

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

**Utilização de zinco, na forma de óxido de zinco nanoparticulado, em dietas  
para leitões recém-desmamados**

**Natália Cristina Milani**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência  
Animal e Pastagens

**Piracicaba  
2016**

**Natália Cristina Milani**  
**Zootecnista**

**Utilização de zinco, na forma de óxido de zinco nanoparticulado, em dietas para leitões recém-desmamados**

Orientador:  
Prof. Dr. **VALDOMIRO SHIGUERU MIYADA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência  
Animal e Pastagens

**Piracicaba**  
**2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Milani, Natália Cristina

Utilização de zinco, na forma de óxido de zinco nanoparticulado, em dietas para leitões recém-desmamados / Natália Cristina Milani. - - Piracicaba, 2016.  
105 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Desempenho 2. Digestibilidade 3. Epitélio intestinal 4. Excreção de zinco I. Título

CDD 636.4085  
M637u

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

## DEDICATÓRIA

### *A Deus*

Por trazer a paz e calma nos momentos difíceis da vida. Por Se mostrar presente através de gestos e acontecimentos que momentaneamente se passam despercebidos. Por trazer tudo que é certo na hora certa.

### *À minha mãe*

#### *Lirane Salete Coradi*

Por viver cada momento da minha vida comigo, rir e chorar comigo. Por batalhar por cada conquista minha. Pelo incentivo, confiança, cobrança e alento. Por não medir esforços para que eu alcance todas as vitórias. Por estar de braços abertos esperando a minha volta seja no sucesso ou no fracasso. Te amo!

### *Ao meu pai*

#### *Celso José Milani*

Por me ensinar a ser forte e não desistir nas turbulências e apoiar minhas decisões. Pelo suporte, paciência e dedicação despendidos. Pelas demonstrações de afeto e orgulho. Te amo!

### *Ao meu irmão*

#### *Murilo Henrique Milani*

Por ser o meu orgulho. Por todas as conversas de apoio, todas as preocupações, todos os esforços pra me ver bem. Te amo!



## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Prof. Dr. Valdomiro Shigueru Miyada, pela orientação acadêmica e ensinamentos despendidos durante a realização do mestrado e pela amizade do dia a dia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio à Pesquisa concedido ao Prof. Dr. Valdomiro Shigueru Miyada (Processo FAPESP 2015/05943-6).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos de mestrado concedida.

Ao Prof. Dr. José Fernando Machado Menten, pela atenção, pelos ensinamentos, conselhos e pelo apoio concedido durante o mestrado.

Ao Dr. Maicon Sbardella, pela amizade, pelo entusiasmo, pelo apoio concedido, pela imensa paciência, e pelo rigor e critério científico. Você faz parte desta conquista.

Aos funcionários do Setor de Suinocultura (ESALQ), Gilberto Antonio Aliberti Júnior “Giba” e Leonilço Ramos “Léo”, pelo auxílio na condução do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia (ESALQ), José Kossut Knapik, Paulo Marcos de Oliveira e Alexandre Sebastião Soares, pela ajuda nas pesagens e nos abates do experimento. Aos funcionários Antônio Carlos Oliva, Gilberto da Silva Duarte e José Augusto Alves, pelo auxílio na confecção das dietas; José Henrique Rocha, pela disposição e prontidão. Às funcionárias Sandra Vicente Augusto, Silvia Adriana Tibério e Odete de Jesus Ribeiro Santos pelo profissionalismo e pela amizade de todos os dias.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal (ESALQ), Maria Antonia Ladalardo Etchegay e Daniel Messias Ribeiro, por disponibilizar o laboratório para preparo das soluções utilizadas nas análises do experimento e pelo auxílio despendido.

À Professora Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, por disponibilizar as dependências do Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ) para a condução das análises microbiológicas do experimento e por todas as indicações e auxílios científicos concedidos durante a realização das análises.

Ao técnico do Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ), José Antônio da Silva - “Zezo”, pelo auxílio na realização das análises microbiológicas.

À equipe do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal (ESALQ), sob coordenação do Prof. Dr. Raul Machado Neto, por disponibilizar os equipamentos do laboratório para a realização da leitura das lâminas histológicas. À pesquisadora Dra. Débora Botéquio Moretti, pela disposição e auxílio na utilização dos equipamentos para leitura das lâminas, por todas as sugestões e interesse demonstrado.

À aluna de graduação em Engenharia Agrônoma da ESALQ, Caroline Batista dos Santos, pela disposição e auxílio na condução do experimento.

Ao Prof. Dr. Hudson Wallace Pereira de Carvalho e à acadêmica de doutorado Susilaine Maira Savassa do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), pelas indicações de análises e laboratórios e auxílio na interpretação científica dos dados levantados sobre o óxido de zinco nanoparticulado.

À Dra. Elaine Cristina Paris, pesquisadora da Embrapa Instrumentação – São Carlos, e ao acadêmico Bruno Mascarenhas, mestrando em Físico-Química da Universidade Federal de São Carlos, pela realização das análises físico-químicas no óxido de zinco nanoparticulado e auxílio na interpretação e discussão dos resultados obtidos.

À equipe do Laboratório de Bromatologia e Minerais, Instituto de Zootecnia – IZ, Nova Odessa – SP, especialmente à Dra. Rosana Aparecida Possenti e Patrícia Brás, pela atenção e realização das análises bromatológicas.

À equipe do Laboratório Multiusuário em Produção Vegetal (ESALQ), especialmente ao Dr. Tiago Tezotto, pela disposição e realização das análises de zinco e cromo.

Ao laboratório HISTOTECH Lâminas Didáticas, aos funcionários Cláudio Arroyo e Margareth T. Arroyo, pela confecção das lâminas histológicas.

À empresa DSM por contribuir com as misturas minerais e vitamínicas utilizadas na confecção das dietas.

À empresa APC do Brasil por contribuir com o plasma sanguíneo utilizados na confecção das dietas.

À amiga e colega Natália Yumi Ikeda, pelo auxílio intelectual e prático em todas as etapas do mestrado. Pelas conversas e conselhos. Pela sinceridade, motivação, conforto e paciência. Por dividir comigo as experiências vivenciadas nestes anos de mestrado, por abrir meus olhos para uma realidade que às vezes não queremos enxergar e também por me fazer acreditar que tudo dá certo no final.

Às amigas Rita de Cássia Alves de Freitas e Helen Krystine da Silva pelo apoio e incentivo motivacional. Mesmo às vezes distantes, sinto vocês aqui me apoiando nas dificuldades e comemorando comigo as vitórias alcançadas.

Aos colegas do Departamento de Zootecnia, Setor Não Ruminantes (ESALQ), Diana, Glaucia, José Guilherme, Kelen, Naiara, Rafaela e Ramon, pela amizade de todos os dias e pela disposição e auxílio na condução do experimento.

