliaram a distribuição do ZnO-n radiomarcado com Zn<sup>65</sup> e injetado intravenosamente, e verificaram baixas taxas de excreção na urina, com predominância da excreção nas fezes. Baek *et al.* (2012) tiveram resultados semelhantes, mas não utilizaram nenhum radioisótopo e realizaram ingestão oral. Entretanto, nesses dois estudos e em outros de teor semelhante não foram realizadas as análises do teor de Zn nos pelos, deixando uma lacuna na avaliação da excreção do ZnO-n.

## **2.6. Deficiência e excesso**

Os impactos da ausência e do excesso de Zn na dieta só puderam ser compreendidos uma vez determinada a importância desse mineral para as diversas formas de vida, o que ocorreu em momentos distintos, tendo seu início em 1869 com experimentos em *Aspergillus niger* e continuando no ano de 1933 em ratos de laboratório (PRASAD, 2013). Em humanos a determinação da essencialidade desse elemento ocorreu com Prasad *et al.* (1961), ao analisar uma população iraniana com diversos distúrbios de saúde.

A deficiência de zinco está relacionada com ingestões inadequadas ou problemas na absorção (OMS, 2002), sendo dificilmente diagnosticada fora de um ambiente controlado pela ausência de bioindicadores de seus níveis (MAYWALD, WESSELS e RINK, 2017). Estimava-se que, no ano de 2002, a deficiência de Zn afetava cerca de um terço da população mundial, com 1,4% das mortes ocorridas em todo o globo podendo ser relacionadas com a deficiência desse mineral (OMS, 2002). Apesar dos riscos associados com a deficiência do Zn, suas consequências podem ser controladas pela adequação dos seus níveis na dieta.

Os sintomas da insuficiência do Zn variam de acordo com as espécies, mas em animais tendem a estar relacionados com atrasos no crescimento, hipogonadismo em

machos, letargia, redução do apetite, cicatrização lenta, mal funcionamento do sistema imune, aumento do risco de inflamação excessiva e distúrbios na ossificação (SUTTLE, 2010; PRASAD, 2013; ROOHANI et al., 2013; MAARES e HAASE, 2016). Os ossos precisam do zinco em seu desenvolvimento e mineralização, tendo Hickory *et al.* (1979) verificado má formações e atrasos no desenvolvimento esquelético de ratos com deficiência moderada de Zn.

Em ovinos, a deficiência de Zn aparenta ter impacto na produção de fibras de lã (WHITE et al., 1994; ROBBINS, 2012), sendo que Ott *et al.* (1964) verificaram afrouxamento da lã como um dos primeiros sintomas de deficiência em cordeiros, além de verificarem também inchaço e lesões nas regiões próximas aos cascos dos cordeiros com dieta deficiente em zinco, além de lesões ao redor dos olhos e menores taxas de ganho de peso corporal, com os sintomas e o número de animais apresentando-os aumentando gradualmente com o passar do tempo.

De acordo com Miller (1970), bezerros com deficiência de zinco consomem menos alimento e apresentam crescimento retardado, além de desenvolvimento testicular deficitário.

Visto que as deficiências de Zn podem estar atreladas com a forma com a qual ele é ingerido, e essa deficiência pode acarretar diversos problemas prejudiciais à saúde, além de gerar prejuízos financeiros nos sistemas de produção animal, faz-se mais uma vez clara a necessidade de analisar múltiplas formas de suplementação desse elemento.

Embora os problemas de deficiência de zinco sejam mais documentados, a sua ingestão indiscriminada pode levar a problemas relacionados ao seu excesso.

Wang *et al.* (2006) realizaram ensaios com ratos administrados Zn micro ou nanométrico em altas doses, 5 g Zn/kg de peso corporal, e verificaram efeitos tóxicos no sistema hematopoiético e em vários tecidos e órgãos de ambos os tratamentos. Allen (1983) verificou que altas doses de zinco foram responsáveis por perda de peso, anemia, fraqueza, edemas subcutâneos, icterícia e desidratação em ruminantes.

Outra possibilidade de efeito negativo de excesso de Zn está relacionada com a absorção de cobre (Cu), visto que os dois compartilham algumas enzimas e

transportadores, de modo que o excesso de Zn pode prejudicar a absorção e transporte de Cu (KABATA-PENDIAS e SZTEKE, 2015).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local e CEUA**

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

#### **3.2. Obtenção do zinco radioativo**

Para obtenção do óxido de zinco (ZnO) radiomarcado com  $^{65}\text{Zn}$  foram pesadas quatro amostras de 50 mg de ZnO 40 nanômetros (Zn-n) e quatro de amostras de ZnO micrométrico (Zn-m), que foram irradiadas com nêutrons no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) em São Paulo. A irradiação produziu uma atividade média de  $^{65}\text{Zn}$  igual a 54,85 kBq em cada amostra.

#### **3.3. Animais e dieta**

Foram utilizadas oito ovelhas da raça Santa Inês, com cerca 340 dias de idade e peso corporal em torno de 23,62 kg ( $\pm 1,97$ ), divididas em dois tratamentos: um com  $^{65}\text{ZnO-40nm}$  ( $^{65}\text{Zn-n}$ ) e outro com  $^{65}\text{ZnO}$  micrométrico ( $^{65}\text{Zn-m}$ ). Após controle coproparasitário e vermifugação, os animais foram alocados em baias individuais por um período de adaptação à dieta de dez dias. A dieta utilizada na alimentação dos animais foi composta por 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  $\text{CaHPO}_4$ ; 3,45g de NaCl; 161g de MgO; 0,457g de S; 0,148g de  $\text{MnSO}_4$ ; 0,03g de  $\text{CuSO}_4$ ; 0,009g de KI; 0,009g de Se; e 0,0008g de  $\text{CoSO}_4$ ), com exceção do Zn, seguindo recomendações do NRC

(2007) para ovinos em crescimento. A alimentação foi 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 (Tabela 1) 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 medidos através de análises por ativação neutrônica, a fim de determinar as quantidades do mineral nos componentes da dieta.

**Tabela 1** – Análise bromatológica e teor de zinco dos componentes da dieta oferecida aos animais em g/kg de matéria seca (MS) e mg/kg MS à 100 °C, respectivamente.

Variáveis	Feno	Mistura concentrada
Matéria Seca	878	883
Matéria Orgânica	937	968
Proteína Bruta	72	185
Fibra em Detergente Neutro	757	154
Fibra em Detergente Ácido	421	88
Extrato Etéreo	18,6	37,2
Matéria Mineral	63,1	32,2
Zinco	33,0	27,1

### 3.4. Ingestão do <sup>65</sup>Zn e coletas

Após o período de adaptação, os animais foram transferidos para gaiolas de estudo de metabolismo e administrados via oral, em dose única com média de 54,85 kBq de <sup>65</sup>Zn por animal nos tratamentos <sup>65</sup>Zn-n e <sup>65</sup>Zn-m. Em seguida, amostras de sangue com heparina foram colhidas aos 15 min, 30 min, 1h, 2h, 6h, 14h, 24h e a cada 24 horas subsequentes por dez dias.

Fora colhido 10 mL de sangue total e obtido 2,5 mL de plasma por centrifugação de sangue total durante 10 minutos por 5000 rpm. Em seguida, foram congelados à -20 °C para posterior contagem do <sup>65</sup>Zn.

Durante o período experimental foram monitorados o consumo diário de alimento (pesagem do ofertado menos sobra), excreção de fezes e urina, com amostragem de 10% das fezes e urina, que foram congeladas à -20 °C para contagem do <sup>65</sup>Zn por espectrometria gama de alta resolução em detector tipo poço, modelo GWL22015 no LRi.

Decorridos dez dias após a ingestão da cápsula radioativa, os animais foram sacrificados conforme recomendação do MAPA, para colheita de pelos, dos conteúdos ruminal, abomasal e intestinais, e dos seguintes tecidos: baço, cérebro, coração, fígado, músculo, osso, pâncreas, pele, pelo, pulmões e rins, que foram pesados, amostrados, congelados à -20 °C e liofilizados para contagem do <sup>65</sup>Zn conforme descrito anteriormente. Amostras desses tecidos também foram coletadas para determinação dos teores de Zn total usando análise por ativação neutrônica instrumental (INAA).

