



13º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS



INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE ZINCO A DISPERSÕES DE BIOPOLÍMEROS E LIBERAÇÃO DO ÍON METÁLICO *IN VITRO*

Marina S. R. Barreto (D), Willian H. Ferreira (D), Cristina T. Andrade

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - RJ, marinarodriguesbarreto@gmail.com

Resumo

Nanopartículas de óxido zinco (ZnO), obtidas a partir do produto comercial, foram dispersas em diferentes biopolímeros, para adição em rações de leitões. Os produtos resultantes, preparados com alginato de sódio (SA), quitosana (CH) e pectina de baixo teor em grupamentos metoxílicos (LMP), foram caracterizados pelas técnicas de difração de raios-X (XRD), por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e por microscopia eletrônica de varredura (SEM). A liberação de Zn^{2+} foi investigada em condições simuladas do trato gastrintestinal de leitões, por meio de espectroscopia de absorção atômica (AA). Os resultados obtidos mostraram que os fatores estruturais, que influenciam as interações biopolímero/ZnO, regem o comportamento de liberação do Zn^{2+} .

Palavras-chave: *óxido de zinco, biopolímeros, liberação controlada in vitro*

Incorporation of zinc oxide to dispersions of biopolymers and release of the metallic ion in vitro

Abstract

Zinc oxide (ZnO) nanoparticles, obtained from a commercial product, were dispersed in different biopolymers, to be added to piglet feeds. The resulting products, prepared with sodium alginate (SA), chitosan (CH) and low methoxyl pectin (LMP) were characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). The release of Zn^{2+} was investigated under simulated conditions of the gastrointestinal tract of piglets, and analyzed by atomic absorption spectroscopy (AA). The results showed that the structural factors, which have influence on the biopolymer/ZnO interactions, govern the behavior of Zn^{2+} release.

Keywords: *zinc oxide, biopolymers, in vitro controlled release*

Introdução

Na suinocultura moderna, os animais são desmamados aos 21 dias de idade, com o objetivo de aumentar a produtividade. As primeiras semanas pós-desmame são particularmente estressantes e imunossupressoras para os animais. A separação física da matriz e a transição do leite para uma alimentação sólida e complexa, aliada à imaturidade do sistema digestivo, resultam em dano intestinal. O desmame antecipado dos leitões é comumente acompanhado por atraso no crescimento, inclusive com perda de peso e diarreia.

A diarreia pós-desmame é uma doença multifatorial, que acomete os suínos nas duas primeiras semanas após o desmame. As perdas econômicas advindas dessa doença são significativas, podendo chegar a 10% de mortalidade, aumento no número de refugos, atraso no desenvolvimento e gastos com medicamentos. A fim de melhorar o desempenho animal, aditivos promotores do crescimento são comumente adicionados às rações oferecidas aos animais. O óxido de zinco (ZnO) é conhecido por melhorar o desempenho de leitões recém-desmamados e, portanto, tem sido incorporado às dietas. A atividade antibacteriana do ZnO foi comprovada, sobretudo contra bactérias Gram positivas [1]. A *Escherichia coli*, bactéria naturalmente presente no trato gastrointestinal dos suínos, é o principal agente relacionado à colibacilose, doença conhecida como diarreia pós-desmame [2]. A adoção de novas tecnologias na administração de nutrientes tem sido enfatizada nos últimos anos, podendo ser uma solução para limitar a quantidade de aditivos. Por meio de técnicas de encapsulação, micro ou nanopartículas de nutrientes ou aditivos podem ser aprisionadas em filmes

poliméricos. A liberação do produto encapsulado pode ser regulada, de acordo com o objetivo pretendido. Os biopolímeros são materiais frequentemente escolhidos para o desenvolvimento de cápsulas resistentes à porção superior do trato gastrointestinal, e liberação do material encapsulado em ambiente intestinal [3]. Em alguns polissacarídeos, como os alginatos, as quitosanas e as pectinas, a presença de grupos funcionais, como ácidos urônicos e amino, além dos grupamentos hidroxílicos, favorece a interação entre esses biopolímeros e o ZnO.