Aos amigos e colegas da ESALQ, da UDESC, de Piracicaba e de Chapecó, pelo apoio nos momentos de angústia e comemoração nos momentos de felicidade.

À minha prima Alessandra Arno, acadêmica de Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina, pelo auxílio na condução dos experimentos e análises realizadas. Pelo apoio motivacional e confiança. Por acreditar no meu potencial e crescer junto comigo.

Aos meus familiares, pela ajuda e suporte e pelos votos de sucesso e mensagens de apoio despendidas ao longo do mestrado.





## BIOGRAFIA

NATÁLIA CRISTINA MILANI, filha de Lirane Salete Coradi e Celso José Milani, nasceu em Chapecó – SC, em 21 de junho de 1991.

Cursou ensino fundamental e médio na Escola de Educação Básica Professora Zélia Scharf em Chapecó – SC.

Em fevereiro de 2009, ingressou no curso de graduação em Zootecnia – Ênfase em Produção Animal Sustentável na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Centro de Educação Superior do Oeste (CEO) em Chapecó – SC.

Durante a graduação participou de atividades nos campos de ensino, pesquisa e extensão, sendo bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET) do Ministério de Educação (MEC) de dezembro de 2010 a julho de 2012. Ainda durante a graduação, de setembro de 2012 a junho de 2013, participou do Programa Ciências sem Fronteiras, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) realizando graduação sanduíche no curso de Engenharia Zootécnica na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro em Vila Real, Portugal.

Em julho de 2014, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em “Ciência Animal e Pastagens” da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), sendo bolsista do CNPq.



## **EPÍGRAFE**

“Deus transforma choro em sorriso, dor em força, fraqueza em fé, sonho em realidade.”

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)



## SUMÁRIO

RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	17
LISTA DE TABELAS .....	19
LISTA DE FIGURAS .....	21
1 INTRODUÇÃO .....	23
2 HIPÓTESE.....	25
3 OBJETIVO .....	27
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	29
4.1 Particularidades da fase pós-desmame dos leitões .....	29
4.2 Zinco.....	30
4.2.1 Metabolismo do zinco no organismo.....	31
4.2.1.1 Absorção.....	31
4.2.1.2 Transporte.....	32
4.2.1.3 Armazenamento .....	32
4.2.1.4 Excreção .....	33
4.2.1.5 Funções do zinco no organismo .....	33
4.3 Efeito da suplementação de óxido de zinco nas dietas de leitões recém-desmamados.....	33
4.3.1 Efeito como melhorador de desempenho .....	34
4.3.2 Efeito antimicrobiano .....	35
4.3.3 Efeito sobre a integridade intestinal .....	37
4.3.4 Efeito sobre o sistema imune.....	38
4.4 Restrições no uso do óxido de zinco em doses farmacológicas .....	39
4.5 Óxido de zinco nanoparticulado .....	40
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	45
5.1 Caracterização do óxido de zinco nanoparticulado .....	45
5.1.1 Difração de raio X (DRX) .....	45
5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG).....	45
5.2 Unidade de creche experimental .....	46
5.3 Ensaio piloto.....	46
5.4 Experimento .....	47
5.4.1 Animais e delineamento experimental.....	47
5.4.2 Dietas basais e tratamentos .....	48

5.4.3	Desempenho .....	49
5.4.4	Frequência da ocorrência de diarreia .....	49
5.4.5	Digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta.....	50
5.4.6	Quantificação da excreção de zinco nas fezes .....	51
5.4.7	Análises sanguíneas .....	51
5.4.7.1	Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) .....	51
5.4.7.2	Concentração de zinco no plasma.....	52
5.4.7.3	Hemograma.....	52
5.4.8	Morfometria e peso de órgãos .....	53
5.4.9	Histologia do epitélio intestinal .....	53
5.4.10	Contagem bacteriana.....	54
5.4.10.1	Contagem bacteriana total.....	54
5.4.10.2	Contagem de enterobactérias .....	54
5.4.10.3	Contagem de lactobacilos .....	55
5.4.11	Análise estatística.....	55
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
6.1	Caracterização do óxido de zinco nanoparticulado .....	57
6.2	Ensaio piloto .....	58
6.3	Experimento.....	60
6.3.1	Desempenho .....	60
6.3.2	Frequência da ocorrência de diarreia .....	63
6.3.3	Concentração de matéria seca e excreção de zinco nas fezes .....	65
6.3.4	Digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia bruta.....	68
6.3.5	Análises sanguíneas .....	72
6.3.5.1	Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e concentração de zinco no plasma .....	72
6.3.5.2	Hemograma.....	75
6.3.6	Morfometria e peso de órgãos .....	80
6.3.7	Histologia do epitélio intestinal .....	80
6.3.8	Contagem bacteriana no conteúdo intestinal.....	83
7	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	89

## RESUMO

### **Utilização de zinco, na forma de óxido de zinco nanoparticulado, em dietas para leitões recém-desmamados**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de Zn (na forma de ZnO nanoparticulado) em dietas para leitões recém-desmamados sobre o desempenho, a ocorrência de diarreia, a digestibilidade dos nutrientes, a excreção de Zn nas fezes, os parâmetros sanguíneos, a histologia do epitélio intestinal, a morfometria de órgãos e a contagem bacteriana no conteúdo intestinal em comparação ao uso de dose farmacológica de Zn (na forma de ZnO). Foram utilizados 192 leitões desmamados aos 21 dias, em um experimento em blocos casualizados, com 6 tratamentos, 8 repetições (blocos) e 4 animais por unidade experimental (baia). Os tratamentos foram: controle negativo - dieta basal com 100 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO); controle positivo - dieta basal com 2400 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO), e dieta basal com 12, 24, 48 ou 96 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N). Os leitões foram alimentados com as dietas experimentais, durante os primeiros 21 dias de experimento. Dos 22 aos 35 dias, todos os animais foram alimentados com uma única dieta, com níveis basais de Zn. A ocorrência de diarreia foi registrada diariamente. Amostras de fezes foram coletadas para determinação da digestibilidade dos nutrientes da dieta e quantificação do Zn excretado. Amostras de sangue foram coletadas no 19º dia do experimento para análise dos parâmetros sanguíneos. No 21º dia, um animal de cada baia foi abatido para a realização da morfometria dos órgãos, histologia do epitélio intestinal e contagem bacteriana. Os dados foram submetidos à análise de variância e à regressão polinomial. Contrastes ortogonais foram utilizados para comparar o tratamento controle positivo com cada um dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N). Não foram observados efeitos dos níveis de Zn (ZnO-N) sobre o desempenho, a excreção de Zn nas fezes, o hemograma, a morfometria de órgãos, a histologia do epitélio intestinal e a contagem bacteriana no conteúdo intestinal. O aumento dos níveis de Zn (ZnO-N) aumentou linearmente a digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta. Foi observado efeito quadrático dos níveis de Zn (ZnO-N) sobre a frequência da ocorrência de diarreia entre os dias 1 e 7 e sobre a concentração plasmática de Zn. No período de 1 a 21 dias foi observado um menor consumo diário de ração para os níveis de Zn (ZnO-N) em comparação ao controle positivo. Não foram observados diferenças entre o controle positivo e os níveis de Zn (ZnO-N) para as variáveis de desempenho e a frequência da ocorrência de diarreia durante o período de 21 a 35 dias. Foi observada uma menor excreção de Zn nas fezes, e uma menor concentração plasmática de Zn para os níveis de Zn (ZnO-N) em comparação ao controle positivo. A suplementação de Zn, na forma de ZnO-N, não foi capaz de substituir a dose farmacológica de Zn (ZnO) no controle da diarreia após o desmame. Os níveis de Zn, na forma de ZnO-N, não ocasionaram toxicidade nos animais e propiciaram uma redução na excreção de Zn nas fezes.

