



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

MARINA SÍGOLO RODRIGUES BARRETO

**ÓXIDO DE ZINCO ESTRUTURADO EM BIOPOLÍMEROS:
CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
LIBERAÇÃO *IN VITRO* EM MODELO SUÍNO**

Rio de Janeiro

2016

Marina Sígolo Rodrigues Barreto

**ÓXIDO DE ZINCO ESTRUTURADO EM BIOPOLÍMEROS: CARACTERIZAÇÃO,
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E LIBERAÇÃO *IN VITRO* EM MODELO SUÍNO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Cristina Tristão de Andrade
Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila

Rio de Janeiro

2016

B273

Barreto, Marina Sígolo Rodrigues.

Óxido de zinco estruturado em biopolímeros: caracterização, atividade antimicrobiana e liberação *in vitro* em modelo suíno/ Marina Sígolo Rodrigues Barreto – Rio de Janeiro: IQ/ UFRJ, 2016.

84f.; il

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Rio de Janeiro, 2015.

Orientadores: Cristina Tristão de Andrade e Eduardo Mere Del Aguila.

1. Quitosana. 2. Alginato. 3. Pectina. 3. Óxido de Zinco. 4. Liberação *in vitro*. 5. Atividade antimicrobiana. 6. Leitões recém-desmamados. I. Andrade, Cristina Tristão de . (Orient.). II. Aguila, Eduardo Mere Del. (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IIV Título..

CDD: 664.001

MARINA SÍGOLO RODRIGUES BARRETO

**ÓXIDO DE ZINCO ESTRUTURADO EM BIOPOLÍMEROS: CARACTERIZAÇÃO,
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E LIBERAÇÃO *IN VITRO* EM MODELO SUÍNO**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 29 de abril de 2016.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Cristina Tristão de Andrade – IMA/UFRJ
(Orientadora)

Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila-IQ/UFRJ
(Coorientador)

Prof.^a Dr.^a Daniela Sales Alviano – CCS/UFRJ

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Junior - UFF

Prof.^a Dr.^a Leila Léa Yuan Visconte – IMA/UFRJ

Prof. Dr. Edwin Gonzalo Azero Rojas - UNIRIO

DEDICATÓRIA

Ao meu Samuel pelo seu amor sincero e por ensinar-me o que é mais valioso na vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais uma conquista.

Ao meu marido, Carlos Vinícius, pelo companheirismo, incentivo e, principalmente, por ser um exemplo de pessoa dedicada e esforçada.

Aos meus pais, Rita e Renato, sempre tão amorosos e encorajadores. Obrigada por toda ajuda durante esses quatro anos e principalmente por acreditarem sempre em mim!

À minha sogra, Maria Terezinha, pelo apoio, pela torcida e disposição em me ajudar ao longo dessa jornada.

À professora Dra. Cristina Tristão de Andrade pela orientação e, principalmente, pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Dr. Eduardo M. Del Aguila, pela coorientação, pelos ensinamentos, apoio e disponibilidade.

À professora Vânia M. Flosi Paschoalin por disponibilizar seu laboratório, pelos ensinamentos e ajuda para o desenvolvimento desta tese.

Ao professor Lúcio Mendes Cabral por disponibilizar o Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica (LabTIF) e ao professor Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva por toda ajuda e ensinamentos para a secagem em Spray dryer e condução dos ensaios de liberação *in vitro*.

Ao professor Edwin G. Azero Rojas por dispor de seu tempo e conhecimento para realização das análises reológicas.

Ao Instituto de Macromoléculas – IMA, da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelas análises realizadas em seus laboratórios e aos profissionais sempre dispostos a ajudar.

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

Aos amigos do LAHBIO/IMA, Willian Hermógenes, Júlia Freitas, Adriana Marques, Juliana Gomes, Vinícius Viana, Rodrigo Gouvêa e Pamela F. de Moura Pereira pela amizade, apoio, ensinamentos e momentos agradáveis de descontração.

Aos colegas do LAABBM/IQ, Cintya Freitas e Patrícia Pereira por toda ajuda, e principalmente ao Laidson Paes, sempre disposto a compartilhar seus conhecimentos. Como não agradecer ao Rafael Luiz por estar sempre disposto a ajudar, pelo seu bom-humor e cafezinhos de cada dia.

Ao Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, principalmente ao profissional Alexandre Gaspar pelas muitas análises de espectroscopia por absorção atômica realizadas.

À empresa Auster Nutrição Animal, pela ajuda na aquisição do ZnO comercial, alginato de sódio e enzimas.

RESUMO

BARRETO, Marina Sígolo Rodrigues. Óxido de zinco estruturado em biopolímeros: Caracterização, atividade antimicrobiana e liberação *in vitro* em modelo suíno. Rio de Janeiro, 2016. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O óxido de zinco (ZnO) é um importante antimicrobiano que é adicionado às dietas de leitões recém-desmamados a fim de combater a diarreia comum a esta fase de criação. Doses elevadas de ZnO têm-se mostrado efetivas no campo; porém, grande parte é perdida com os dejetos dos animais, contaminando os solos e o lençóis freáticos. Por ser solúvel em pH ácido, o ZnO se dissocia no estômago e, conseqüentemente, uma quantidade menor atinge o intestino dos animais. Alternativas que protejam o ZnO no meio gástrico e permitam a maximização da sua liberação no meio entérico têm sido pesquisadas. Neste estudo, avaliou-se a liberação *in vitro* do zinco (Zn^{2+}) de compostos à base de ZnO estruturado com diferentes biopolímeros e a sua atividade antibacteriana. As amostras obtidas foram caracterizadas pelas técnicas de difração de raios-X (XRD), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), por microscopia eletrônica de varredura (SEM), por análise térmica (TGA), espectroscopia de absorção atômica (AA), distribuição do tamanho de partícula e quanto às propriedades reológicas.