De modo geral, os alginatos são obtidos de algas pardas e consistem de cadeias lineares formadas de blocos de (1,4)- β -D-ácido manurônico (blocos M), de (1,4)- α -L-ácido gulurônico (blocos G) e de blocos de ambas as unidades arranjadas alternadamente (blocos MG). As quitosanas são biopolímeros lineares, obtidas pela desacetilação da quitina, e formadas de unidades repetitivas de (1,4)- β -2-amino-3-desoxi-D-glicose e (1,4)- β -2-acetamido-2-desoxi-D-glicose. As pectinas podem ser obtidas a partir de resíduos de indústrias de sucos (laranja, limão, maçã). São polissacarídeos complexos, constituídos por vários monossacarídeos. De modo bastante simplificado, as pectinas de baixo teor em grupamentos metoxílicos são consideradas como polissacarídeos formados por unidades de (1,4)- α -D-ácido galacturônico, em maior composição. Unidades do éster metílico do D-ácido galacturônico e de monossacarídeos neutros (L-ramnose, D-galactose, L-arabinose, D-xilose) estão presentes.

Esse trabalho objetivou encapsular o ZnO comercial em diferentes biopolímeros, como o alginato de sódio (SA), a quitosana (CH) e a pectina de alto teor em grupos metoxílicos (LMP). O trabalho também visou caracterizar os materiais obtidos e investigar a liberação de Zn^{2+} em condições simuladas do trato gastrintestinal de leitões.

Experimental

Preparação e caracterização das amostras

O ZnO comercial foi disperso e homogeneizado em água Milli-Q sob agitação intensa (Ultra-Turrax IKA, modelo T25) por 30 minutos. Separadamente, dispersões dos biopolímeros foram preparadas e gotejadas sobre a dispersão de ZnO. As dispersões a 2% (m/v) de alginato de sódio (SA, Sigma-Aldrich) e de pectina de alto teor em grupamentos metoxílicos (LMP, CP Kelco) foram preparadas em água Milli-Q. A dispersão de quitosana (CH, Sigma-Aldrich) a 2% (m/v) foi preparada em ácido acético a 2% (v/v). Após outros 10 min sob agitação, as amostras foram secas em estufa a 70°C. Após a secagem, os produtos foram caracterizados. Para a investigação da cristalinidade dos produtos, a técnica de difração de raios X (XRD) foi usada em equipamento Ultima IV (Rigaku Corporation, Osaka, Japan). Espectros de absorção no infravermelho (FTIR) foram obtidos para os produtos sob a forma de pastilhas de KBr, em equipamento Varian, modelo Excalibur Series (Mulgrave, Australia). A morfologia dos produtos foi visualizada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 400 (Eindhoven, The Netherlands).

Liberação de Zn^{2+} em meio gastrointestinal simulado

A técnica empregada foi adaptada da literatura [4]. Dessa forma, o experimento foi dividido em três etapas. Na primeira etapa, para simular as condições do estômago, 1 g de amostra foi dispersa em 100 mL de água Milli-Q, 25 mL de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 6) e 10 mL de solução de HCl (0,2 M). O pH foi ajustado para 3,9 (pH característico do estômago de leitões), e 1 mL de solução de pepsina (Sigma-Aldrich) a 25 mg/mL foi adicionado à dispersão anteriormente obtida. O sistema permaneceu sob agitação magnética, a 39°C por 2 h. Após esse período, para simular as condições da porção superior do intestino delgado, foram adicionados 10 mL de solução tampão fosfato (0,2 M, pH 6,8) e 5 mL de solução de NaOH (0,6 M). O pH foi ajustado para 6,8 (pH característico do intestino de leitões), e 1 mL de pancreatina (Sigma-Aldrich) foi adicionado. O sistema foi mantido a 39°C por 4 h. Finalmente, foram simuladas as condições fisiológicas da última porção do intestino delgado, com o ajuste do pH para 7 e a adição ao sistema de 1 mL de

solução de lipase a 100 mg/mL (Sigma-Aldrich). A incubação a 39°C permaneceu por 18 h, sob agitação magnética branda. Ao final de 2, 6, 10, 14 e 18 h, foram colhidos 5 mL das dispersões, com reposição do meio, para a quantificação do Zn^{2+} pelo método de espectroscopia de absorção atômica (AA). Para tal, as dispersões ficaram em repouso durante 24 h e o sobrenadante foi analisado.

Resultados e Discussão

Os produtos secos, formados pela incorporação de ZnO aos biopolímeros, foram caracterizados pela técnica de XRD. Os difratogramas obtidos foram praticamente idênticos para todos os produtos, quanto à posição e à intensidade das reflexões características do ZnO (Fig. 1). O tamanho médio dos cristalitos foi determinado para as três amostras pela equação de Scherrer (Eq. 1), aplicada à reflexão 101, de maior intensidade.

$$D = K\lambda/\beta \cos \theta \quad (1)$$

onde D é o diâmetro médio do cristalito em Å, $k = 0,9$ é uma constante de proporcionalidade, $\lambda = 1,5418$ Å é o comprimento de onda da radiação de CuK_{α} , β é a largura à meia altura da reflexão de maior intensidade em radianos, e θ é o ângulo de Bragg em radianos. Em média, o valor de D foi de 40 nm.