Palavras-chaves: Desempenho; Digestibilidade; Epitélio intestinal; Excreção de zinco





## ABSTRACT

### **Dietary zinc supplementation, as zinc oxide nanoparticles, in weanling pig diets**

The purpose of this study was to evaluate the effects of dietary Zn (as ZnO nanoparticles) on performance, diarrhea occurrence, nutrient digestibility, Zn excretion in the feces, blood parameters, histology of gut epithelium, organs morphometry and intestinal bacterial count of weanling pigs compared to the use of pharmacological doses of Zn (as ZnO). One hundred and ninety-two 21d-weaned pigs ( $5.90 \pm 0.83$  kg BW) were used in a randomized complete block design experiment with 6 treatments, 8 replications per treatment, and 4 animals per experimental unit (pen). The treatments were: negative control (NC): basal diet (based on corn, soybean meal, dried whey and dried plasma) with 100 mg Zn (as ZnO)/kg diet; positive control (PC): basal diet with 2,400 mg Zn (as conventional ZnO, 150nm)/kg diet and basal diet with 12, 24, 48 or 96 mg Zn (as ZnO-N, 70nm)/kg diet. Pigs were fed dietary treatments from 1 to 21 d feeding period followed by a common diet (same diet for all treatments) from 22 to 35 d feeding period. Diarrhea occurrence was recorded daily. Feces samples were collected to determine the digestibility of the diet and to quantify the Zn excreted. Blood samples were collected on the 19th day of the experiment for analysis of blood parameters. On the 21th day one pig per pen was slaughtered for the analyses of organs morphometry, intestinal epithelium histology and bacterial count. ANOVA and polynomial regression analysis (for levels of Zn as ZnO-N) were performed. Orthogonal contrasts were used to compare positive control with each level of Zn (as ZnO-N). No effects of Zn levels (as ZnO-N) were observed on performance, Zn excretion on feces, blood count, organs morphometry, intestinal epithelium histology and intestinal bacterial count. Increased levels of Zn (as ZnO-N) linearly increased the apparent digestibility of nutrients. It was observed a quadratic effect of Zn levels (as ZnO-N) on the frequency of diarrhea occurrence between 1 and 7 d and on the Zn plasma concentration. From 1 to 21 d of experimental period, lower daily feed intake for Zn levels (as ZnO-N) was observed compared to positive control. No differences were observed among the positive control and levels of Zn (as ZnO-N) for performance and diarrhea occurrence during the period 21 to 35 d. Lower Zn excretion in feces and lower Zn plasma concentration were observed for Zn levels (as ZnO-N) compared to the positive control. Zn supplementation, as ZnO-N, could not to replace the pharmacological dose of Zn (ZnO) to control diarrhea after weaning. The levels of Zn, as ZnO-N, did not cause toxicity of weanling pigs and reduced Zn excretion in the feces.

Keywords: Performance; Digestibility; Intestinal epithelium; Zinc excretion



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas basais (matéria natural).....	48
Tabela 2 - Efeito da suplementação de níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre o desempenho zootécnico de leitões no pós-desmame durante o ensaio piloto <sup>1</sup> .....	59
Tabela 3 - Efeito dos níveis Zn na dieta sobre o desempenho zootécnico de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	61
Tabela 4 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a frequência da ocorrência de diarreia de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	63
Tabela 5 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a concentração de matéria seca e a excreção de zinco nas fezes de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	65
Tabela 6 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	68
Tabela 7 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre os valores médios de atividade enzimática sérica de ALT e AST e a concentração de zinco no plasma de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	72
Tabela 8 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre os valores de C.h.c.m., hemácias, hemoglobina, hematócrito, metarrubríctos, proteína total e V.c.m. de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	76
Tabela 9 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre os valores de leucócitos, eosinófilos, linfócitos típicos, monócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	79
Tabela 10 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a morfometria e peso de órgãos de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	80
Tabela 11 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a histologia do epitélio intestinal (duodeno e jejuno) de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	81
Tabela 12 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a contagem bacteriana no conteúdo intestinal (jejuno e ceco) de leitões recém-desmamados <sup>1</sup> .....	84



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Difração de Raios X para as amostras de ZnO .....	57
Figura 2 - Microscopia eletrônica e distribuição de tamanho das partículas do ZnO convencional .....	58
Figura 3 - Microscopia eletrônica e distribuição de tamanho das partículas do ZnO-N.....	58
Figura 4 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a frequência da ocorrência de diarreia no período de 1 a 7 dias de experimentação .....	64
Figura 5 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a digestibilidade aparente da energia bruta da dieta pré-inicial II. ....	69
Figura 6 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a digestibilidade aparente do extrativo não nitrogenado da dieta pré-inicial II.....	69
Figura 7 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a digestibilidade aparente da matéria seca da dieta pré-inicial II. ....	70
Figura 8 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a digestibilidade aparente da proteína bruta da dieta pré-inicial II.....	70
Figura 9 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a concentração plasmática de Zn de leitões aos 19 dias de experimentação.....	74
Figura 10 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre os valores do hematócrito de leitões aos 19 dias de experimentação .....	76
Figura 11 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a concentração de metarrubríctos de leitões aos 19 dias de experimentação.....	77
Figura 12 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a concentração de hemoglobina de leitões aos 19 dias de experimentação .....	77
Figura 13 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a relação altura de vilosidade e profundidade de cripta do duodeno de leitões aos 21 dias de experimentação .....	82
Figura 14 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a contagem de células caliciformes nas vilosidades do jejuno de leitões aos 21 dias de experimentação	82



## 1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo. A produção suinícola apresenta crescimento gradativo a cada ano, crescimento este impulsionado pelos avanços tecnológicos e mercadológicos do setor. No Brasil, a suinocultura é uma atividade de grande impacto econômico e social, tendo o Brasil ocupado a terceira posição no *ranking* dos países produtores de carne suína, com cerca de 3.643 mil toneladas, das quais 84,80% destinadas ao consumo interno e 15,20% à exportação (ABPA, 2016).