### **3.5. Cálculos**

#### **3.5.1. Tempo de meia-vida biológica do <sup>65</sup>Zn**

O tempo de meia-vida biológica ( $T_{1/2}$ ) do <sup>65</sup>Zn foi determinado da seguinte forma:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

onde:

$T_{1/2}$ : tempo de meia-vida em horas

k: taxa de excreção verificada experimentalmente para cada animal

#### **3.5.2. Atividade normalizada do <sup>65</sup>Zn**

A atividade normalizada do <sup>65</sup>Zn nas amostras foi determinada da seguinte forma:



$$AN_s = \frac{\frac{A_s}{MO_t}}{AI_a} \times 10^6$$

onde:

AN<sub>s</sub>: Atividade normalizada de um tecido/conteúdo

A<sub>s</sub>: Atividade (Bq/g ou Bq/mL) de um tecido/conteúdo

MO<sub>s</sub>: Matéria original (g ou mL) de uma amostra

AI<sub>a</sub>: Atividade ingerida (Bq) pelo animal

### 3.5.3. Atividades específicas

As atividades específicas do <sup>65</sup>Zn no tecido sanguíneo foram determinadas com as atividades normalizadas dos últimos cinco dias de coleta do sangue, após o equilíbrio do radionuclídeo nos animais.

### 3.5.4. Zn nas células sanguíneas

Os valores para o zinco, estável e <sup>65</sup>Zn, nas células sanguíneas foram determinados de forma indireta, através dos seguintes cálculos:

a) Teor de zinco estável

$$E_{cs} = E_s - E_p$$

onde:

E<sub>cs</sub>: Teor de Zn estável nas células sanguíneas

E<sub>s</sub>: Teor de Zn estável no sangue total

E<sub>p</sub>: Teor de Zn estável no plasma sanguíneo

b) Atividade do  $^{65}\text{Zn}$  nas células sanguíneas

$$AN_{cs} = AN_s - AN_p$$

onde:

$AN_{cs}$ : Atividade do  $^{65}\text{Zn}$  nas células sanguíneas

$AN_s$ : Atividade do  $^{65}\text{Zn}$  no sangue total

$AN_p$ : Atividade do  $^{65}\text{Zn}$  no plasma sanguíneo

### 3.6. Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com dois tratamentos (micro e nano) e quatro repetições (animais). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para determinar a normalidade dos dados, de modo que para as variáveis repetidas no tempo (sangue e fezes) utilizou-se o *proc mixed* e aquelas realizadas apenas uma vez *proc anova*. A análise estatística foi realizada com o SAS® (versão 9.4), considerando nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfil do zinco estável

Os animais apresentaram peso corporal inicial e final semelhante entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), com ganho de peso corporal em ambos os tratamentos ao final do período experimental (Tabela 2). O consumo de alimentos também foi semelhante entre os dois tratamentos, com os valores de Zn ingeridos na dieta e excretados via fezes em intervalos parecidos. Além disso, verificou-se um balanço negativo entre o Zn ingerido e o excretado (Tabela 3).

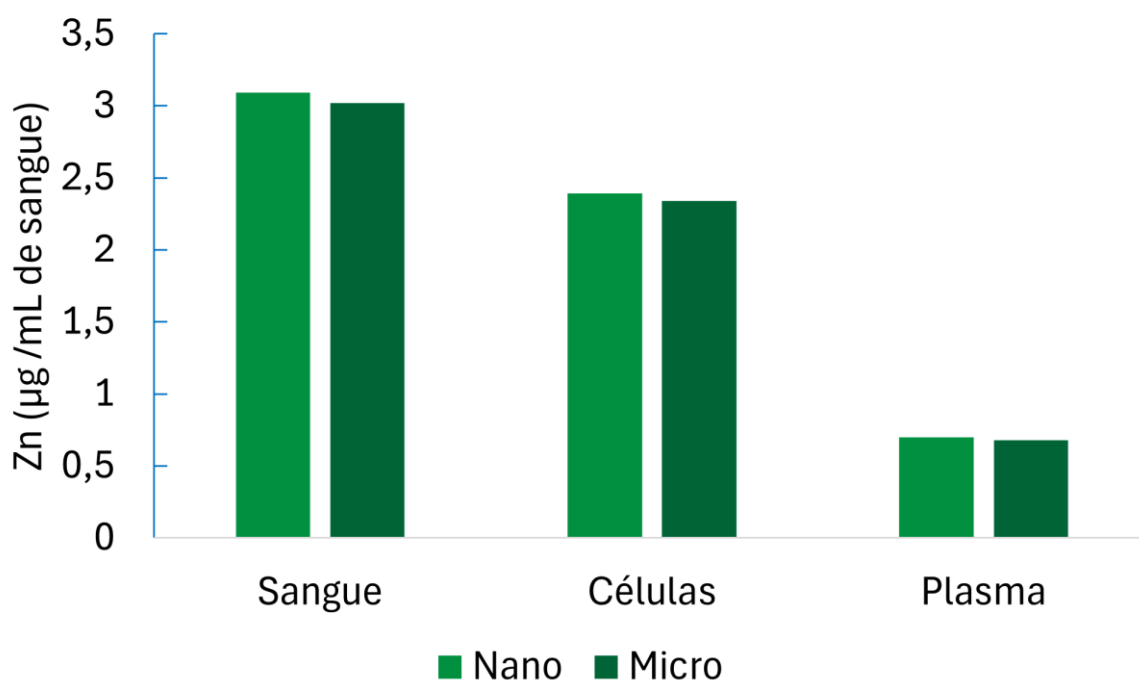
**Tabela 2** – Pesos corporais inicial e final, e ganho em peso corporal, médios e desvios-padrões, em ovinos que receberam <sup>65</sup>ZnO nanométrico e micrométrico via oral.

Tratamentos	Peso corporal inicial (kg)	Peso corporal final (kg)	Ganho em peso corporal (kg)
Nano	24,1 ±1,7	27,0 ±1,7	2,9 ±1,3
Micro	23,1 ±2,1	25,2 ±2,5	2,1 ±0,5

**Tabela 3** – Consumo de matéria seca, Zn consumido e excretado nas fezes, e balanço do Zn, médios e desvios-padrões, em ovinos que receberam <sup>65</sup>ZnO nanométrico e micrométrico via oral.

Variáveis	Tratamentos		P-valor
	<sup>65</sup> Zn-n	<sup>65</sup> Zn-m	
Consumo de matéria seca (g)	985 ±142	940 ±94	0,6605
Consumo de Zn na dieta (mg)	34,5 ±4,4	32,9 ±2,8	0,6124
Excreção de Zn nas fezes (mg)	58 ±11	41,6 ±8,8	0,0836
Balanço de Zn (mg)	-24 ±13	-8,6 ±7,0	0,1181

Os teores de Zn no sangue (Figura 1) não apresentaram diferenças entre tratamentos ( $P>0,05$ ), sendo que, em ambos, os valores de Zn nas células corresponderam a cerca de 80% do total de Zn no tecido sanguíneo.

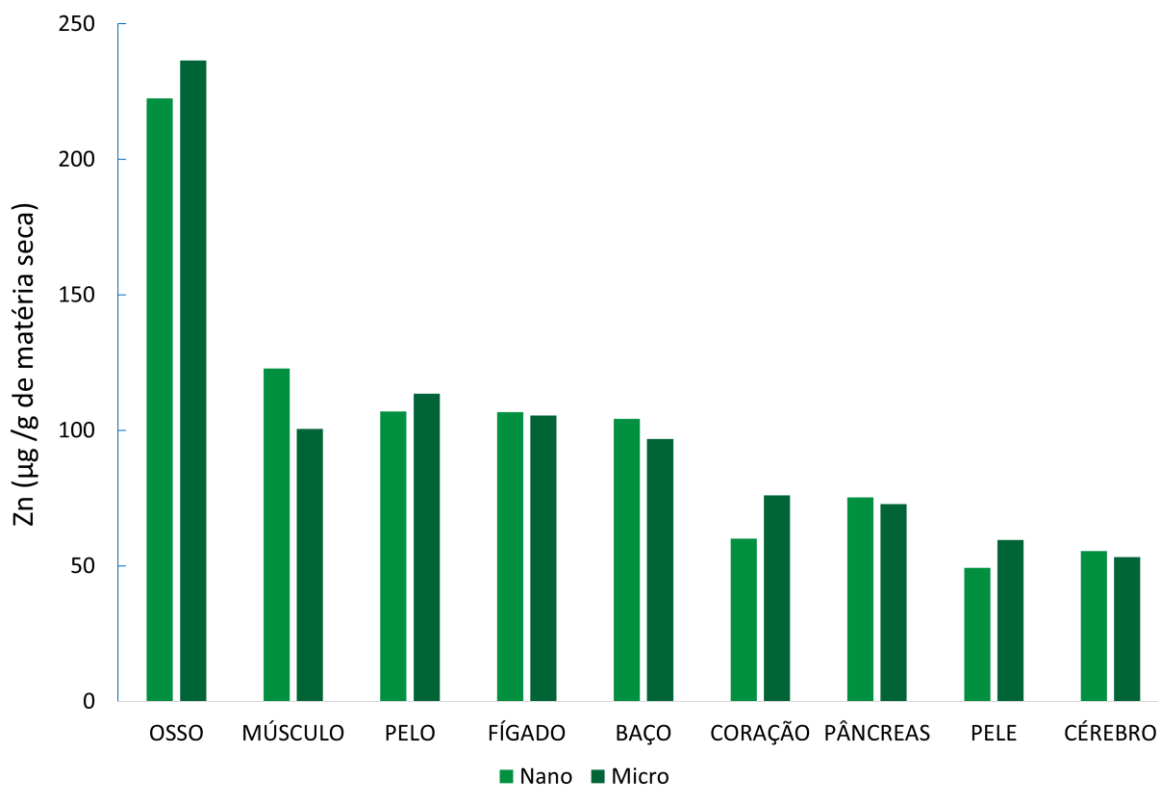


**Figura 1.** Teor de Zn no tecido sanguíneo: sangue total, células e plasma de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral.