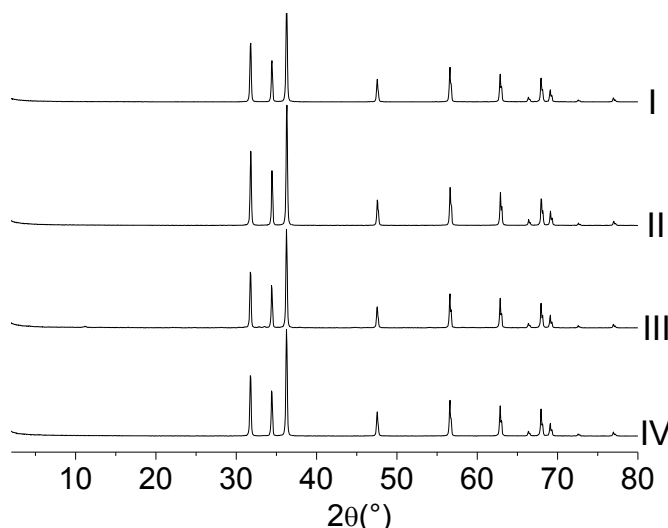


Figura 1: Difratogramas obtidos para o ZnO comercial (I), e os produtos SA/ZnO (II), CH/ZnO (III) e LMP/ZnO (IV).

Os espectros de FTIR obtidos para o ZnO comercial e para os produtos SA/ZnO, CH/ZnO e LMP/ZnO são mostrados na Fig. 2. A absorção larga, em torno de 500 cm^{-1} e com intensidade máxima a 485 cm^{-1} , é atribuída à deformação axial Zn–O. Nos espectros obtidos para os produtos CH/ZnO (II) e LMP/ZnO (III) e AS/ZnO, essa banda também é observada, assim como outras absorções, atribuídas ao estiramento de ligações O–H, N–H, C=O, C–O–C e a absorções atribuídas a deformações angulares (como a de N–H, a 1576 cm^{-1} , no espectro de CH/ZnO), de acordo com o produto considerado.

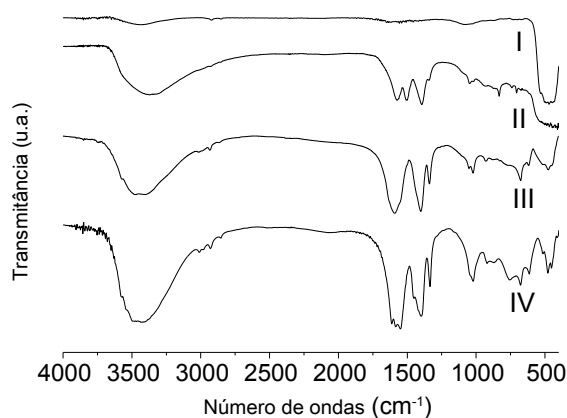


Figura 2: Espectros de FTIR obtidos para o ZnO comercial (I), e para os produtos CH/ZnO (II), LMP/ZnO (III) e SA/ZnO (IV).

A morfologia dos produtos foi investigada por SEM, e a Fig. 3 (a-d) mostra as micrografias obtidas com aumento de 10000x. É possível observar que, embora aglomeradas, o tamanho das partículas é reduzido.

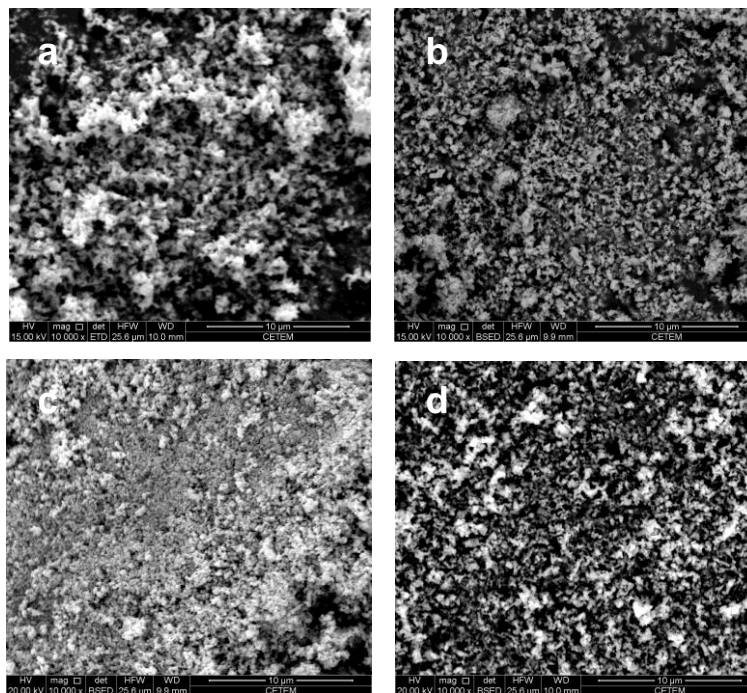


Figura 3: Micrografias obtidas por SEM para o ZnO comercial (a), e para os produtos SA/ZnO (b), CH/ZnO (c), LMP/ZnO (d).