Os grandes avanços do melhoramento genético, da nutrição, do ambiente, da sanidade e do manejo resultaram em uma suinocultura mais eficiente com melhores índices produtivos e reprodutivos, sendo característicos dos sistemas de produção industrial os ciclos produtivos mais curtos e o maior número de animais terminados por matriz por ano. Para acompanhar estes avanços, a suinocultura industrial adotou a prática do desmame precoce, realizado em média aos 21 dias de idade (MORÉS et al., 1998). Porém, este desmame ocorre em um período de imaturidade fisiológica e imunológica dos leitões que, juntamente com o estresse do desmame, tem sido associado a distúrbios do trato gastrointestinal, alterações na anatomia e fisiologia intestinal, estabelecimento de infecções e desenvolvimento de doenças como a diarreia pós-desmame que comprometem a saúde e o desempenho animal (CAMPBELL; CRENSHAW; POLO, 2013; LALLÈS, 2008; MORÉS; AMARAL, 2001).

O uso de aditivos antimicrobianos em dietas é uma prática comum neste período para contornar tais problemas e melhorar o desempenho animal. Estes produtos agem como moduladores da microbiota intestinal, promovendo efeitos diretos e indiretos na saúde e desempenho animal (CHIQUIERI, 2003).

A suplementação de óxido de zinco (ZnO) em doses farmacológicas na dieta de leitões recém-desmamados tem ação no lúmen intestinal contra a adesão de bactérias patogênicas causadoras de infecções e, conseqüentemente, diarreias (ROSELLI et al., 2005). Muitos autores têm relatado os benefícios da suplementação do ZnO em doses farmacológicas (acima de 2000 mg de Zn/kg de ração) sobre a saúde intestinal e o desempenho, sobretudo nas duas primeiras semanas do pós-desmame (BOTELHO et al., 1995; CARLSON; HILL; LINK, 1999; HILL et al. 2001; POULSEN, 1995). Entretanto, o grande entrave da utilização do ZnO em doses farmacológicas é o potencial poluidor do zinco (Zn), uma vez que aproximadamente 80% da quantidade ingerida é excretada nas fezes (BUFF et al., 2005). Frente a isso, a legislação europeia já limita a utilização de ZnO nas dietas de suínos em no máximo 150mg de Zn/kg de alimento completo (EUROPEAN COMMUNITIES, 2003), dose muito aquém



daquela relatada como melhoradora de desempenho, o que pode vir a ser também uma exigência destes países para a importação de carne suína.

Uma possível alternativa ao ZnO comumente utilizado seria sua substituição pela forma nanoparticulada, utilizada na indústria química e farmacêutica (RASMUSSEN et al., 2010; ZHAO et al., 2014). O óxido de zinco nanoparticulado (ZnO-N) apresenta uma maior atividade química e antibacteriana e maior taxa de absorção, quando comparado ao ZnO convencional, devido ao seu menor tamanho de partícula e maior área superficial específica (HOSEINZADEH et al., 2013; ZHAO et al., 2014).

Na literatura há trabalhos com a suplementação do ZnO-N para ratos e cobaias, em ensaios de toxidez, e para frangos de corte, em ensaios de desempenho e saúde intestinal (AHMADI et al., 2014; ZHAO et al., 2014). Entretanto, para suínos não são encontrados trabalhos na literatura que avaliem sua suplementação sobre a saúde intestinal, desempenho e possíveis efeitos tóxicos, sendo então importante o desenvolvimento de estudos nesta área.

## 2 HIPÓTESE

A hipótese do estudo é que o óxido de zinco nanoparticulado (ZnO-N) seja capaz de substituir a dose farmacológica de óxido de zinco (ZnO) convencional utilizada no controle da diarreia e como melhorador de desempenho nas dietas de leitões recém-desmamados promovendo benefícios sobre os indicadores de saúde intestinal sem apresentar sinais de toxicidade ao organismo e proporcionar uma redução na excreção de zinco para o ambiente.



### **3 OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de Zn (na forma de ZnO-N) em dietas para leitões recém-desmamados sobre o desempenho zootécnico, a frequência da ocorrência de diarreia, o teor de matéria seca nas fezes, a digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta, a excreção de zinco nas fezes, os parâmetros sanguíneos (as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), os níveis plasmáticos de zinco e o hemograma), a histologia do epitélio intestinal (altura de vilosidade, profundidade de cripta e contagem de células caliciformes), a morfometria e peso de órgãos (estômago, pâncreas, intestino delgado, fígado e baço), e a contagem bacteriana no intestino em comparação ao uso de dose farmacológica de Zn (na forma de ZnO convencional).



## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Particularidades da fase pós-desmame dos leitões

O período imediatamente após o desmame é crítico para os leitões. A separação brusca dos leitões do contato com a porca, a formação de novos grupos sociais e a mudança abrupta da alimentação antes composta basicamente por leite para uma dieta sólida, associadas à imaturidade fisiológica e imunológica do leitão, promovem uma série de distúrbios no trato gastrointestinal que comprometem a saúde e o desempenho do animal (CAMPBELL; CRENSHAW; POLO, 2013; LALLÈS, 2008; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997; WEARY; JASPER; HÖTZEL, 2008).

Durante a fase de aleitamento, o leitão possui uma alimentação rica em gordura, caseína e lactose que apresenta elevada digestibilidade. Após o desmame, ocorre a mudança para dietas à base de alimentos sólidos e secos, principalmente de origem vegetal, que não são bem aproveitadas pelo animal em função da imaturidade do trato digestório. O baixo consumo de alimento neste período e a insuficiente produção de ácido clorídrico e enzimas digestivas acarretam reduzidas digestão e absorção dos nutrientes, limitando o desempenho dos leitões (HUGUET et al., 2006; JENSEN; JENSEN; JAKOBSEN, 1997; ROPPA, 1998).

Este cenário também está diretamente relacionado à atrofia das vilosidades intestinais, que ocorre devido à maior descamação dos enterócitos e à redução na taxa de renovação celular, ocorrendo também o aumento da produção celular e o aprofundamento das criptas no intestino. Estes fatores contribuem para a redução da secreção de enzimas na borda em escova do intestino delgado (HEDEMANN; HØJSGAARD; JENSEN, 2003; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997; PLUSKE; WILLIAMS; AHERNE, 1996). Estas modificações resultam na diminuição do número de células absorptivas e um aumento no número de células secretoras no epitélio intestinal promovendo a diminuição na digestão e na absorção de nutrientes (LALLÈS, 2008; NABUURS et al., 1993; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997; PLUSKE; WILLIAMS; AHERNE, 1996).