Os teores de Zn em matéria original nos tecidos não apresentaram diferença entre os dois tratamentos ( $P>0,05$ ) (Tabela 4), assim como os teores medidos em matéria seca ( $P>0,05$ ) (Figura 2).

**Tabela 4** – Teores de zinco em  $\mu\text{g/g}$  de matéria original, médios e desvios-padrões, nos tecidos de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral.

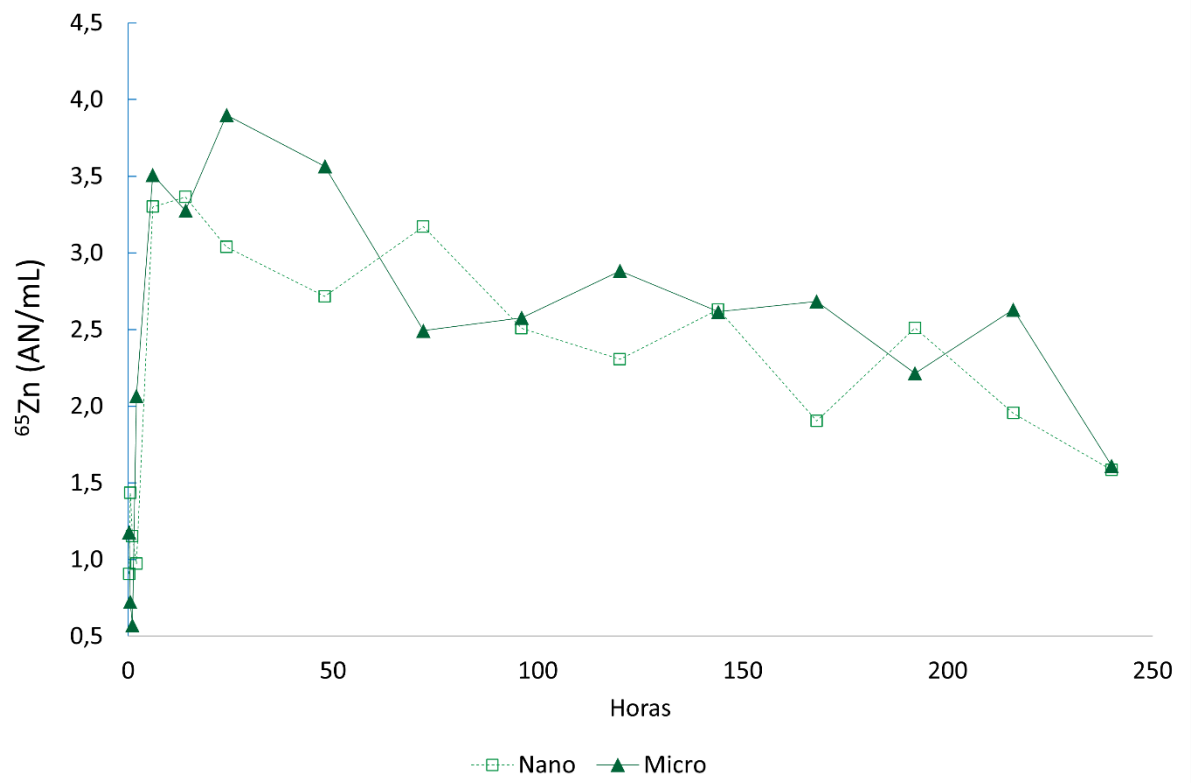
Órgãos	Tratamentos	
	Nano	Micro
Osso	170 $\pm$ 11	119 $\pm$ 63
Pelo	107 $\pm$ 28	114 $\pm$ 13
Fígado	37,1 $\pm$ 8,8	30,9 $\pm$ 1,9
Baço	22,8 $\pm$ 3,8	26,7 $\pm$ 1,2
Músculo	25,1 $\pm$ 4,6	23,9 $\pm$ 6,3
Pâncreas	16,3 $\pm$ 1,5	16,6 $\pm$ 2,8
Coração	13,8 $\pm$ 1,4	16,7 $\pm$ 2,0
Pele	11,8 $\pm$ 2,4	15,2 $\pm$ 3,2
Cérebro	13,9 $\pm$ 2,4	11,0 $\pm$ 2,7



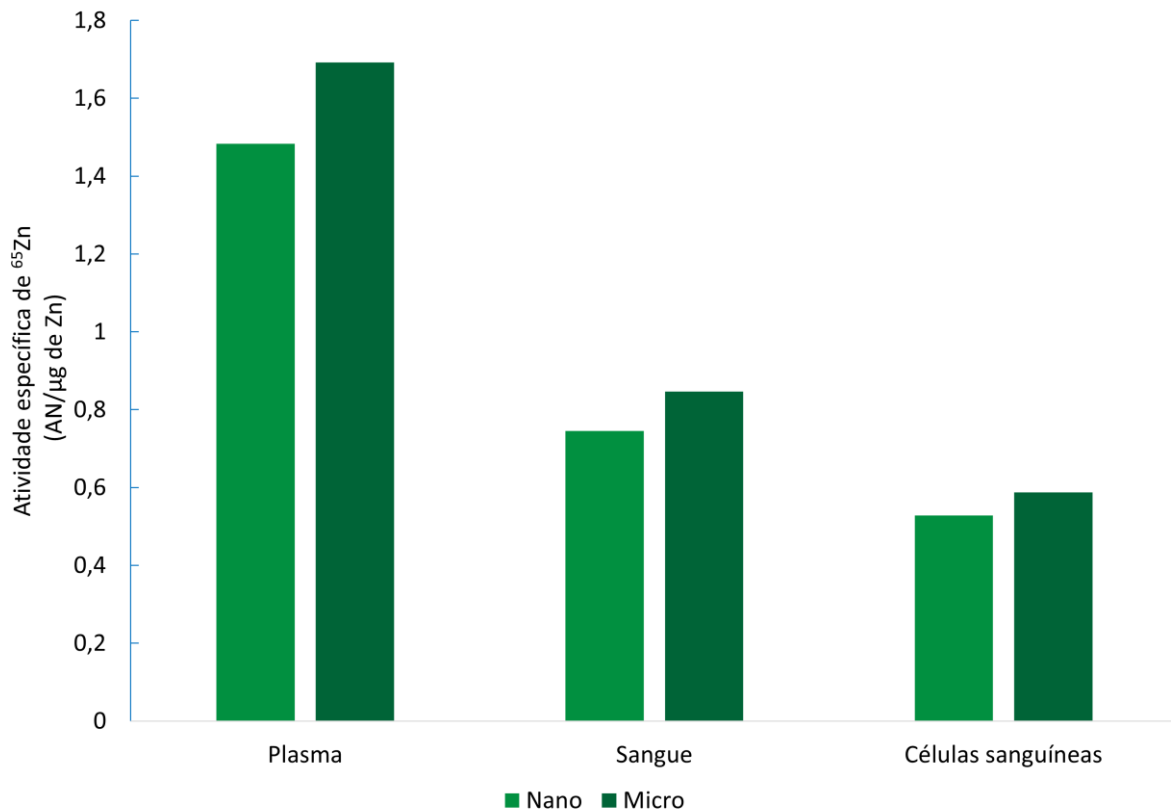
**Figura 2.** Teor de Zn em matéria seca dos tecidos de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral.