O primeiro grupo de amostras foi obtido com partículas de ZnO comercial complexadas com alginato, pectina e quitosana. Foi investigada a liberação do Zn^{2+} em condições simuladas do trato gastrointestinal de leitões e os resultados mostraram que os produtos com ZnO estruturado em dispersões de biopolímeros diferenciaram-se entre si quanto à liberação de Zn^{2+} . A outra parte das amostras deste primeiro grupo foi preparada com partículas de ZnO dispersas em água e revestidas com quitosana de massa molar média, sonicadas por 10 e 20 minutos. A atividade antibacteriana das micropartículas de ZnO puro e dos compostos ZnO/quitosana foi avaliada para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram uma concentração mínima bactericida (MBC) menor para ZnO puro (500 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e 650 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*) em relação às micropartículas de ZnO/quitosana (1000 $\mu\text{g/mL}$, para ambas as bactérias). As amostras, com o tamanho médio de partículas menor apresentaram maior homogeneidade e melhor atividade antibacteriana, quando considerado o valor do zinco retido no produto. O segundo grupo de amostras foi preparado com nanopartículas de ZnO sintetizado (ZnO nano) imobilizadas em um complexo polieletrólito de quitosana e alginato com e sem tripolifosfato de sódio. Avaliou-se a liberação *in vitro* de Zn^{2+} e a atividade antimicrobiana. O complexo foi eficaz em proteger o ZnO em suco gástrico simulado. Comparado ao ZnO nanométrico sem proteção, o complexo liberou uma concentração cerca de seis vezes maior de Zn^{2+} , em suco entérico simulado. Os compostos apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra *E. coli* (2250 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO/CAT ou 229,5 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} retido e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO/CA ou 126 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} retido) e *S. aureus* (2000 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO/CAT ou 204 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} retido e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO/CA ou 126 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} retido). Diante dos resultados *in vitro*, os produtos formulados com ZnO nano e complexo polieletrólito à base de quitosana e alginato de sódio foram os mais adequados para a administração de ZnO em leitões recém-desmamados.

Palavras-chave: Quitosana, Alginato, Pectina, Óxido de Zinco, Liberação *in vitro*, Atividade antimicrobiana, Leitões recém-desmamados.

ABSTRACT

Zinc oxide (ZnO) is an antimicrobial important that is added to the diets of weanling piglets to combat the common diarrhea at this stage of creation. ZnO high doses have proven effective in the farms; however, much is lost with the waste of animals, contaminating the soil and groundwater. Since it is soluble in acidic pH, ZnO dissociates in the stomach and consequently, a smaller amount reaches the intestines of the animals. Alternatives to protect the ZnO in the gastric environment and allow the maximization of their release into the enteric have been researched. In this study, we evaluated the antibacterial activity and *in vitro* release of zinc (Zn^{2+}) compounds of the ZnO-based structured with different biopolymers. The samples obtained were characterized by diffraction techniques of X-ray (XRD), absorption spectroscopy in the infrared Fourier transform (FTIR), by scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis (TGA), spectroscopy atomic absorption (AA), particle size distribution and as the rheological properties. The first group of samples was obtained with commercial ZnO particles complexed with alginate, pectin and chitosan. The release of Zn^{2+} was investigated in simulated conditions of the gastrointestinal tract of piglets, and the results showed that products with ZnO structured with biopolymer dispersions differed from each other as the release of Zn^{2+} . The other part of this first group of samples was prepared with ZnO particles dispersed in water and coated with average molecular weight of chitosan, sonicated for 10 and 20 minutes. The antibacterial activity of microparticles of pure ZnO and ZnO/chitosan composite was evaluated for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results showed a minimum bactericide concentration (MBC) of less pure ZnO (500 $\mu\text{g/mL}$ to *E. coli* and 650 $\mu\text{g/mL}$ to *S. aureus*) compared to the microparticles of ZnO/chitosan for both bacteria (1000 $\mu\text{g/mL}$ to both bacteria). The samples, with the average particle size less had greater homogeneity and better antibacterial activity. The second group of samples was prepared with ZnO nanoparticles synthesized (nano ZnO) immobilized in a polyelectrolyte complex of chitosan and alginate with and without sodium tripolyphosphate. The *in vitro* release of Zn^{2+} and the antimicrobial activity was evaluated. The complex was effective in protecting the ZnO in simulated gastric fluid. Compared to the nano ZnO unprotected, the complex released a concentration, approximately, six times higher Zn^{2+} in simulated enteric fluid. The compounds showed excellent antimicrobial activity against *E. coli* (2250 $\mu\text{g/mL}$ of ZnO/CAT or 229.5 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} trapped and 1000 $\mu\text{g/mL}$ of ZnO/CA or 126 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} trapped) and *S. aureus* (2000 $\mu\text{g/mL}$ of ZnO/CAT or 204 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} trapped and 1000 $\mu\text{g/mL}$ of ZnO/CA or 126 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} trapped). According as *in vitro* results, products formulated with nano ZnO and complex polyelectrolyte based on chitosan and sodium alginate were the most appropriate for ZnO administration in weanling pigs.

Keywords: Chitosan, Alginate, Pectin, Zinc Oxide, In vitro release, Antimicrobial activity, Weanling pigs.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Espectrometria de absorção atômica

AOAC: Método oficial de análise

CA: Complexo quitosana e alginato

CAT: Complexo quitosana, alginato e TPP

CH: Quitosana

CH/ZnO: Complexo quitosana e ZnO comercial

CH-10/ZnO: Complexo quitosana e ZnO comercial, com quitosana submetida a 10 minutos de radiação ultrassônica

CH-20/ZnO: Complexo quitosana e ZnO comercial, com quitosana submetida a 20 minutos de radiação ultrassônica

FTIR: Espectrometria no infravermelho

LMP: pectina de alto teor em grupamentos metoxílicos

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MBC: Concentração mínima bactericida