Como consequência da imaturidade digestiva e das alterações fisiológicas que ocorrem neste período, tem-se o aumento da fração não digerida do alimento no lúmen, que serve de substrato para a fermentação bacteriana, resultando no aumento da produção de ácido lático e ácidos graxos voláteis que promovem um aumento da osmolaridade no lúmen intestinal dificultando a absorção de água no intestino (ETHERIDGE; SEERLEY; WYATT, 1984), o que contribui para a ocorrência de quadros de desidratação, diarreias e infecções entéricas,

sobretudo nos primeiros 14 dias após o desmame (LALLÈS, 2008; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997; PLUSKE; WILLIAMS; AHERNE, 1996). Assim, aumenta-se a susceptibilidade dos leitões às infecções oportunistas (HEO et al., 2013; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997), o que pode acentuar ainda mais a queda no aproveitamento dos nutrientes da dieta, a ocorrência de diarreias e a limitação do crescimento.

Em leitões recém-desmamados, a proliferação de cepas patogênicas de *Escherichia coli* no trato gastrintestinal, particularmente no intestino delgado, é comumente associada a este quadro (HEO et al., 2013). Estas bactérias, por meio de apêndices superficiais proteicos (fimbrias), se ligam a receptores presentes na borda em escova do epitélio intestinal, onde secretam enterotoxinas que promovem a redução da capacidade absorptiva do epitélio intestinal e o aumento da secreção de fluidos e eletrólitos pelas células na mucosa (NAGY; FEKETE, 2005), favorecendo o processo diarreico. Além disso, o desmame precoce coincide com um período em que os leitões apresentam as menores concentrações de imunoglobulina G (IGg) no soro, pois a imunidade passiva do colostro está decaindo e a imunidade ativa ainda não está totalmente desenvolvida, ficando mais susceptíveis ao estabelecimento de infecções e o desenvolvimento de doenças, como a diarreia pós-desmame (MORÉS; AMARAL, 2001; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997).

Os desafios nutricionais e fisiológicos enfrentados pelos leitões na fase do pós-desmame podem ser contornados com o uso de aditivos zootécnicos em suas dietas. Estes produtos atuam na modulação do ambiente e da microbiota intestinal, promovendo efeitos diretos e indiretos na saúde e desempenho animal. Dentre estes aditivos, destaca-se o óxido de zinco (ZnO), que, quando em doses farmacológicas na dieta, tem ação sobre bactérias patogênicas causadoras de enfermidades, promovendo benefícios sobre a saúde e desempenho animal (HILL et al. 2001; ROSELLI et al., 2005).

## **4.2 Zinco**

O zinco (Zn) é um micromineral essencial para os animais. Ele é amplamente distribuído em todo o corpo, tendo grande importância no crescimento e desenvolvimento, na estabilidade de membranas e nos sistemas enzimáticos e função imune (GRELA; PASTUSZAK, 2004). Devido às suas propriedades, o Zn apresenta uma grande participação no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Sua deficiência causa redução do crescimento e da atividade de uma série de enzimas no organismo, distúrbios no sistema

imunológico e humoral, lesões na pele, diarreias e, em casos mais graves, a morte (GRELA; PASTUSZAK, 2004; HEO et al., 2013; POULSEN, 1995; PRASAD et al., 1969).

#### **4.2.1 Metabolismo do zinco no organismo**

##### **4.2.1.1 Absorção**

Embora os mecanismos envolvidos na absorção do Zn pelo organismo não estejam totalmente elucidados, sabe-se que sua absorção ocorre em todo o intestino delgado, principalmente nas regiões do duodeno e jejuno, por meio de transporte ativo onde o processo de absorção é mediado por proteínas transportadoras de Zn, e é regulado diretamente pela quantidade ingerida do mineral, sendo mais eficiente em situações de baixo consumo do mineral (COUSINS, 1985; KING; COUSINS, 2014; REYES, 1996). Moléculas de Zn são hidrofílicas polares e, por isto, não atravessam membranas celulares por difusão passiva (COUSINS; MCMAHON, 2000).

Sua absorção também é influenciada por diversos componentes da dieta. Muitos compostos podem formar complexos com o Zn da dieta, diminuindo sua absorção. O fitato forma complexos insolúveis com minerais, dentre eles o Zn e aminoácidos, reduzindo a biodisponibilidade destes componentes (DAVIES; NIGHTINGALE, 1975; LÖNNERDAL, 2000; TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1991).

Alguns microminerais interferem na absorção do Zn como, por exemplo, o cálcio, ferro, selênio, chumbo, cromo e cádmio (GROPPER; SMITH; GROFF, 2009; LÖNNERDAL, 2000). O cálcio, o macromineral com maior influência na absorção, induz a formação de um complexo insolúvel com o fitato e com o Zn e, assim, a absorção de Zn é reduzida (LÖNNERDAL, 2000). Diferentes mecanismos de interação entre estes minerais estão envolvidos, porém não totalmente elucidados. Compostos como o ácido oxálico e os taninos também afetam negativamente a absorção de Zn (GROPPER; SMITH; GROFF, 2009; SALGUEIRO et al., 2000).

Outros fatores atuam como ligantes ao íon Zn e aumentam sua solubilidade, aumentando, assim, a sua absorção. Têm-se, como exemplos, o ácido cítrico e os aminoácidos histidina, cisteína, lisina, metionina e glicina (COUSINS, 1985; GIROUX; PRAKASH, 1977; LÖNNERDAL, 2000). Outras moléculas como as prostaglandinas e a enzima fitase também contribuem com o aumento na absorção. A prostaglandina atua no controle do fluxo intestinal do Zn (SONG; LEE; ADHAM, 1988) e a enzima fitase que hidrolisa a molécula de fitato liberando inositol, fósforo inorgânico e outros minerais ligados em sua estrutura (CASEY;



WALSH, 2004), dentre eles o Zn (ADEOLA et al., 1995; LEI et al., 1993; REVY et al., 2004; WALK; SRINONGKOTE; WILCOCK, 2013).

#### **4.2.1.2 Transporte**

A quantidade de Zn transportada da membrana para o citosol, após a absorção no enterócito, é dependente da concentração de Zn na célula (HILL; SPEARS, 2000). Este processo é regulado por duas proteínas que servem como ligantes intracelulares e atuam na regulação da absorção e secreção de Zn no intestino. O Zn se liga às proteínas intestinais ricas em cisteína (CRIP's), que atuam no transporte intercelular de Zn em direção à membrana basolateral, aumentando a velocidade de sua absorção. Quando a concentração intracelular de Zn é alta, a proteína metalotioneína terá sua síntese aumentada inibindo a absorção de Zn, regulando a ligação do metal com as CRIP's. Uma vez que se liga ao metal de maneira transitória, a proteína metalotioneína libera o Zn gradativamente no citosol, e este mineral se associa então as CRIP's (COUSINS, 1985; ESCOBAR et al., 1995; HEMPE; COUSINS, 1992; HENRIQUES; HIRATA; COZZOLINO, 2003; O'DELL, 1992). A proteína metalotioneína é, então, um componente regulatório da absorção e da homeostase do Zn no organismo (STARCHER; GLAUBER; MADARAS, 1980).