Para a investigação da liberação de Zn^{2+} no trato gastrointestinal, o experimento consistiu de três etapas, nas quais o pH e as enzimas adicionadas, assim como o tempo de exposição, visaram simular as condições características de leitões. A concentração de Zn^{2+} disponível em cada um dos compartimentos do trato gastrointestinal foi quantificada por meio de espectrofotometria de absorção atômica. Os resultados dessas análises podem ser observados na Fig. 4 e revelaram a elevada interação entre o SA e o ZnO. Assim, quando o comportamento do ZnO comercial foi investigado, cerca de $1,2 \times 10^3$ mg/L de Zn^{2+} estavam disponíveis no estômago, 168 mg/L no

intestino delgado 1 e 87,5 mg/L no intestino delgado 2. Para o produto LMP/ZnO, 1,1 x10³ mg/L e 45,6 mg/L ficaram disponíveis no estômago e no intestino delgado 1. Para o produto CH/ZnO, foram quantificadas 1,25 mg/L, 151 mg/L e 101 mg/L, respectivamente nas condições do estômago e dos dois intestinos delgados. Por outro lado, para o produto SA/ZnO, devido à interação mais forte entre o alginato de sódio e o ZnO, uma concentração bem mais baixa de Zn²⁺, 396 mg/L, foi liberada no estômago, e concentrações de Zn²⁺ de 84,8 mg/L e 64,9 mg/L foram liberadas nos intestinos delgados 1 e 2, respectivamente. A maior liberação de Zn²⁺ no estômago era esperada, em função da dissociação dos complexos em pH baixo. A menor liberação de Zn²⁺ no estômago, determinada para o produto SA/ZnO, pode ser explicada pela estrutura em bloco do alginato, a qual favorece a monocomplexação, a dimerização e associações cadeia-cadeia [5].

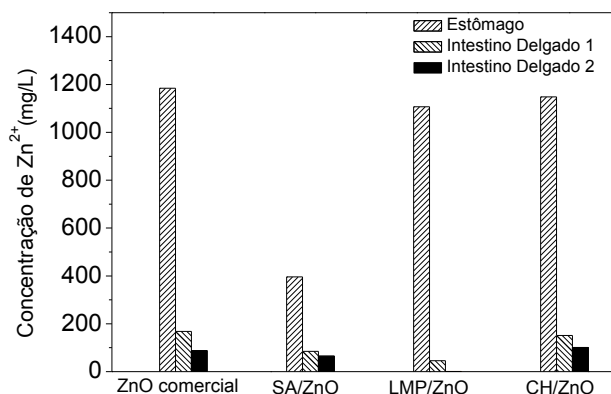


Figura 4: Concentração de Zn²⁺ (mg/L) em cada um dos compartimentos do trato gastrointestinal *in vitro*.

Conclusões

Os resultados mostraram que os produtos com ZnO estruturado em dispersões de biopolímeros diferenciaram-se entre si quanto à liberação de Zn²⁺ nos diversos compartimentos ao longo do trato gastrointestinal simulado. A distribuição aleatória de grupos funcionais adquirida na síntese da quitosana e da pectina de baixo grau em grupamentos metoxílicos, em contraste com a distribuição em bloco no alginato, justificam os resultados.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, do CNPq e da FAPERJ.

Referências

1. J.M. Heo; F.O. Opapeju; J.R. Pluske; J.C. Kim; D.J. Hampson; C.M. Nyachoti. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2013, 97, 207.
2. G.J.M.M. Lima; N. Morés; R.L. Sanches. *Acta Scientiae Veterinariae* 2009, 37, S-17-S-30.
3. K.R. Patel; M.R. Patel; T.J. Mehta; A.D. Patel; N.M. Patel. *Int. J. Pharm. Technol.* 2011, 3, 894.
4. S. Boisen; J.A. Fernandez. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1997, 68, 277–286.
5. Y. Fang; S. Al-Assaf; G.O. Phillips; K. Nishinari; T. Funami; P. A. Williams. *Carbohydr. Polym.* 2008, 72, 334.