PEC: Complexo Polieletrólito

SA: Alginato de sódio

SES: Suco entérico simulado

SGS: Suco gástrico simulado

TGA: Análise termogravimétrica

TPP: Tripolifosfato de sódio

XRD: Difração de raios-X

ZnO: Óxido de zinco comercial

ZnO/CA: Complexo quitosana e alginato com ZnO nano

ZnO/CAT: Complexo quitosana, alginato e TPP com ZnO nano

ZnO/CH: Complexo ZnO comercial com quitosana

ZnO/LMP: Complexo ZnO comercial com pectina

ZnO/SA: Complexo ZnO comercial com alginato

ZnO nano: ZnO sintetizado de dimensões nanométricas

ZnO-15: ZnO comercial puro homogeneizado em ultrassom por 15 minutos

Alg/ZnO: Complexo alginato e ZnO nano, sintetizados juntos

Alg/ZnO-15: Alg/ZnO homogeneizado por 15 minutos em ultrassom

Pec/ZnO: Complexo pectina e ZnO nano, sintetizados juntos

Pec/ZnO-15: Pec/ZnO homogeneizado por 15 minutos em ultrassom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da formação dos PECs.....	24
Figura 2: Estrutura química do alginato de sódio.....	25
Figura 3: Estrutura química das moléculas de quitina e quitosana.....	26
Figura 4: Fórmula química geral da cadeia polimérica da pectina.....	28
Figura 5: Difrátogramas obtidos para o ZnO comercial (I), e os produtos ZnO/SA (II), ZnO/CH (III) e ZnO/LMP (IV).....	35
Figura 6: Espectros de FTIR obtidos para o ZnO comercial (I), e para os produtos ZnO/CH (II), ZnO/LMP (III) e ZnO/SA (IV).....	35
Figura 7: Micrografias obtidas por SEM para o ZnO comercial (a), e para os produtos ZnO/SA (b), ZnO/CH (c), ZnO/LMP (d).....	36
Figura 8: Liberação de Zn^{2+} (mg/h) em cada um dos compartimentos do trato gastrointestinal <i>in vitro</i>	37
Figura 9: Difrátograma de raios-X na região de 2θ de $2,0^\circ$ a 80° para amostra de ZnO comercial.....	38
Figura 10: Variação dos módulos de armazenamento (G' , símbolo aberto) e de perda (G'' , símbolo fechado) em função da frequência oscilatória (a); e viscosidade de cisalhamento constante (η , símbolos fechados) e viscosidade complexa (η^* , símbolos abertos), como uma função da taxa de deformação e frequência (Cox Merz plot) (b), para as amostras CH/ZnO (triângulos) e CH-20/ZnO (círculos).....	39
Figura 11: Espectros de infravermelho obtidos para (a) ZnO (traço I) e CH (traço II); (b) CH/ZnO (traço I), CH-10/ZnO (traço II) e CH-20/ZnO (traço III).....	41
Figura 12: Micrografias obtidas para as micropartículas (a) CH/ZnO, (b) CH-10/ZnO e (c) CH-20/ZnO, com aumento de 5.000 vezes	41
Figura 13: Distribuição do tamanho de partículas das amostras CH/ZnO (linha pontilhada), CH-10/ZnO (linha tracejada) e CH-20/ZnO (linha contínua).....	42
Figura 14: Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDX) das amostras CH/ZnO (a), CH-10/ZnO (b) e CH-20/ZnO (c).....	43
Figura 15: Estrutura das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	44