No interior do enterócito, o Zn pode ser utilizado ou armazenado pela célula, ou ser transportado via plasma ao fígado e, depois, redistribuído para ser utilizado em outros tecidos. Cerca de 60% do Zn absorvido é transportado pela albumina. Outros componentes também realizam o transporte como a  $\alpha$ -2 macroglobulina, transferrina e imunoglobulina G que, juntas, transportam de 15 a 40% do Zn absorvido, e os aminoácidos cisteína e histidina que formam um complexo com o Zn no sangue. Uma série de proteínas transportadoras de Zn está relacionada ao efluxo de Zn nas células intestinais (proteínas da família "Znt") e ao influxo de Zn nas células dos tecidos alvo (proteínas da família "ZIP") (GROPPER; SMITH; GROFF, 2009; KING; COUSINS, 2014).

#### **4.2.1.3 Armazenamento**

Pequenas quantidades de Zn podem ser armazenadas ligadas à metalotioneína no fígado, rins, pâncreas e intestino. Desta forma, em situações de necessidade, ele é facilmente liberado. Também, são encontrados estoques de Zn no cérebro, pele, músculos e ossos (GROPPER; SMITH; GROFF, 2009). Nas células, o Zn pode ser armazenado também em

vesículas que servem como fonte de Zn em caso de necessidade e protegem as células do efeito tóxico do Zn livre no citoplasma (KING; COUSINS, 2014).

#### **4.2.1.4 Excreção**

A excreção do Zn ocorre principalmente via trato gastrointestinal, mas também são observadas perdas via urina e suor (VALLEE; FALCHUK, 1993). As fezes são a maior rota de excreção (PEKAS, 1966) e correspondem à fração de Zn não absorvida e às perdas endógenas via suco pancreático e células intestinais (COUSINS, 1985). As perdas urinárias são limitadas, correspondendo a menos de um miligrama por dia (POULSEN; LARSEN, 1995), uma vez que, sob condições normais, cerca de 95% do Zn da fração filtrável do plasma é reabsorvido nos túbulos renais (ABU-HAMDAN et al., 1981).

#### **4.2.1.5 Funções do zinco no organismo**

O Zn como mineral essencial para os suínos possui diversas funções no organismo. O Zn é necessário para a atividade de mais de 300 metaloenzimas (MCCALL; HUANG; FIERKE, 2000), atuando diretamente no metabolismo e função antioxidante (SHAHEEN; ABD EL-FATTAH, 1995) e em todos os processos biológicos dependentes de enzimas que possuem este mineral em sua estrutura ou dependem dele como cofator (MACDONALD, 2000; YOUSEF et al., 2002). Ele está diretamente relacionado com o sistema endócrino, estando ligado ao crescimento, estímulo e regulação do metabolismo e reprodução (BORAH et al., 2014; MACDONALD, 2000; YIN et al., 2009). Também possui papel importante no sistema imune, na defesa contra patógenos (LIU et al., 2014; SHANKAR; PRASAD, 1998; VAHJEN; PIEPER; ZENTEK, 2011), na função celular (BEYERSMANN; HAASE, 2001), estrutural e manutenção da integridade de mucosas (HU et al., 2013).

### **4.3 Efeito da suplementação de óxido de zinco nas dietas de leitões recém-desmamados**

Existem diversos estudos avaliando o efeito da suplementação de Zn na dieta de leitões recém-desmamados, sendo o óxido de zinco (ZnO) a fonte de suplementação de Zn mais utilizada. Embora o exato mecanismo de ação do ZnO ainda não tenha sido completamente elucidado, nestes estudos são avaliados justamente, os efeitos de sua

suplementação sobre o desempenho, saúde intestinal, função imune, função antioxidante e *status* fisiológico do organismo (BOTELHO et al., 1995; BUFF et al., 2005; CARLSON; HILL; LINK, 1999; HEO et al., 2010; HILL et al., 2001; LIU et al., 2014; MIYADA et al., 1993; MIYADA et al., 1996; OU et al., 2007; PARK et al., 2015; POULSEN, 1995; VAHJEN; PIEPER; ZENTEK, 2011; YIN et al., 2009).

#### **4.3.1 Efeito como melhorador de desempenho**

Enquanto as exigências nutricionais de Zn para leitões estão na ordem 100 mg de Zn/kg de ração (NRC, 2012), níveis farmacológicos de ZnO como melhorador de desempenho (acima da necessidade metabólica) variam de 2000 a 4000 mg de Zn/kg de ração. Esta suplementação tem demonstrado ser eficaz em promover melhorias no consumo de ração, ganho de peso e na conversão alimentar, assim como na redução da frequência e severidade da diarreia em leitões recém-desmamados, sobretudo nas primeiras duas semanas após o desmame (BOTELHO et al., 1995; CARLSON et al., 2004; CARLSON; HILL; LINK, 1999; HILL et al., 2001; POULSEN, 1995).

Embora os mecanismos envolvidos no efeito melhorador de desempenho do ZnO não estejam completamente elucidados, acredita-se que estes efeitos possam estar relacionados a controles hormonais, como por exemplo, a aumentos na expressão do fator de crescimento semelhante a insulina - IGF-I e IGF-II, importantes reguladores do crescimento (CARLSON; POULSEN; VESTERGAARD, 2004) e aumentos na secreção de grelina (LI et al., 2010; YIN et al., 2009) que atua na liberação do hormônio do crescimento (GH) e também estimula o consumo de alimento (ASAKAWA et al., 2001).

A suplementação de níveis farmacológicos de ZnO promove aumentos na concentração plasmática de grelina, IGF-I e colecistoquinina e aumentos simultâneos no ganho de peso. O efeito na secreção destes hormônios no ganho de peso é independente do consumo de alimento, ou seja, o ganho de peso nos leitões recém-desmamados suplementados com ZnO ocorre independentemente da ingestão de alimento o que indica a existência de um mecanismo mais complexo envolvido na melhoria do desempenho (YIN et al., 2009). Observa-se também, um aumento na concentração de IGF-I na mucosa intestinal que promove um incremento no crescimento da mucosa que por consequência aumenta a atividade das enzimas da borda em escova e a digestão e absorção dos nutrientes (CARLSON; POULSEN; VESTERGAARD, 2004).