#### 4.2. Atividade do $^{65}\text{Zn}$ no sangue

O  $^{65}\text{Zn}$  foi detectado na circulação sanguínea de ambos os tratamentos já na primeira coleta de sangue realizada aos 15 minutos (Figura 3). Enquanto o pico do  $^{65}\text{Zn-n}$  foi em 14 horas, o do  $^{65}\text{Zn-m}$  ocorreu em 24 horas, com ambos tendo queda acentuada após 72 horas. Comparando-se as médias das atividades das coletas dos dois tratamentos, não foi verificada diferença entre eles ( $P>0,05$ ). A atividade específica do  $^{65}\text{Zn}$  no sangue, plasma e células sanguíneas também indicou semelhança entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) (Figura 4).



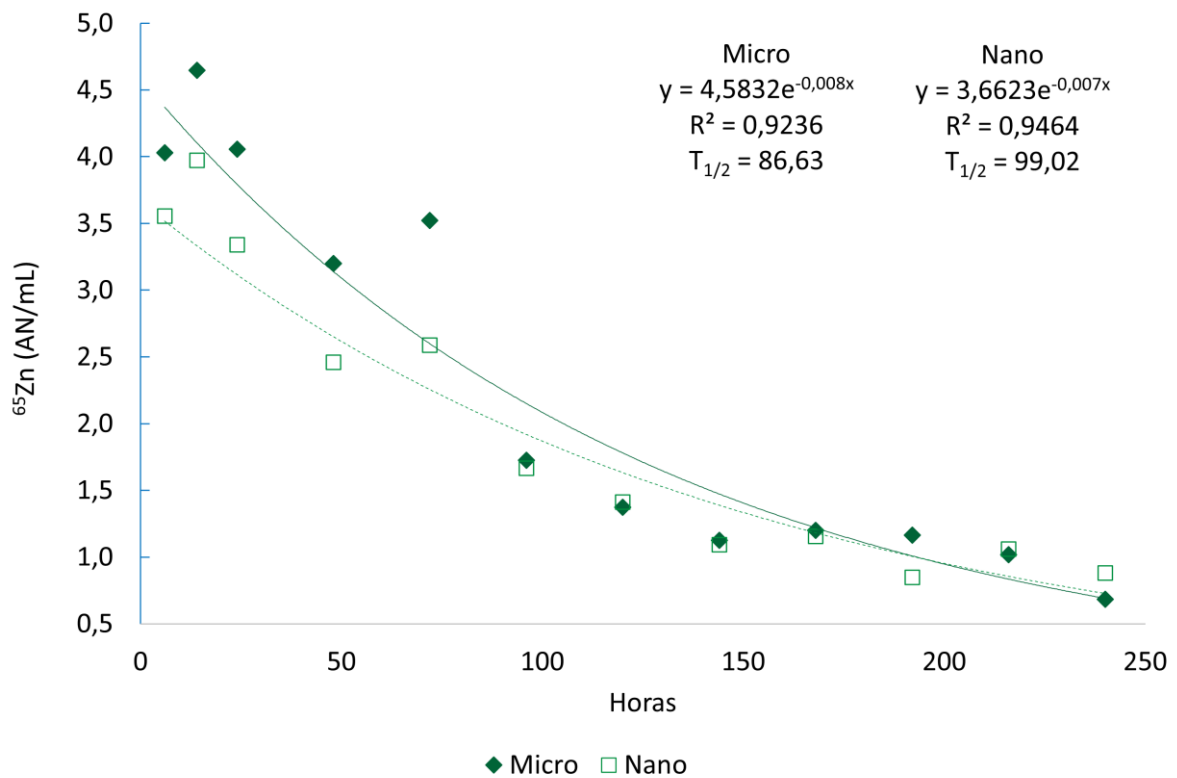
**Figura 3.** Atividade normalizada do  $^{65}\text{Zn}$  no sangue de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  micrométrico e nanométrico via oral.



**Figura 4.** Atividades específicas do  $^{65}\text{Zn}$  no plasma, sangue total e células sanguíneas de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral.

#### 4.3. Meia-vida biológica do $^{65}\text{Zn}$ ( $T_{1/2}$ )

O  $T_{1/2}$  dos animais tratados com  $^{65}\text{Zn-n}$  foi de  $\pm 86,63$  horas, enquanto para os animais tratados com  $^{65}\text{Zn-m}$  foi de  $\pm 99,02$  horas no plasma sanguíneo (Figura 5), não havendo diferença entre eles ( $P > 0,05$ ).

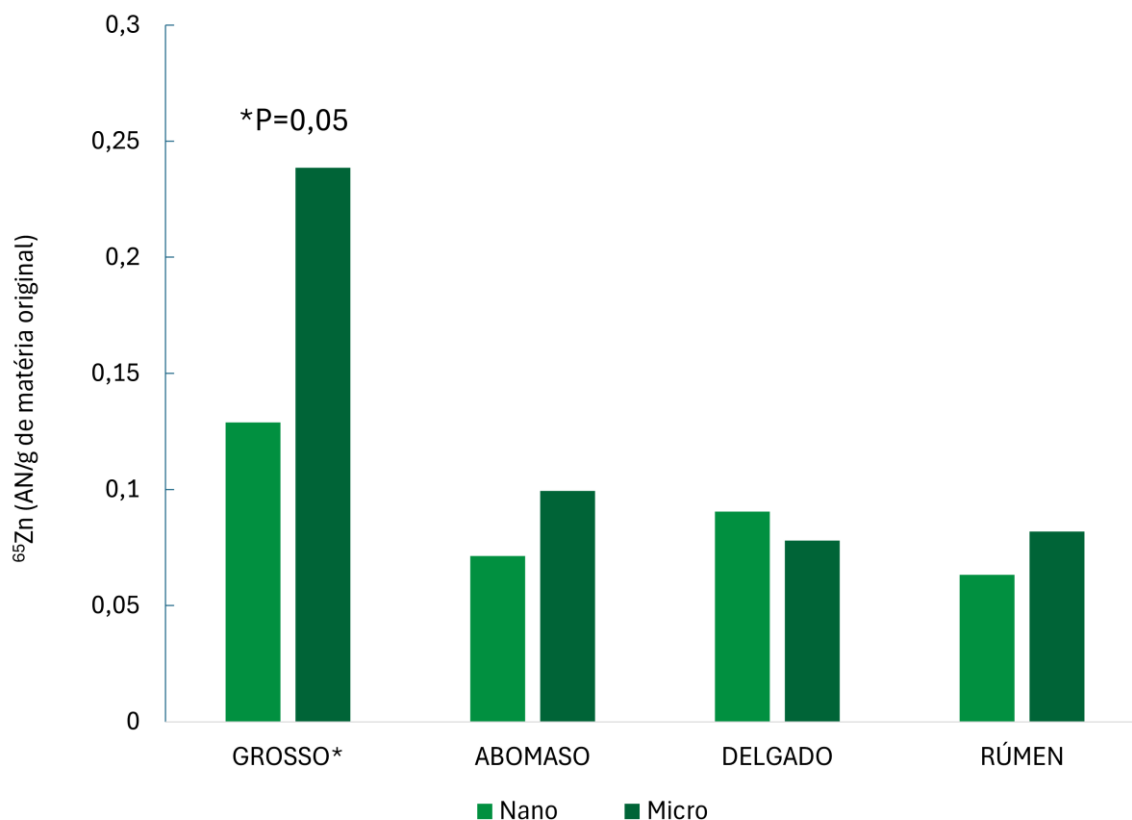


**Figura 5.** Curvas de decaimento biológico do  $^{65}\text{Zn-n}$  e do  $^{65}\text{Zn-m}$  a partir do pico no sangue pela atividade normalizada no plasma de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  micrométrico e nanométrico via oral.