Figura 16: Perfil de liberação <i>in vitro</i> do Zn ²⁺ , em porcentagem por tempo (min), no SGS (a) e no SES (b) para as amostras ZnO comercial (∇), CH/ZnO (○), CH-10/ZnO (Δ) e CH-20/ZnO (□).....	48
Figura 17: Ficha cristalográfica PDF 65-3411 (PCPDFWin, Version 2.4, JCODS-ICDD).....	56
Figura 18: Difratoogramas das amostras ZnO - Comercial (I), ZnO - Homogeneizado (II), AlgZnO (III), PecZnO (IV), AlgZnO - Homogeneizado (V), PecZnO - Homogeneizado (VI).....	56
Figura 19: Espectros de infravermelho obtidos para as amostras ZnO – Comercial (I), Alginato (II) e Alg/ZnO (III).....	56
Figura 20: Espectros de infravermelho obtidos para as amostras ZnO - Comercial (I), PecZnO (II) e Pectina (III).....	57
Figura 21: Micrografias obtidas para as amostras: a - ZnO – Comercial, b – PecZnO e c – AlgZnO, com aumento de 5.000 vezes.....	57
Figura 22: Difratoogramas das amostras ZnO nano (a), das soluções de alginato de sódio (Traço I, b) e de quitosana (Traço II, b) e dos compostos ZnO/CAT e ZnO/CA.....	59
Figura 23: Espectros no infravermelho obtidos para (a) SA (traço I) e CH (traço II); (b) ZnO nano (traço I), ZnO/CAT (traço II) e ZnO/CA (traço III).....	60
Figura 24: Variação dos módulos de armazenamento (G', símbolo fechado) e de perda (G'', símbolo aberto) em função da frequência oscilatória (a) para as amostras CAT (quadrados), CA (triângulos); (b) ZnO/CAT (círculos e ZnO/CA (triângulos).....	61
Figura 25: Micrografias obtidas para as amostras (a) ZnO nano, (b) ZnO/CAT e (c) ZnO/CA.....	62
Figura 26: Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) das amostras ZnO nano (a), ZnO/CAT (b) e ZnO/CA (c).....	63
Figura 27: Distribuição do tamanho de partículas das amostras ZnO/CA (linha pontilhada) e ZnO/CAT (linha contínua).....	64
Figura 28: Curvas de TG obtidas para as amostras ZnO/CAT (□) e ZnO/CA (Δ)	65
Figuras 29: Perfil de liberação <i>in vitro</i> do Zn ²⁺ , em porcentagem por tempo (min), no SGS (a) e no SES (b) para as amostras ZnO comercial (∇), ZnO nano (□), ZnO/CAT (Δ) e ZnO/CA (○).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diâmetros das micropartículas CH/ZnO, CH-10/ZnO e CH-20/ZnO.....	42
Tabela 2: Atividade antimicrobiana das amostras ZnO, CH/ZnO, CH-10/ZnO e CH-20/ZnO contra <i>Escherichia coli</i>	45
Tabela 3: Atividade antimicrobiana das amostras ZnO, CH/ZnO, CH10/ZnO e CH20/ZnO contra <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Tabela 4: Atividade antimicrobiana das amostras CH-0, CH-10 e CH-20 contra <i>Escherichia coli</i> (%).....	47
Tabela 5: Atividade antimicrobiana das amostras CH-0, CH-10 e CH-20 contra <i>Staphylococcus aureus</i> (%).....	47
Tabela 6: Resumo das amostras sintetizadas.....	51
Tabela 7: Diâmetro médio dos cristalitos das amostras sintetizadas.....	57
Tabela 8: Diâmetros das micropartículas das amostras ZnO/CAT e ZnO/CA.....	64
Tabela 9: Atividade antimicrobiana das amostras ZnO comercial, ZnO nano, ZnO/CAT e ZnO/CA contra <i>Escherichia coli</i>	67
Tabela 10: Atividade antimicrobiana das amostras ZnO comercial, ZnO nano, ZnO/CAT e ZnO/CA contra <i>Staphylococcus aureus</i>	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	ÓXIDO DE ZINCO (ZnO).....	20
3.1.1	ZnO na alimentação de leitões recém desmamados	20
3.1.2	Problemas associados ao uso de ZnO como promotor de crescimento	21
3.1.3	ZnO Nano e Microestruturado	21
3.2	BIOPOLÍMEROS	23
3.2.1	Polieletrólitos e Complexos Polieletrólitos (PEC)	23
3.2.2	Alginato	24
3.2.3	Quitosana	25
3.2.4	Pectina	27
4	AMOSTRAS OBTIDAS PELA UTILIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ZNO COMERCIAL COMPLEXADAS COM BIOPOLÍMEROS	29
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1.1	Reagentes e solventes	29
4.1.2	Equipamentos	29
4.1.3	Preparação das micropartículas de ZnO comercial com diferentes biopolímeros	29
4.1.4	Preparação das micropartículas de ZnO comercial com quitosana submetida a diferentes tempos de radiação ultrassônica	30
4.1.4.1	Preparação da solução de quitosana.....	30
4.1.4.2	Preparação das micropartículas de ZnO com quitosana.....	30
4.1.4.3	Preparação dos sucos gástrico (SGS) e entérico simulados (SES) (USP35-NF30).....	31
4.1.5	Caracterizações físico-químicas e morfológicas das amostras obtidas com ZnO comercial	31
4.1.5.1	Difração de raios-X (XRD).....	31
4.1.5.2	Caracterização reológica.....	31
4.1.5.3	Espectrometria no infravermelho (FTIR).....	31
4.1.5.4	Espectrometria de absorção atômica (AA).....	32

4.1.5.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
4.1.5.6	Distribuição de tamanho de partícula.....	32
4.1.6	Caracterizações biológicas das amostras obtidas com ZnO comercial.....	32
4.1.6.1	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> e determinação da concentração mínima bactericida (MBC) das micropartículas ZnO, CH/ZnO, CH-10/ZnO e CH-20/ZnO.....	32
4.1.6.2	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do Zn ²⁺ retido nas amostras ZnO/CH, ZnO/LMP e ZnO/SA.....	33
4.1.6.3	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do Zn ²⁺ retido nas amostras ZnO, CH/ZnO, CH-10/ZnO e CH-20/ZnO.....	33
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.2.1	Considerações.....	37
4.2.2	Nova formulação.....	37
4.3	Conclusão.....	49
5	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZNO COMPLEXADAS COM BIOPOLÍMEROS.....	50
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
5.1.1	Reagentes e solventes.....	50
5.1.2	Equipamentos.....	50
5.1.3	Preparação e caracterização das nanopartículas de ZnO sintetizadas com alginato e pectina.....	50
5.1.3.1	Síntese das nanopartículas de ZnO em presença de alginato de sódio.....	51
5.1.3.2	Síntese das nanopartículas de ZnO em presença de pectina.....	51
5.1.3.3	Radiação ultrassônica do ZnO comercial.....	51
5.1.4	Preparação, síntese e caracterização das nanopartículas de ZnO complexadas com CH/SA com e sem TPP.....	52
5.1.4.1	Preparação das soluções de CH, SA e TPP.....	52
5.1.4.2	Síntese das nanopartículas de ZnO.....	52
5.1.4.3	Preparação das micropartículas de ZnO com CH e SA.....	52
5.1.5	Caracterização físico-química e morfológica-dos produtos.....	52
5.1.5.1	Difração de raios-X (XRD).....	52
5.1.5.2	Caracterização reológica.....	53
5.1.5.3	Espectrometria no infravermelho (FTIR).....	53
5.1.5.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	53

5.1.5.5	Espectrometria de absorção atômica (AA).....	53
5.1.5.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
5.1.5.7	Determinação da distribuição do tamanho das partículas.....	53
5.1.6.	Caracterização biológica das amostras ZnO nano, ZnO/CA e ZnO/CAT.....	54
5.1.6.1.	Preparação do suco gástrico (SGS) e entérico simulados (SES) (USP35-NF30).....	54
5.1.6.2	Preparação do teste de liberação <i>in vitro</i>	54
5.1.6.3	Atividade antibacteriana dos novos produtos.....	54
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.3.	CONSIDERAÇÕES.....	58
5.4	NOVA FORMULAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE ZnO.....	59
5.5	CONCLUSÃO.....	70
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	70
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
8.	REFERÊNCIAS.....	72
9.	ANEXO I.....	84



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

MARINA SÍGOLO RODRIGUES BARRETO

**ÓXIDO DE ZINCO ESTRUTURADO EM BIOPOLÍMEROS:
CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
LIBERAÇÃO *IN VITRO* EM MODELO SUÍNO**

Rio de Janeiro

2016

Marina Sígolo Rodrigues Barreto

**ÓXIDO DE ZINCO ESTRUTURADO EM BIOPOLÍMEROS: CARACTERIZAÇÃO,
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E LIBERAÇÃO *IN VITRO* EM MODELO SUÍNO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Cristina Tristão de Andrade
Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila

Rio de Janeiro

2016

B273

Barreto, Marina Sígolo Rodrigues.