Especula-se que a suplementação de Zn estimule a síntese de enzimas digestivas, o que resulta em melhorias na digestão e absorção dos nutrientes e, potencialmente, melhora o desempenho animal. Suplementações em níveis farmacológicos promovem um aumento na atividade de enzimas no pâncreas. Também foram relatados aumentos na atividade de enzimas como a amilase, carboxipeptidase, quimotripsina, tripsina e lipase. Contudo, apesar do Zn estimular a síntese enzimática no pâncreas, a secreção enzimática não apresenta o mesmo efeito, uma vez que a atividade destas enzimas no intestino não é afetada. O exato mecanismo de ação do Zn sobre a atividade enzimática deve ser melhor estudado para elucidar a influência da melhoria na ação enzimática sobre a melhoria do desempenho (HEDEMANN; JENSEN; POULSEN, 2006).

Outro benefício do ZnO, como melhorador de desempenho, se relaciona ao seu efeito antimicrobiano. A sua suplementação promove uma redução na fermentação de nutrientes digestíveis na porção proximal do trato gastrointestinal. Estes nutrientes deixam de ser utilizados pelas bactérias fermentadoras, incluindo-se as bactérias do gênero *Lactobacillus* e, desta forma, mais nutrientes ficam disponíveis para o crescimento animal (HØJBERG et al., 2005). A redução na fermentação dos compostos proteicos no intestino pode também reduzir a formação de metabólitos tóxicos, como amônia e aminas, que podem estar relacionados à ocorrência de diarreia (HEIM et al., 2014).

A diarreia pós-desmame é uma causa comum de redução no desempenho e aumento da mortalidade em leitões desmamados (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997). Em relação ao seu efeito sobre a ocorrência de diarreia, o ZnO promove a redução na secreção assim como um aumento na absorção de água e eletrólitos no lúmen intestinal, melhora a regeneração do epitélio intestinal, aumentando a secreção de enzimas, e possui efeito antimicrobiano, modulando a flora bacteriana no intestino. Desta forma, o Zn atua na modulação da resistência do hospedeiro aos agentes infecciosos, reduzindo o risco, a gravidade e a duração da diarreia e, conseqüentemente, proporcionando benefícios ao desempenho dos animais (CANANI et al., 2005; CARLSON; SEHESTED; POULSEN, 2006; HOQUE; RAJENDRAN; BINDER, 2005).

#### **4.3.2 Efeito antimicrobiano**

A ação deletéria da *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETC) no intestino é uma das principais causas da diarreia pós-desmame em leitões. Este patógeno é caracterizado pela produção de adesinas fimbriais que mediam a aderência bacteriana no intestino e a liberação

de enterotoxinas que, por consequência pós-adesão, promovem a diarreia. As adesinas fimbriais F4 e F18 (*Escherichia coli* ETC) estão normalmente relacionadas à diarreia no pós-desmame (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

Sabe-se que o efeito antimicrobiano do ZnO na dieta de leitões desmamados não se dá por ação bactericida direta (ROSELLI et al., 2003). Acredita-se que o principal efeito esteja relacionado à sua capacidade em inibir a adesão e a internalização das bactérias patogênicas causadoras de infecções no intestino, sendo o efeito principalmente contra as estirpes patogênicas de *Escherichia coli* (JENSEN-WAERN et al., 1998; ROSELLI et al., 2005). Ao se ligar às fimbrias bacterianas, o ZnO interfere no reconhecimento dos receptores específicos nas células intestinais pela bactéria (ROSELLI et al., 2005). Sua ação antimicrobiana também está associada à inibição do transporte ativo de aminoácidos, açúcares e succinato (ANRAKU; GOTO; KIN, 1975), à inibição do sistema oxidase da cadeia respiratória da bactéria (KASAHARA; ANRAKU, 1972) e ao aumento da expressão gênica de peptídeos antimicrobianos no intestino delgado, sendo estes envolvidos na defesa contra a invasão microbiana no hospedeiro (WANG et al., 2004).

Estudos *in vitro* mostram que o ZnO inibe o crescimento das espécies *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* no intestino (SAWAI, 2003) que são causadoras de infecções entéricas. Contudo, em estudos com suínos não são relatados efeitos pronunciados do ZnO sobre a contagem de *Escherichia coli* no conteúdo fecal, digesta e tecido intestinal (BROOM et al., 2006; JENSEN-WAERN et al., 1998). Por outro lado, são observadas reduções na população de certas espécies do gênero *Lactobacillus* (HØJBERG et al., 2005; STARKE et al., 2014). Cabe ressaltar que bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a ação do ZnO do que as bactérias Gram-negativas (HØJBERG et al., 2005; ROSELLI et al., 2003; SÖDERBERG et al., 1990), uma vez que as bactérias Gram-negativas possuem um sistema de efluxo de metais pesados para eliminar o Zn intracelular (NIES, 2003). Isto explica porque o ZnO tem efeito bactericida sobre algumas espécies e outras não, como é o caso da *Escherichia coli* (ROSELLI et al., 2003) e porque os lactobacilos são mais susceptíveis do que as enterobactérias à ação do ZnO (STARKE; ZENTEK; VAHJEN, 2013).

Os benefícios destas variações na população bacteriana ainda não estão completamente elucidados, mas sabe-se que o efeito do ZnO sobre a população bacteriana Gram-negativa no intestino pode ter efeito benéfico sobre a estabilidade e a manutenção de elevada diversidade da flora intestinal, nomeadamente os coliformes, sendo este um fator que promove uma competição pela colonização dos receptores com as estirpes com potencial de

promover a diarreia nos leitões, devido a sua maior resistência no meio intestinal (KATOULI et al., 1999; STARKE et al., 2014).

Outro ponto importante é que a adaptação bacteriana ao ZnO na dieta é rápida e normalmente ocorre entre a segunda ou terceira semana após o desmame. Assim, a sua suplementação na dieta de leitões desmamados é benéfica apenas num curto período de tempo, geralmente na primeira semana pós-desmame (STARKE et al., 2014; STARKE; ZENTEK; VAHJEN, 2013).

### 4.3.3 Efeito sobre a integridade intestinal

A integridade do epitélio da mucosa intestinal depende da regulação coordenada da arquitetura da parede intestinal e adequada formação de muco. A morfologia da mucosa intestinal pode ser caracterizada pela altura das vilosidades e profundidade de criptas que são consideradas indicadores da capacidade funcional dos enterócitos. Altura de vilosidade reduzida e profundidade de cripta elevada demonstram uma deterioração na morfologia intestinal durante o desmame com prejuízos na digestão e absorção dos nutrientes (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997).

O Zn desempenha um papel importante na regulação e diferenciação dos tecidos intestinais, provavelmente mediada por reguladores moleculares, como as proteínas *zinc fingers* que regulam a expressão de genes relacionados à formação da barreira epitelial e controle da proliferação celular nas criptas e migração celular nas vilosidades intestinais (SIMMEN et al., 2007).