#### 4.4. Excreção

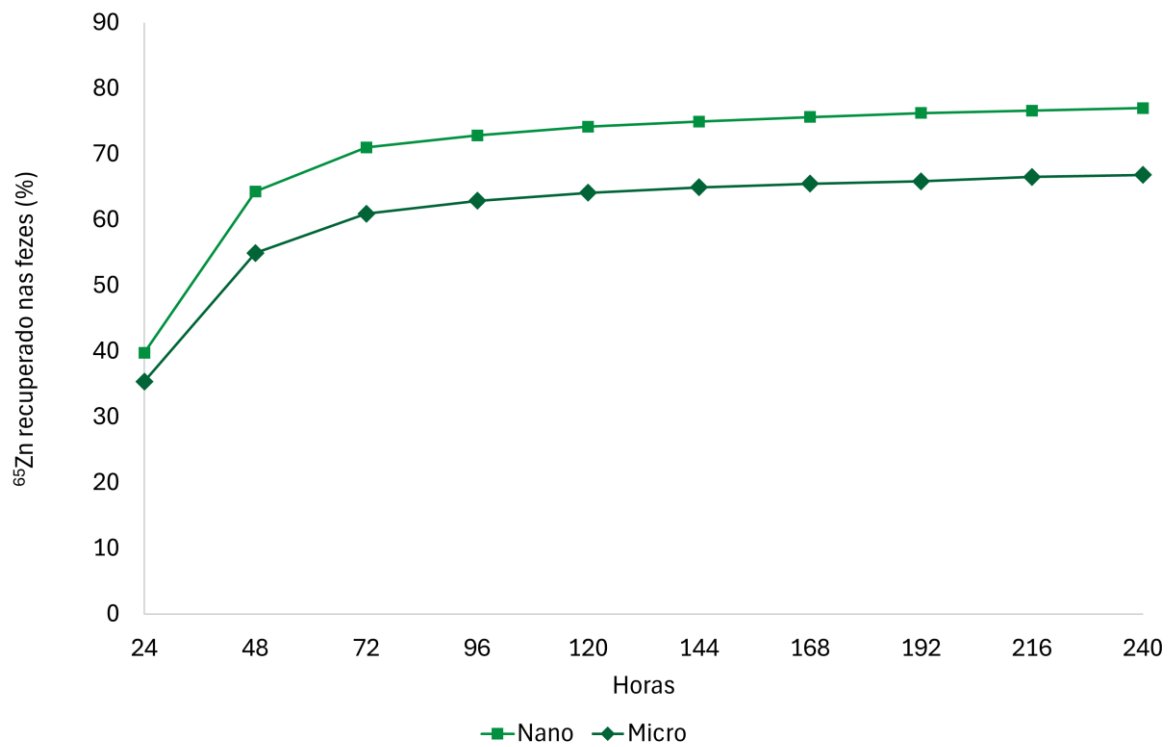
Avaliando os conteúdos dos seguimentos do trato gastrointestinal (rúmen, abomaso, intestinos delgado e grosso), verificou-se que estes apresentaram proporções de  $^{65}\text{Zn}$  abaixo de 0,25% do total recuperado, não havendo diferença entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), com exceção do conteúdo do intestino grosso, que apresentou contagens com diferença estatística, com valores superiores para os animais do tratamento  $^{65}\text{Zn-m}$  em relação ao  $^{65}\text{Zn-n}$  ( $P = 0,05$ ) (Figura 6).





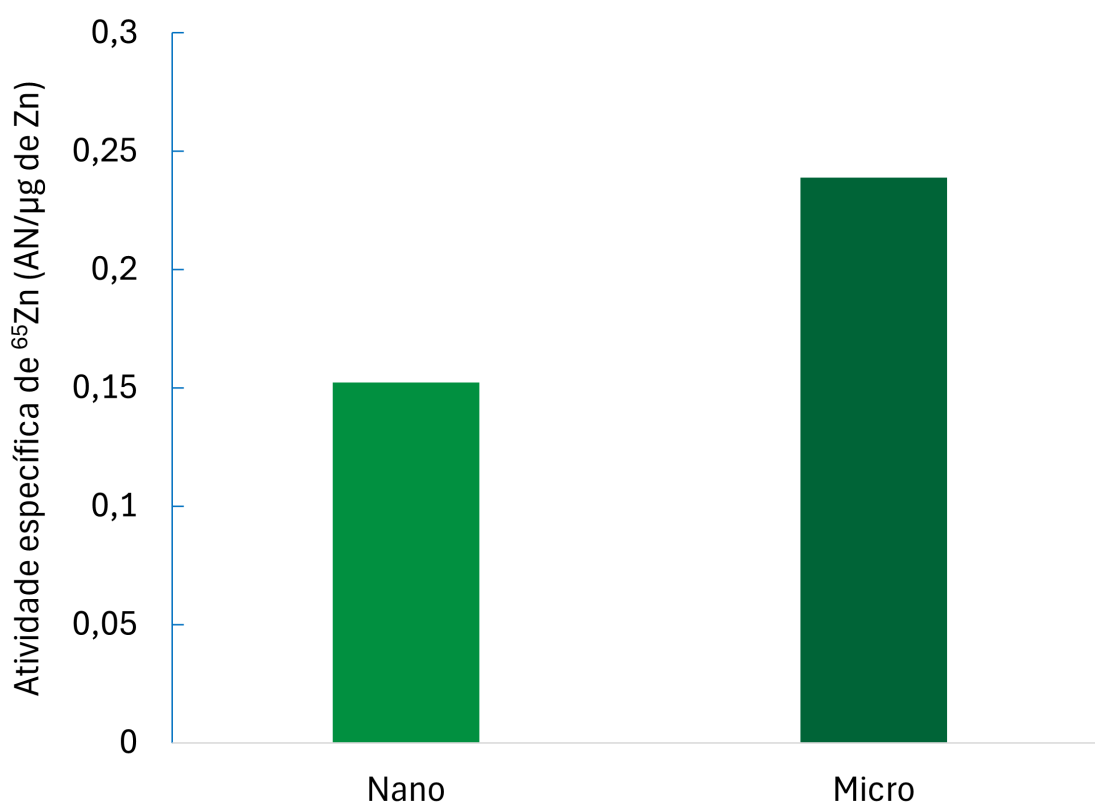
**Figura 6.** Atividade normalizada do  $^{65}\text{Zn}$  nos conteúdos dos diferentes segmentos do trato digestório de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral. \*Diferença significativa entre tratamentos ( $P \leq 0,05$ ).

A excreção em ambos os tratamentos do  $^{65}\text{Zn}$  ocorreu principalmente pelas fezes, com valores insignificantes de  $^{65}\text{Zn}$  na urina. A maior parte do  $^{65}\text{Zn}$  já havia sido excretado nas fezes em 72 h horas pós-ingestão, sendo que quantidades menores foram recuperadas com o decorrer dos 10 dias de observação. Ao fim deste período, os animais do tratamento  $^{65}\text{Zn-n}$  haviam eliminado mais de 76% de todo o  $^{65}\text{Zn}$  ingerido, enquanto os do tratamento  $^{65}\text{Zn-m}$  haviam eliminado cerca de 66% (Figura 7). Comparando-se o excretado acumulado durante todo o período experimental, houve diferença entre tratamentos ( $P < 0,0001$ ).



**Figura 7.** Porcentagem acumulada do  $^{65}\text{Zn}$  recuperado nas fezes ao longo de 10 dias em ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral.

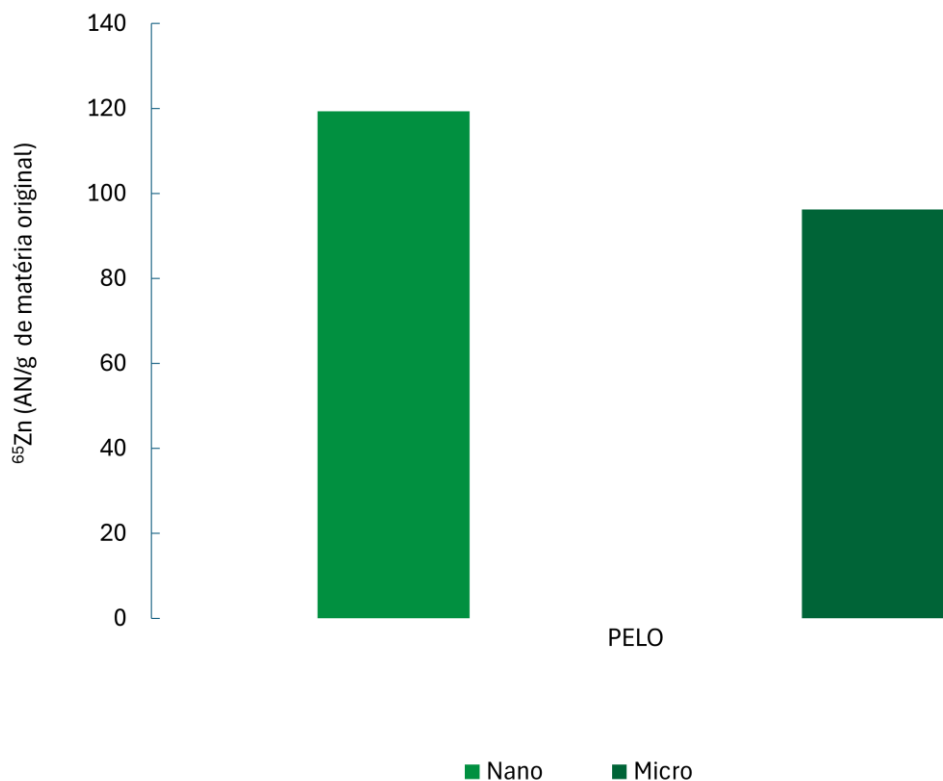
As atividades específicas nas fezes não apresentaram diferença ( $P > 0,05$ ), indicando que a relação entre os teores de  $^{65}\text{Zn}$  e o Zn foi semelhante na excreção (Figura 8).