Óxido de zinco estruturado em biopolímeros: caracterização, atividade antimicrobiana e liberação *in vitro* em modelo suíno/ Marina Sígolo Rodrigues Barreto – Rio de Janeiro: IQ/ UFRJ, 2016.

84f.; il

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Rio de Janeiro, 2015.

Orientadores: Cristina Tristão de Andrade e Eduardo Mere Del Aguila.

1. Quitosana. 2. Alginato. 3. Pectina. 3. Óxido de Zinco. 4. Liberação *in vitro*. 5. Atividade antimicrobiana. 6. Leitões recém-desmamados. I. Andrade, Cristina Tristão de . (Orient.). II. Aguila, Eduardo Mere Del. (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IIV Título..

CDD: 664.001

MARINA SÍGOLO RODRIGUES BARRETO

**ÓXIDO DE ZINCO ESTRUTURADO EM BIOPOLÍMEROS: CARACTERIZAÇÃO,
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E LIBERAÇÃO *IN VITRO* EM MODELO SUÍNO**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 29 de abril de 2016.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Cristina Tristão de Andrade – IMA/UFRJ
(Orientadora)

Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila-IQ/UFRJ
(Coorientador)

Prof.^a Dr.^a Daniela Sales Alviano – CCS/UFRJ

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Junior - UFF

Prof.^a Dr.^a Leila Léa Yuan Visconte – IMA/UFRJ

Prof. Dr. Edwin Gonzalo Azero Rojas - UNIRIO

DEDICATÓRIA

Ao meu Samuel pelo seu amor sincero e por ensinar-me o que é mais valioso na vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais uma conquista.

Ao meu marido, Carlos Vinícius, pelo companheirismo, incentivo e, principalmente, por ser um exemplo de pessoa dedicada e esforçada.

Aos meus pais, Rita e Renato, sempre tão amorosos e encorajadores. Obrigada por toda ajuda durante esses quatro anos e principalmente por acreditarem sempre em mim!

À minha sogra, Maria Terezinha, pelo apoio, pela torcida e disposição em me ajudar ao longo dessa jornada.

À professora Dra. Cristina Tristão de Andrade pela orientação e, principalmente, pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Dr. Eduardo M. Del Aguila, pela coorientação, pelos ensinamentos, apoio e disponibilidade.

À professora Vânia M. Flosi Paschoalin por disponibilizar seu laboratório, pelos ensinamentos e ajuda para o desenvolvimento desta tese.

Ao professor Lúcio Mendes Cabral por disponibilizar o Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica (LabTIF) e ao professor Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva por toda ajuda e ensinamentos para a secagem em Spray dryer e condução dos ensaios de liberação *in vitro*.

Ao professor Edwin G. Azero Rojas por dispor de seu tempo e conhecimento para realização das análises reológicas.

Ao Instituto de Macromoléculas – IMA, da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelas análises realizadas em seus laboratórios e aos profissionais sempre dispostos a ajudar.

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

Aos amigos do LAHBIO/IMA, Willian Hermógenes, Júlia Freitas, Adriana Marques, Juliana Gomes, Vinícius Viana, Rodrigo Gouvêa e Pamela F. de Moura Pereira pela amizade, apoio, ensinamentos e momentos agradáveis de descontração.

Aos colegas do LAABBM/IQ, Cintya Freitas e Patrícia Pereira por toda ajuda, e principalmente ao Laidson Paes, sempre disposto a compartilhar seus conhecimentos. Como não agradecer ao Rafael Luiz por estar sempre disposto a ajudar, pelo seu bom-humor e cafezinhos de cada dia.

Ao Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, principalmente ao profissional Alexandre Gaspar pelas muitas análises de espectroscopia por absorção atômica realizadas.

À empresa Auster Nutrição Animal, pela ajuda na aquisição do ZnO comercial, alginato de sódio e enzimas.

RESUMO

BARRETO, Marina Sígolo Rodrigues. Óxido de zinco estruturado em biopolímeros: Caracterização, atividade antimicrobiana e liberação *in vitro* em modelo suíno. Rio de Janeiro, 2016. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O óxido de zinco (ZnO) é um importante antimicrobiano que é adicionado às dietas de leitões recém-desmamados a fim de combater a diarreia comum a esta fase de criação. Doses elevadas de ZnO têm-se mostrado efetivas no campo; porém, grande parte é perdida com os dejetos dos animais, contaminando os solos e o lençóis freáticos. Por ser solúvel em pH ácido, o ZnO se dissocia no estômago e, conseqüentemente, uma quantidade menor atinge o intestino dos animais. Alternativas que protejam o ZnO no meio gástrico e permitam a maximização da sua liberação no meio entérico têm sido pesquisadas. Neste estudo, avaliou-se a liberação *in vitro* do zinco (Zn^{2+}) de compostos à base de ZnO estruturado com diferentes biopolímeros e a sua atividade antibacteriana. As amostras obtidas foram caracterizadas pelas técnicas de difração de raios-X (XRD), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), por microscopia eletrônica de varredura (SEM), por análise térmica (TGA), espectroscopia de absorção atômica (AA), distribuição do tamanho de partícula e quanto às propriedades reológicas.

O primeiro grupo de amostras foi obtido com partículas de ZnO comercial complexadas com alginato, pectina e quitosana. Foi investigada a liberação do Zn^{2+} em condições simuladas do trato gastrointestinal de leitões e os resultados mostraram que os produtos com ZnO estruturado em dispersões de biopolímeros diferenciaram-se entre si quanto à liberação de Zn^{2+} . A outra parte das amostras deste primeiro grupo foi preparada com partículas de ZnO dispersas em água e revestidas com quitosana de massa molar média, sonicadas por 10 e 20 minutos. A atividade antibacteriana das micropartículas de ZnO puro e dos compostos ZnO/quitosana foi avaliada para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram uma concentração mínima bactericida (MBC) menor para ZnO puro (500 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e 650 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*) em relação às micropartículas de ZnO/quitosana (1000 $\mu\text{g/mL}$, para ambas as bactérias). As amostras, com o tamanho médio de partículas menor apresentaram maior homogeneidade e melhor atividade antibacteriana, quando considerado o valor do zinco retido no produto. O segundo grupo de amostras foi preparado com nanopartículas de ZnO sintetizado (ZnO nano) imobilizadas em um complexo polieletrólito de quitosana e alginato com e sem tripolifosfato de sódio. Avaliou-se a liberação *in vitro* de Zn^{2+} e a atividade antimicrobiana. O complexo foi eficaz em proteger o ZnO em suco gástrico simulado. Comparado ao ZnO nanométrico sem proteção, o complexo liberou uma concentração cerca de seis vezes maior de Zn^{2+} , em suco entérico simulado. Os compostos apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra *E. coli* (2250 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO/CAT ou 229,5 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} retido e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO/CA ou 126 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} retido) e *S. aureus* (2000 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO/CAT ou 204 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} retido e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO/CA ou 126 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} retido). Diante dos resultados *in vitro*, os produtos formulados com ZnO nano e complexo polieletrólito à base de quitosana e alginato de sódio foram os mais adequados para a administração de ZnO em leitões recém-desmamados.

Palavras-chave: Quitosana, Alginato, Pectina, Óxido de Zinco, Liberação *in vitro*, Atividade antimicrobiana, Leitões recém-desmamados.

ABSTRACT

Zinc oxide (ZnO) is an antimicrobial important that is added to the diets of weanling piglets to combat the common diarrhea at this stage of creation. ZnO high doses have proven effective in the farms; however, much is lost with the waste of animals, contaminating the soil and groundwater. Since it is soluble in acidic pH, ZnO dissociates in the stomach and consequently, a smaller amount reaches the intestines of the animals. Alternatives to protect the ZnO in the gastric environment and allow the maximization of their release into the enteric have been researched. In this study, we evaluated the antibacterial activity and *in vitro* release of zinc (Zn^{2+}) compounds of the ZnO-based structured with different biopolymers. The samples obtained were characterized by diffraction techniques of X-ray (XRD), absorption spectroscopy in the infrared Fourier transform (FTIR), by scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis (TGA), spectroscopy atomic absorption (AA), particle size distribution and as the rheological properties. The first group of samples was obtained with commercial ZnO particles complexed with alginate, pectin and chitosan. The release of Zn^{2+} was investigated in simulated conditions of the gastrointestinal tract of piglets, and the results showed that products with ZnO structured with biopolymer dispersions differed from each other as the release of Zn^{2+} . The other part of this first group of samples was prepared with ZnO particles dispersed in water and coated with average molecular weight of chitosan, sonicated for 10 and 20 minutes. The antibacterial activity of microparticles of pure ZnO and ZnO/chitosan composite was evaluated for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results showed a minimum bactericide concentration (MBC) of less pure ZnO (500 $\mu\text{g/mL}$ to *E. coli* and 650 $\mu\text{g/mL}$ to *S. aureus*) compared to the microparticles of ZnO/chitosan for both bacteria (1000 $\mu\text{g/mL}$ to both bacteria). The samples, with the average particle size less had greater homogeneity and better antibacterial activity. The second group of samples was prepared with ZnO nanoparticles synthesized (nano ZnO) immobilized in a polyelectrolyte complex of chitosan and alginate with and without sodium tripolyphosphate. The *in vitro* release of Zn^{2+} and the antimicrobial activity was evaluated. The complex was effective in protecting the ZnO in simulated gastric fluid. Compared to the nano ZnO unprotected, the complex released a concentration, approximately, six times higher Zn^{2+} in simulated enteric fluid. The compounds showed excellent antimicrobial activity against *E. coli* (2250 $\mu\text{g/mL}$ of ZnO/CAT or 229.5 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} trapped and 1000 $\mu\text{g/mL}$ of ZnO/CA or 126 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} trapped) and *S. aureus* (2000 $\mu\text{g/mL}$ of ZnO/CAT or 204 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} trapped and 1000 $\mu\text{g/mL}$ of ZnO/CA or 126 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} trapped). According as *in vitro* results, products formulated with nano ZnO and complex polyelectrolyte based on chitosan and sodium alginate were the most appropriate for ZnO administration in weanling pigs.

Keywords: Chitosan, Alginate, Pectin, Zinc Oxide, In vitro release, Antimicrobial activity, Weanling pigs.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Espectrometria de absorção atômica

AOAC: Método oficial de análise

CA: Complexo quitosana e alginato

CAT: Complexo quitosana, alginato e TPP

CH: Quitosana

CH/ZnO: Complexo quitosana e ZnO comercial

CH-10/ZnO: Complexo quitosana e ZnO comercial, com quitosana submetida a 10 minutos de radiação ultrassônica

CH-20/ZnO: Complexo quitosana e ZnO comercial, com quitosana submetida a 20 minutos de radiação ultrassônica

FTIR: Espectrometria no infravermelho

LMP: pectina de alto teor em grupamentos metoxílicos

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MBC: Concentração mínima bactericida