**Figura 8.** Atividade específica no décimo dia do período experimental nas fezes de ovinos que receberam <sup>65</sup>ZnO nanométrico e micrométrico via oral.

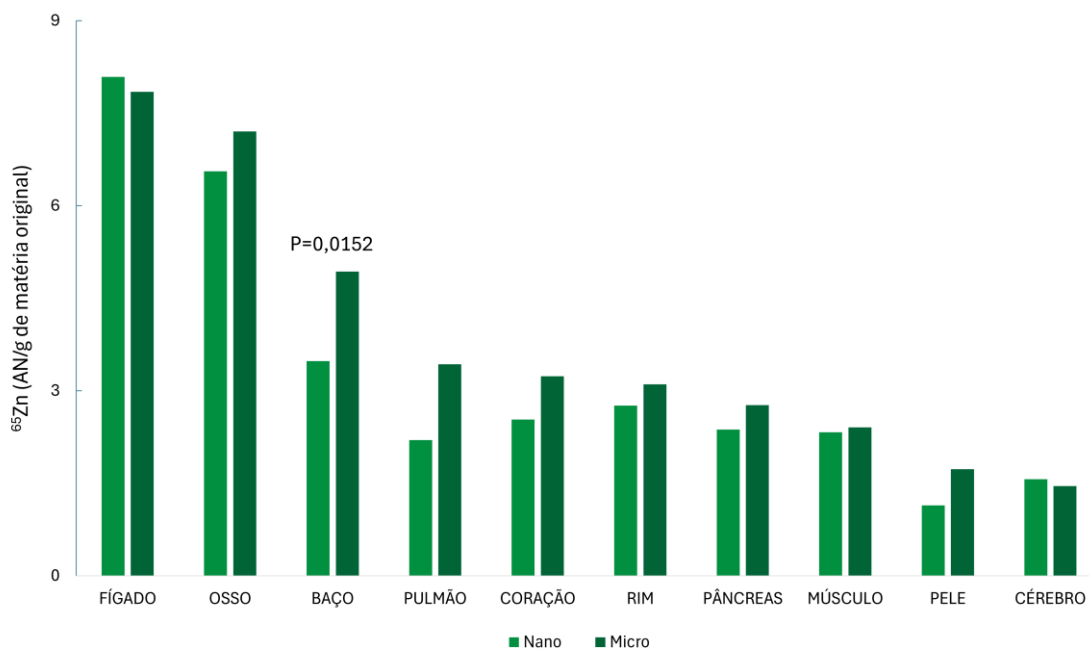
#### 4.5. Distribuição nos tecidos

O principal destino do <sup>65</sup>Zn foi o pelo (Figura 9), com contagens acima de 90 (AN/g de matéria original) em ambos os tratamentos, mas sem diferença entre eles ( $P > 0,05$ ).



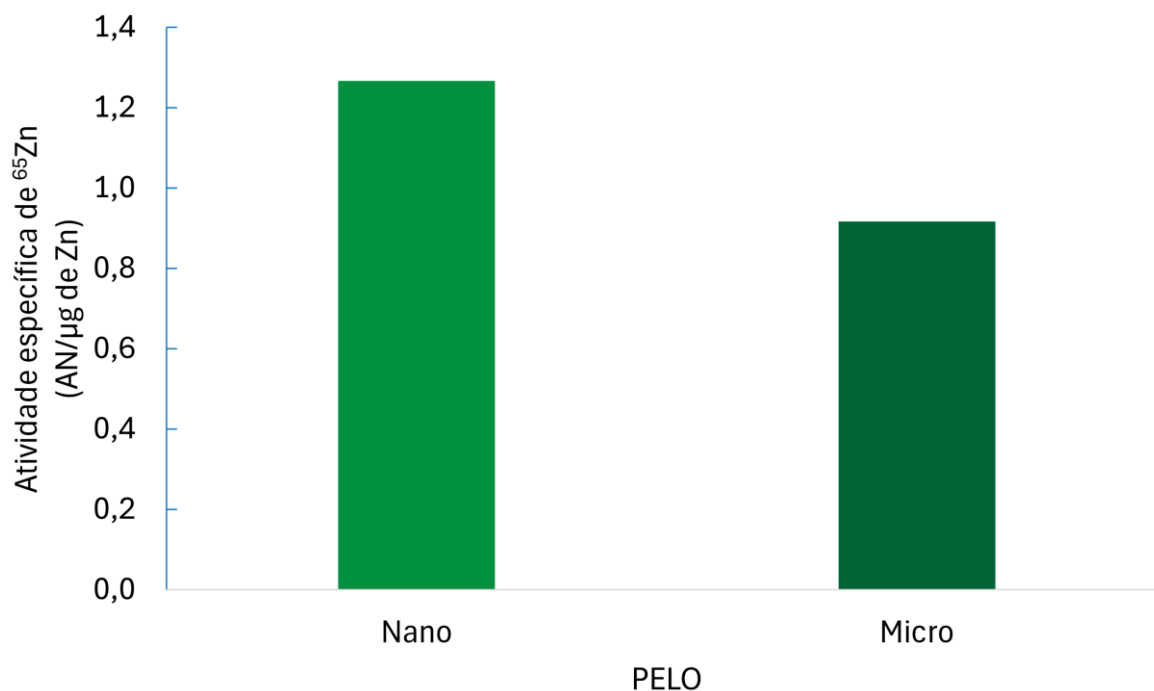
**Figura 9.** Atividade normalizada do <sup>65</sup>Zn no pelo de ovinos que receberam <sup>65</sup>ZnO nanométrico e micrométrico via oral.

Após o pelo, em proporções bem menores e em ordem decrescente, tem-se, fígado, osso e baço em ambos os tratamentos como os principais destinos do <sup>65</sup>Zn (Figura 10). Enquanto as contagens de <sup>65</sup>Zn para o osso e o fígado não apresentaram diferença entre tratamentos ( $P > 0,05$ ), os valores encontrados no baço foram superiores no <sup>65</sup>Zn-m em relação ao <sup>65</sup>Zn-n ( $P = 0,0152$ ). Em relação aos outros tecidos observados, não foram verificadas diferenças entre os dois tratamentos ( $P > 0,05$ ).

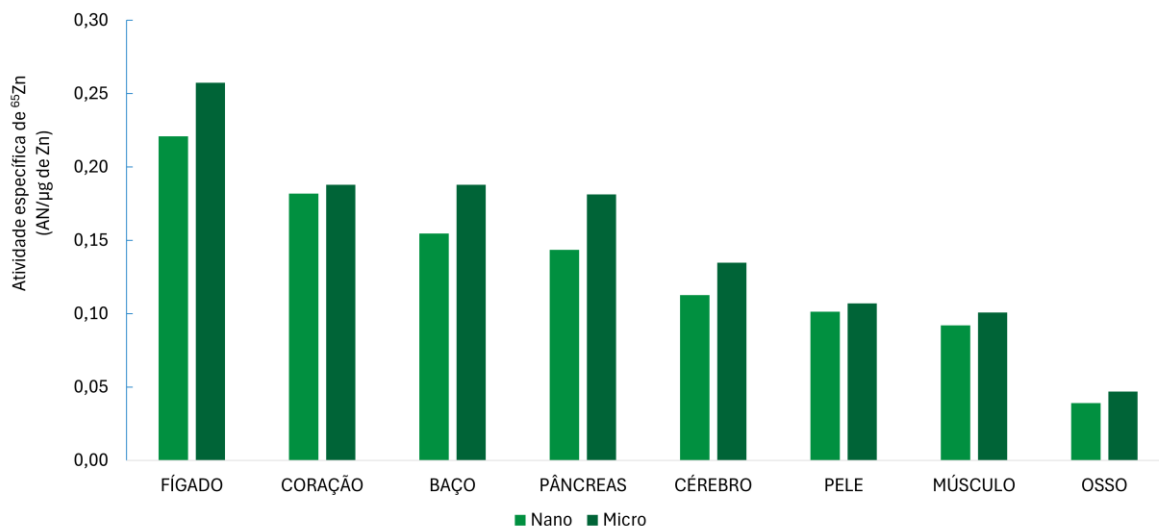


**Figura 10.** Atividade normalizada do  $^{65}\text{Zn}$  em tecidos de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral. \*Diferença significativa entre tratamentos ( $P \leq 0,05$ ).

As atividades específicas observadas no pelo e nos tecidos (Figuras 11 e 12) não apresentaram diferença entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).



**Figura 11.** Atividade específica do  $^{65}\text{Zn}$  no pelo de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral.