PEC: Complexo Polieletrólito

SA: Alginato de sódio

SES: Suco entérico simulado

SGS: Suco gástrico simulado

TGA: Análise termogravimétrica

TPP: Tripolifosfato de sódio

XRD: Difração de raios-X

ZnO: Óxido de zinco comercial

ZnO/CA: Complexo quitosana e alginato com ZnO nano

ZnO/CAT: Complexo quitosana, alginato e TPP com ZnO nano

ZnO/CH: Complexo ZnO comercial com quitosana

ZnO/LMP: Complexo ZnO comercial com pectina

ZnO/SA: Complexo ZnO comercial com alginato

ZnO nano: ZnO sintetizado de dimensões nanométricas

ZnO-15: ZnO comercial puro homogeneizado em ultrassom por 15 minutos

Alg/ZnO: Complexo alginato e ZnO nano, sintetizados juntos

Alg/ZnO-15: Alg/ZnO homogeneizado por 15 minutos em ultrassom

Pec/ZnO: Complexo pectina e ZnO nano, sintetizados juntos

Pec/ZnO-15: Pec/ZnO homogeneizado por 15 minutos em ultrassom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da formação dos PECs.....	24
Figura 2: Estrutura química do alginato de sódio.....	25
Figura 3: Estrutura química das moléculas de quitina e quitosana.....	26
Figura 4: Fórmula química geral da cadeia polimérica da pectina.....	28
Figura 5: Difrátogramas obtidos para o ZnO comercial (I), e os produtos ZnO/SA (II), ZnO/CH (III) e ZnO/LMP (IV).....	35
Figura 6: Espectros de FTIR obtidos para o ZnO comercial (I), e para os produtos ZnO/CH (II), ZnO/LMP (III) e ZnO/SA (IV).....	35
Figura 7: Micrografias obtidas por SEM para o ZnO comercial (a), e para os produtos ZnO/SA (b), ZnO/CH (c), ZnO/LMP (d).....	36
Figura 8: Liberação de Zn^{2+} (mg/h) em cada um dos compartimentos do trato gastrointestinal <i>in vitro</i>	37
Figura 9: Difrátograma de raios-X na região de 2θ de $2,0^\circ$ a 80° para amostra de ZnO comercial.....	38
Figura 10: Variação dos módulos de armazenamento (G' , símbolo aberto) e de perda (G'' , símbolo fechado) em função da frequência oscilatória (a); e viscosidade de cisalhamento constante (η , símbolos fechados) e viscosidade complexa (η^* , símbolos abertos), como uma função da taxa de deformação e frequência (Cox Merz plot) (b), para as amostras CH/ZnO (triângulos) e CH-20/ZnO (círculos).....	39
Figura 11: Espectros de infravermelho obtidos para (a) ZnO (traço I) e CH (traço II); (b) CH/ZnO (traço I), CH-10/ZnO (traço II) e CH-20/ZnO (traço III).....	41
Figura 12: Micrografias obtidas para as micropartículas (a) CH/ZnO, (b) CH-10/ZnO e (c) CH-20/ZnO, com aumento de 5.000 vezes	41
Figura 13: Distribuição do tamanho de partículas das amostras CH/ZnO (linha pontilhada), CH-10/ZnO (linha tracejada) e CH-20/ZnO (linha contínua).....	42
Figura 14: Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDX) das amostras CH/ZnO (a), CH-10/ZnO (b) e CH-20/ZnO (c).....	43
Figura 15: Estrutura das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	44