**Figura 12.** Atividade específica do  $^{65}\text{Zn}$  nos tecidos de ovinos que receberam  $^{65}\text{ZnO}$  nanométrico e micrométrico via oral.

## 5. DISCUSSÃO

Os animais estavam em condições nutricionais semelhantes, sem suplementação de Zn na dieta, apenas o Zn oriundo dos alimentos, sendo que o desenho experimental foi elaborado para avaliar a distribuição do tamanho da fonte de Zn administrada via oral (Tabela 2 e 3). Neste sentido não se esperava alterações nos teores de Zn nos diferentes componentes do organismo animal, dos dois tratamentos, o que se confirmou (Figura 2).

As quantidades de Zn ingeridas pelos animais estavam dentro dos valores recomendados pelo NRC (2007). No entanto, ao longo do período experimental, os animais apresentaram excreção de Zn maior do que as quantidades ingeridas do mineral (Tabela 3). Aspecto importante sobre o metabolismo de Zn é o seu *status* corporal, que participa da regulação da absorção (MILLER, 1970), o que pode ter sido fator determinante para uma menor absorção e, conseqüentemente, maiores valores de excreção, pois observando o desempenho dos animais eles ganharam peso corporal (200g/animal/dia), se contrapondo a uma possível deficiência de zinco, que

está atrelada ao desenvolvimento deficitário e perda em peso corporal (SUTTLE, 2010).

Os valores de Zn nos tecidos dos dois tratamentos (Tabela 4) estão de acordo com o verificado na literatura por Ott *et al.* (1964), que verificaram os teores em animais com dieta deficitária em zinco e em animais com suplementação do mineral, estando os animais deste presente estudo com valores intermediários entre os dois tratamentos do estudo citado.

A presença do  $^{65}\text{Zn}$  no sangue aos quinze minutos após a administração oral nos dois tratamentos mostrou que o  $^{65}\text{Zn}$  foi prontamente absorvido ainda no rúmen, corroborando o trabalho de Wright *et al.* (2008), que verificaram absorção ruminal em ovinos, indicando que este segmento do digestório contribui para homeostase do Zn, embora a literatura indique que sua absorção ocorra principalmente no intestino delgado, pH alcalino, e em ruminantes também no abomaso, pH ácido (SWAIN *et al.*, 2016).

O  $^{65}\text{Zn}$ -n apresentou pico no sangue anterior ao  $^{65}\text{Zn}$ -m, tendo os picos ocorrido em 14 horas e 24 horas, respectivamente. De acordo com Formagio *et al* (2021), em avaliação *in vitro* em que compararam as dissociações de fontes de zinco (ZnO NP 20 nm, ZnO NP 40 nm, ZnSO<sub>4</sub> e ZnO micrométrico) nos conteúdos do trato gastrintestinal de ruminantes, sendo o ZnO NP 40 nm e o ZnO micrométrico semelhantes aos utilizados no presente estudo, a dissociação do ZnO 40 nm foi superior em relação ao ZnO micrométrico nos conteúdos ruminal e abomasal, ao passo que a dissociação do ZnO micrométrico foi superior no conteúdo intestinal. Desta forma, essa separação tempo-espacial na dissociação dos dois tamanhos ofertados pode ter influenciado nos momentos de pico distinto dos tratamentos. Apesar dessa diferença, as contagens do  $^{65}\text{Zn}$  não apresentaram diferença significativa durante todo o período experimental, indicando biodisponibilidade semelhante do mineral nos dois tamanhos ofertados.

Os tempos de meia-vida biológica dos animais entre os tratamentos  $^{65}\text{Zn}$ -n (99,02 horas) e  $^{65}\text{Zn}$ -m (86,63 horas) foram semelhantes ( $P>0,05$ ). No entanto, essa diferença de aproximadamente 12 horas aliada a um pico mais precoce, como relatado anteriormente, pode determinar ações metabólicas mais efetivas em virtude da presença do Zn na circulação sanguínea por mais tempo no tratamento  $^{65}\text{Zn}$ -n. Desta forma, espera-se que, numa suplementação contínua de ZnO nanométrico, o

tempo de fornecimento possa ser mais espaçado em comparação com o ZnO micrométrico.

Passados os dez dias, é esperado, como observado, baixas contagens de  $^{65}\text{Zn}$  nos conteúdos do trato gastrointestinal, uma vez que a ingestão das cápsulas contendo o  $^{65}\text{ZnO}$  ocorreu somente uma vez. De acordo com Suttle, Davies e Field (1982) a regulação da absorção é o principal mecanismo de controle da homeostase do zinco. No entanto, ainda de acordo com estes autores, é reconhecida a excreção endógena desse mineral no intestino delgado através da bile e do suco pancreático, de modo que, enquanto o  $^{65}\text{Zn}$  medido nos conteúdos ruminal e abomasal são possivelmente aquele Zn não absorvido, o  $^{65}\text{Zn}$  nos conteúdos intestinais tem origem incerta.

Apesar da maior parte dos conteúdos do trato gastrointestinal não apresentarem diferença nas contagens de  $^{65}\text{Zn}$  entre os tratamentos, no intestino grosso houve maior contagem nos ovinos do tratamento  $^{65}\text{Zn-m}$ . As ZnO-n podem apresentar maiores solubilidades do que o ZnO comum por conta de suas maiores reatividades e áreas de superfície, o que pode facilitar a passagem do  $^{65}\text{ZnO-n}$  em comparação com o  $^{65}\text{ZnO-m}$  pelo trato gastrointestinal. Além das diferenças físico-químicas, a estrutura anátomo fisiológica do intestino grosso, como a absorção de água do conteúdo, pode estar favorecendo a deposição das partículas maiores nos ovinos do tratamento  $^{65}\text{Zn-m}$ . Ressalta-se ainda que esta situação não favoreceu a absorção do Zn, uma vez que o principal sítio de absorção deste mineral está no intestino delgado, restando a ele somente a excreção.

Nos dois primeiros dias, houve a excreção, em ambos os tratamentos, de mais da metade do  $^{65}\text{Zn}$ , ao passo que, no décimo dia, o total excretado foi cerca de 76% no tratamento  $^{65}\text{Zn-n}$ , e cerca de 66% no tratamento  $^{65}\text{Zn-m}$ . Embora com maior taxa de recuperação do  $^{65}\text{Zn-n}$  nas fezes, especialmente nos dois primeiros dias, não foi verificada diferença nas contagens de  $^{65}\text{Zn}$  na maior parte dos tecidos dos dois tratamentos. Os resultados da excreção corroboram, portanto, o verificado na literatura, em que partículas menores são liberadas num menor intervalo de tempo *in vivo* (BAEK et al., 2012).

Desta forma, com maiores contagens na excreta, mas níveis semelhantes na circulação sanguínea e tempo de meia-vida biológica, o  $^{65}\text{ZnO-n}$  apresenta boa



eficiência em relação ao  $^{65}\text{ZnO-m}$ , sendo interessante a realização de novos estudos para confirmar a tendência verificada no presente estudo.

Ao fim do período experimental, as contagens da atividade do radionuclídeo permitiram determinar os seus principais destinos no corpo do animal. Nesse contexto, o pelo aparece como uma das principais rotas de distribuição, com contagens superiores a 90 (Bq/g de matéria original) em ambos os tratamentos, sem diferença entre eles. O pelo é reconhecidamente uma rota de excreção do zinco (IZINCG, 2004), com as quantidades do Zn no pelo associadas com suas quantidades nos folículos pilosos em um determinado momento. Desta forma, as contagens de  $^{65}\text{Zn}$  medidas nos pelos, cerca de 10 vezes superior do que qualquer outro tecido nos dois tratamentos, indicam sua importância no fluxo do zinco no corpo do animal.

De maneira geral, os dois tamanhos de  $^{65}\text{ZnO}$  ofertados apresentaram cinética semelhante, sendo distribuídos a todos os tecidos medidos, com contagens que não apresentaram diferença entre os tratamentos, com exceção do baço, que apresentou superioridade no tratamento  $^{65}\text{Zn-m}$  ( $P=0,0152$ ). As diferenças nas contagens verificadas no baço não são claras. Este órgão está associado com a retirada de material particulado do sangue, além de ser responsável pela fagocitose das hemácias em processo de senescência na circulação (SABA, 1970). Alguns autores reconhecem a possibilidade do ZnO-n permanecer na forma particulada, e ser assim fagocitado pelos macrófagos presentes no baço (BAEK et al., 2012; YEH et al., 2012). Neste contexto, as variações observadas no baço podem estar relacionadas com a eficiência de absorção de nanopartículas de ZnO pela fagocitose e taxas mais rápidas de *turnover* de Zn, que não requerem uma acumulação nesse órgão. Entretanto, sugere-se que novos estudos sejam realizados para abordar o tema e verificar se essa tendência se confirma.