Figura 16: Perfil de liberação <i>in vitro</i> do Zn ²⁺ , em porcentagem por tempo (min), no SGS (a) e no SES (b) para as amostras ZnO comercial (∇), CH/ZnO (○), CH-10/ZnO (Δ) e CH-20/ZnO (□).....	48
Figura 17: Ficha cristalográfica PDF 65-3411 (PCPDFWin, Version 2.4, JCODS-ICDD).....	56
Figura 18: Difratogramas das amostras ZnO - Comercial (I), ZnO - Homogeneizado (II), AlgZnO (III), PecZnO (IV), AlgZnO - Homogeneizado (V), PecZnO - Homogeneizado (VI).....	56
Figura 19: Espectros de infravermelho obtidos para as amostras ZnO – Comercial (I), Alginato (II) e Alg/ZnO (III).....	56
Figura 20: Espectros de infravermelho obtidos para as amostras ZnO - Comercial (I), PecZnO (II) e Pectina (III).....	57
Figura 21: Micrografias obtidas para as amostras: a - ZnO – Comercial, b – PecZnO e c – AlgZnO, com aumento de 5.000 vezes.....	57
Figura 22: Difratogramas das amostras ZnO nano (a), das soluções de alginato de sódio (Traço I, b) e de quitosana (Traço II, b) e dos compostos ZnO/CAT e ZnO/CA.....	59
Figura 23: Espectros no infravermelho obtidos para (a) SA (traço I) e CH (traço II); (b) ZnO nano (traço I), ZnO/CAT (traço II) e ZnO/CA (traço III).....	60
Figura 24: Variação dos módulos de armazenamento (G', símbolo fechado) e de perda (G'', símbolo aberto) em função da frequência oscilatória (a) para as amostras CAT (quadrados), CA (triângulos); (b) ZnO/CAT (círculos e ZnO/CA (triângulos).....	61
Figura 25: Micrografias obtidas para as amostras (a) ZnO nano, (b) ZnO/CAT e (c) ZnO/CA.....	62
Figura 26: Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) das amostras ZnO nano (a), ZnO/CAT (b) e ZnO/CA (c).....	63
Figura 27: Distribuição do tamanho de partículas das amostras ZnO/CA (linha pontilhada) e ZnO/CAT (linha contínua).....	64
Figura 28: Curvas de TG obtidas para as amostras ZnO/CAT (□) e ZnO/CA (Δ)	65
Figuras 29: Perfil de liberação <i>in vitro</i> do Zn ²⁺ , em porcentagem por tempo (min), no SGS (a) e no SES (b) para as amostras ZnO comercial (∇), ZnO nano (□), ZnO/CAT (Δ) e ZnO/CA (○).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diâmetros das micropartículas CH/ZnO, CH-10/ZnO e CH-20/ZnO.....	42
Tabela 2: Atividade antimicrobiana das amostras ZnO, CH/ZnO, CH-10/ZnO e CH-20/ZnO contra <i>Escherichia coli</i>	45
Tabela 3: Atividade antimicrobiana das amostras ZnO, CH/ZnO, CH10/ZnO e CH20/ZnO contra <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Tabela 4: Atividade antimicrobiana das amostras CH-0, CH-10 e CH-20 contra <i>Escherichia coli</i> (%).....	47
Tabela 5: Atividade antimicrobiana das amostras CH-0, CH-10 e CH-20 contra <i>Staphylococcus aureus</i> (%).....	47
Tabela 6: Resumo das amostras sintetizadas.....	51
Tabela 7: Diâmetro médio dos cristalitos das amostras sintetizadas.....	57
Tabela 8: Diâmetros das micropartículas das amostras ZnO/CAT e ZnO/CA.....	64
Tabela 9: Atividade antimicrobiana das amostras ZnO comercial, ZnO nano, ZnO/CAT e ZnO/CA contra <i>Escherichia coli</i>	67
Tabela 10: Atividade antimicrobiana das amostras ZnO comercial, ZnO nano, ZnO/CAT e ZnO/CA contra <i>Staphylococcus aureus</i>	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	ÓXIDO DE ZINCO (ZnO).....	20
3.1.1	ZnO na alimentação de leitões recém desmamados	20
3.1.2	Problemas associados ao uso de ZnO como promotor de crescimento	21
3.1.3	ZnO Nano e Microestruturado	21
3.2	BIOPOLÍMEROS	23
3.2.1	Polieletrólitos e Complexos Polieletrólitos (PEC)	23
3.2.2	Alginato	24
3.2.3	Quitosana	25
3.2.4	Pectina	27
4	AMOSTRAS OBTIDAS PELA UTILIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ZNO COMERCIAL COMPLEXADAS COM BIOPOLÍMEROS	29
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1.1	Reagentes e solventes	29
4.1.2	Equipamentos	29
4.1.3	Preparação das micropartículas de ZnO comercial com diferentes biopolímeros	29
4.1.4	Preparação das micropartículas de ZnO comercial com quitosana submetida a diferentes tempos de radiação ultrassônica	30
4.1.4.1	Preparação da solução de quitosana.....	30
4.1.4.2	Preparação das micropartículas de ZnO com quitosana.....	30
4.1.4.3	Preparação dos sucos gástrico (SGS) e entérico simulados (SES) (USP35-NF30).....	31
4.1.5	Caracterizações físico-químicas e morfológicas das amostras obtidas com ZnO comercial	31
4.1.5.1	Difração de raios-X (XRD).....	31
4.1.5.2	Caracterização reológica.....	31
4.1.5.3	Espectrometria no infravermelho (FTIR).....	31
4.1.5.4	Espectrometria de absorção atômica (AA).....	32

4.1.5.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
4.1.5.6	Distribuição de tamanho de partícula.....	32
4.1.6	Caracterizações biológicas das amostras obtidas com ZnO comercial.....	32
4.1.6.1	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> e determinação da concentração mínima bactericida (MBC) das micropartículas ZnO, CH/ZnO, CH-10/ZnO e CH-20/ZnO.....	32
4.1.6.2	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do Zn ²⁺ retido nas amostras ZnO/CH, ZnO/LMP e ZnO/SA.....	33
4.1.6.3	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do Zn ²⁺ retido nas amostras ZnO, CH/ZnO, CH-10/ZnO e CH-20/ZnO.....	33
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.2.1	Considerações.....	37
4.2.2	Nova formulação.....	37
4.3	Conclusão.....	49
5	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZNO COMPLEXADAS COM BIOPOLÍMEROS.....	50
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
5.1.1	Reagentes e solventes.....	50
5.1.2	Equipamentos.....	50
5.1.3	Preparação e caracterização das nanopartículas de ZnO sintetizadas com alginato e pectina.....	50
5.1.3.1	Síntese das nanopartículas de ZnO em presença de alginato de sódio.....	51
5.1.3.2	Síntese das nanopartículas de ZnO em presença de pectina.....	51
5.1.3.3	Radiação ultrassônica do ZnO comercial.....	51
5.1.4	Preparação, síntese e caracterização das nanopartículas de ZnO complexadas com CH/SA com e sem TPP.....	52
5.1.4.1	Preparação das soluções de CH, SA e TPP.....	52
5.1.4.2	Síntese das nanopartículas de ZnO.....	52
5.1.4.3	Preparação das micropartículas de ZnO com CH e SA.....	52
5.1.5	Caracterização físico-química e morfológica-dos produtos.....	52
5.1.5.1	Difração de raios-X (XRD).....	52
5.1.5.2	Caracterização reológica.....	53
5.1.5.3	Espectrometria no infravermelho (FTIR).....	53
5.1.5.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	53

5.1.5.5	Espectrometria de absorção atômica (AA).....	53
5.1.5.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
5.1.5.7	Determinação da distribuição do tamanho das partículas.....	53
5.1.6.	Caracterização biológica das amostras ZnO nano, ZnO/CA e ZnO/CAT.....	54
5.1.6.1.	Preparação do suco gástrico (SGS) e entérico simulados (SES) (USP35-NF30).....	54
5.1.6.2	Preparação do teste de liberação <i>in vitro</i>	54
5.1.6.3	Atividade antibacteriana dos novos produtos.....	54
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.3.	CONSIDERAÇÕES.....	58
5.4	NOVA FORMULAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE ZnO.....	59
5.5	CONCLUSÃO.....	70
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	70
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
8.	REFERÊNCIAS.....	72
9.	ANEXO I.....	84