Chen et al. (2010), Baek et al. (2012) e Yeh et al. (2012) apontam órgãos como o fígado, os rins, o baço e o pulmão como os de maior concentração do zinco nanométrico. Ainda, Yeh et al. (2012) verificou altas concentrações também nos ossos. No presente trabalho, após os dez dias da ingestão oral, o  $^{65}\text{Zn}$  apresentou maiores contagens no fígado, osso, baço e pulmão, corroborando os principais destinos do ZnO-n verificados na literatura.

As atividades específicas do  $^{65}\text{Zn}$  nos tecidos também foram semelhantes entre os dois tratamentos em quase todos os tecidos observados, indicando maior concentração do radionuclídeo em relação ao zinco estável no fígado, coração e baço. Embora com diferença significativa nas contagens totais do  $^{65}\text{Zn}$  no baço no tratamento  $^{65}\text{Zn-m}$ , essa tendência não foi observada na atividade específica, indicando que, embora com maiores contagens em  $^{65}\text{Zn-m}$ , as proporções do radionuclídeo em relação ao Zn mantiveram-se semelhantes em ambos os tratamentos.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O óxido de zinco é um composto que apresenta resultados satisfatórios na suplementação de Zn, desta forma ao compará-lo com uma molécula igual, mas de tamanho nanométrico, podemos determinar a viabilidade dessa partícula reduzida. Nesse contexto, de acordo com os resultados deste trabalho, em que o  $^{65}\text{ZnO-n}$  e o  $^{65}\text{ZnO-m}$  apresentaram cinética semelhante, com ambos os tamanhos de zinco sendo distribuídos para todos os órgãos sem diferenças significativas em grande parte deles, chama atenção o pico mais precoce e tempo de meia vida biológica 12 horas mais longo para as nanopartículas em relação as micropartículas, que merece ser melhor avaliado. Embora sejam necessários mais estudos para avaliar os efeitos do seu uso contínuo, considerando a necessidade da suplementação do Zn e a busca por soluções mais eficientes e viáveis economicamente, este estudo indica ser possível, a princípio, o uso de nanopartículas de óxido de zinco 40 nm em larga escala, como forma de suplementação deste elemento traço.

## REFERÊNCIAS

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official methods of analysis. 20. ed. Gaithersburg: AOAC International, VA, 2016. 3100 p.

ALLEN, J. G. et al. Zinc toxicity in ruminants. **Journal of Comparative Pathology**, v. 93, n. 3, p. 363-377, 1983. DOI: 10.1016/0021-9975(83)90024-5.

BAEK, M. et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p.3081-3097, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S32593>.

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.

CHASAPIS, C. T. et al. Recent aspects of the effects of zinc on human health. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 1443-1460, 2020. DOI: 10.1007/s00204-020-02702-9.

CHEN, J. K. et al. The use of radioactive zinc oxide nanoparticles in determination of their tissue concentrations following intravenous administration in mice. **Analyst**, v. 135, p. 1742-1746, 2010. DOI: 10.1039/c0an00110d.

DE VEGA, A.; POPPI, D.P. Extent of digestion and rumen condition as factors affecting passage of liquid and digesta particles in sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 128, p. 207-215, 1997. DOI: 10.1017/S0021859696004078.

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>>.

FORMAGIO, J. P. Ensaio *in vitro* para avaliação da cinética de difusão de nanopartícula de zinco no trato digestivo de ovinos por espectrometria de fluorescência de raios x. *In*: SIICUSP, 29., 2021, on-line. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2021.

HICKORY, W. et al. Fetal skeletal malformations associated with moderate zinc deficiency during pregnancy. **The Journal of Nutrition**, v. 109, n. 5, p. 883-891, 1979. DOI: 10.1093/jn/109.5.883.

HOSSEINI-VARDANJANI, S. F. et al. Effect of feeding nano-ZnO on performance, rumen fermentation, leukocytes, antioxidant capacity, blood serum enzymes and minerals of ewes. **Small Ruminant Research**, v. 191, 2020. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2020.106170.

International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) et al. IZiNCG technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 25, n. 1, s. 2, p. S99-S203, 2004. PMID: 18046856.

KABATA-PENDIAS, A.; SZTEKE, B. Trace elements in abiotic and biotic environments. Boca Raton: CRC Press, v. 1, 2015.

KIMURA, T.; KAMBE, T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 336, 2016. DOI: 10.3390/ijms17030336.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc oxide – From synthesis to application: a review. **Materials**, v. 7, p. 2833-2881, 2014. DOI: 10.3390/ma7042833.

KREBS, N. F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. **The Journal of Nutrition**, v. 130, suppl. 5, p. 1374-1377, 2000. DOI: 10.1093/jn/130.5.1374S.

MAARES, M.; HAASE, H. Zinc and immunity: An essential interrelation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 611, p. 58–65, 2016. DOI: 10.1016/j.abb.2016.03.022.

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-.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2002.

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

MURRAY, E. J.; MESSER, H.H. Turnover of bone zinc during normal and accelerated bone loss in rats. **J Nutr.**, v. 111, p. 1641-1647, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/111.9.1641>.

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.

National Nanotechnology Initiative. **National Science and Technology Council (NSTC)**, 2004. Disponível em: [https://www.nano.gov/sites/default/files/pub\\_resource/nni\\_strategic\\_plan\\_2004.pdf](https://www.nano.gov/sites/default/files/pub_resource/nni_strategic_plan_2004.pdf)

National Research Council - NRC. Nutrition requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and world camelids. Washington, DC: The National Academy of Science Press, 2007.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006. DOI: 10.1126/science.1114397.

OBERDÖSTER, G. et al. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823-839, 2005. DOI: 10.1289/ehp.7339.

OMS - Organização Mundial de Saúde. The world health report, 2002. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9241562072>>.

OTT, E. A. et al. Zinc deficiency syndrome in the young lamb. **The Journal of Nutrition**, v. 82, n. 1, p. 41-50, 1964. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/82.1.41>.

PRASAD, A. S. Discovery of human zinc deficiency: Its impact on human health and disease. **American Society for Nutrition**, v. 4, p. 176-190, 2013. DOI: 10.3945/an.112.003210.

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).

RAJENDRAN, D. et al. Enhancing the milk production and immunity in Holstein Friesian crossbred cow by supplementing novel nano zinc oxide. **Research Journal of Biotechnology**, v. 8, n.5, 2013.

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, 2010. DOI: 10.1517/17425247.2010.502560.

ROBBINS, C. R. **Chemical and physical behavior of human hair**. 5 ed. Springer, 2012.

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.

SABA, T. M. Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. **Archives of Internal Medicine**, v. 126, n. 6, p. 1031-1052. DOI: 10.1001/archinte.1970.00310120093014.

SALGUEIRO, M. J. et al. Bioavailability, biodistribution, and toxicity of BioZn-AAS: a new zinc source. Comparative studies in rats. **Nutrition**, v. 16, p. 762-766. 2000. DOI: 10.1016/s0899-9007(00)00379-8.

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 phyto-genic zinc nanoparticles on soil exo-enzymes. **Applied Nanosciences**, v. 4, p. 819-827, 2013. DOI: 10.1007/s13204-013-0263-4.

SUTTLE, N. F.; DAVIES, H. L.; FIELD, A. C. A model for zinc metabolism in sheep given a diet of hay. **The British Journal of Nutrition**, v. 47, n. 1, n. 105-112, 1982. DOI: 10.1079/bjn19820015.

SUTTLE, N. F. **Mineral nutrition of livestock**. 4 ed. Penicuik: CABI, 2010.

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.

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.

SZUBA-TRZNADEL, A. et al. Effect of zinc source and level on growth performance and zinc status of weaned piglets. **Animals**, v. 11, n. 7, 2021. DOI: 10.3390/ani11072030.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P. J. **Nutrition ecology of the ruminant**. 2 ed. Comstock, 1994.

WANG, B. et al. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. **Toxicology Letter**, p. 115-123, 2006. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.08.007.

WHITE, C. L. et al. The effect of zinc deficiency on wool growth and skin and wool follicle histology of male Merino lambs. **British Journal of Nutrition**, v. 71, p. 425-435, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1079/bjn19940149>.

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.

YEH, T. K. et al. Kinetics and tissue distribution of neutron-activated zinc oxide nanoparticles and zinc nitrate in mice: effects of size and particulate nature. **Nanotechnology**, v. 23, n. 8, 2012. DOI: 10.1088/0957-4484/23/8/085102.

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.