Resultados decorrentes da suplementação de ZnO no pós-desmame são controversos. Alguns trabalhos relatam que a suplementação induz um efeito positivo na altura das vilosidades intestinais, aumenta a espessura da mucosa intestinal e relação vilosidade:cripta e reduz a profundidade de cripta (BOSI et al., 2003; LI et al., 2001). Existem também evidências do efeito do tempo após a desmama sobre a regeneração estrutural do intestino (LIU et al., 2014; MAVROMICHALIS et al., 2000; MAZZONI et al., 2010). O ZnO evita também perturbações na integridade da barreira da mucosa intestinal, prevenindo o aumento na permeabilidade das *tigh-junctions*, que servem como uma barreira à internalização das bactérias presentes na mucosa e no lúmen intestinal (ROSELLI et al., 2003).

As mucinas são uma importante barreira protetora no interior do trato gastrintestinal. São proteínas fortemente glicosiladas que constituem o muco que reveste as superfícies epiteliais. A camada de mucina protege a integridade estrutural do epitélio intestinal e é a

primeira barreira contra a invasão de patógenos e a ocorrência de diarreia. Uma parte considerável de mucina é utilizada como fonte de nutrientes para as comunidades microbianas e serve como local de ligação para os microrganismos associados ao trato gastrointestinal, sobretudo os lactobacilos, mas também de agentes patogênicos (ROUSSEL; DELMOTTE, 2004). As mucinas são armazenadas nas vesículas das células caliciformes e produzidas continuamente ou como reação a estímulos específicos (FORSTNER, 1995).

Estudos indicam que doses farmacológicas de ZnO na dieta aumentam a área de produção de mucinas no ceco e cólon de leitões desmamados, não tendo sido observado o mesmo efeito no epitélio do intestino delgado. Embora este efeito não seja muito relevante no contexto da diarreia pós-desmame decorrente, sobretudo, da colonização de *Escherichia coli* no intestino delgado (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997), este resultado pode proporcionar uma melhor proteção contra a invasão de patógenos, infecções no intestino grosso e a consequente ocorrência de diarreia (LIU et al., 2014).

#### **4.3.4 Efeito sobre o sistema imune**

No sistema imune, o ZnO atua na regulação e expressão de moduladores do sistema imune, como as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e na regulação intracelular e proteção das membranas dos linfócitos (DARDENNE, 2002). As citocinas, proteínas regulatórias dos processos de defesa do organismo, ativam os componentes celulares (leucócitos) e humorais (anticorpos). Um excesso na produção das citocinas pró-inflamatórias tem, como consequência, a queda no consumo de alimentos, a elevação da temperatura corporal e a produção de calor e o comprometimento da integridade intestinal e da função da mucosa intestinal. O aumento na síntese e expressão destas proteínas representa a maior via de utilização de aminoácidos sendo responsável, em parte, pelas alterações no *turnover* muscular, com perdas de nitrogênio acompanhando a resposta inflamatória. Desta forma, a suplementação de ZnO na dieta de leitões recém-desmamados pode atuar no controle dos processos inflamatórios, na manutenção da integridade da barreira intestinal e na disponibilidade de nutrientes para o crescimento (LIU et al., 2014).

O Zn é requerido para atividade biológica do hormônio timulina, secretado pelas células epiteliais do timo. Este hormônio promove a maturação dos linfócitos T, citotoxicidade e produção da citocina pró-inflamatória IL-2 (DARDENNE, 2002).

São observados efeitos diretos do Zn na produção, maturação e função dos leucócitos. A deficiência de Zn influencia o recrutamento e decresce a migração dos neutrófilos aos locais de infecção e inflamação e promove uma redução na atividade fagocitária dos macrófagos (RINK; GABRIEL, 2000). Também se observa redução na concentração e atividade dos linfócitos T e B (SHANKAR; PRASAD, 1998).

A suplementação de ZnO e o consequente aumento na concentração extracelular de Zn reduzem o número de mastócitos na mucosa do intestino delgado e inibem a liberação de histamina a partir dos mastócitos, atenuando o efeito secretório da mucosa intestinal e o processo diarreico. Os mastócitos contribuem para a patogênese da diarreia através da produção e liberação de histamina, prostaglandinas, leucotrienos e TNF- $\alpha$ , sendo a liberação destas moléculas mediadas pela ativação dos mastócitos pela imunoglobulina E (OU et al., 2007).

#### **4.4 Restrições no uso do óxido de zinco em doses farmacológicas**

Como relatado anteriormente, as doses melhoradoras de desempenho e de saúde intestinal, utilizadas em dietas de leitões recém-desmamados, situam-se entre 2000 a 4000 mg de Zn/kg de ração. Estudos indicam que a eficácia do ZnO para leitões não esteja relacionada à sua absorção, mas sim à sua ação no lúmen intestinal o que, por consequência, faz com que grande parte do Zn ingerido seja excretada via fezes (POULSEN; LARSEN, 1995; RINCKER et al., 2005). Sendo assim, há uma preocupação em relação ao potencial de poluição ambiental causado pelo excesso de excreção de Zn, uma vez que a sua biodisponibilidade e as taxas de retenção deste nutriente na forma de ZnO para os suínos são baixas. Leitões suplementados com altos níveis de ZnO excretam entre 60% e 80% da quantidade ingerida, sendo maior a excreção quanto maior os níveis de Zn na dieta (BUFF et al., 2005; CARLSON et al., 2004; CASE; CARLSON, 2002).

Nos dejetos, o Zn pode trazer riscos à natureza e se tornar tóxico aos microrganismos, às plantas e ao homem, devido aos grandes acúmulos deste mineral no solo, principalmente em áreas de criação intensiva de suínos, e devido à sua rápida distribuição via águas superficiais e subterrâneas (GRÄBER et al., 2005; L'HERROUX et al., 1997), além de ser possivelmente um indutor ambiental de resistência bacteriana (PELTIER et al., 2010). Um estudo, empregando modelos estatísticos, indica que entre os próximos 10 e 50 anos as concentrações limiares de Zn no solo e nas águas que definem a toxidez serão ultrapassadas (MONTEIRO; LOFTS; BOXALL, 2010).



Diversos estudos relatam a capacidade de bactérias entéricas desenvolverem resistência ao Zn, sendo esta resistência frequentemente associada com a resistência das bactérias aos antibióticos, uma vez que os genes de resistência ao Zn podem estar também associados à resistência bacteriana aos antibióticos (BAKER-AUSTIN et al., 2006; HÖLZEL et al., 2012; SEILER; BERENDONK, 2012; YAZDANKHAH; RUDI; BERNHOFT, 2014). O desenvolvimento desta resistência está descrito sobretudo para as bactérias do gênero *Staphylococcus* e a *Escherichia coli*, mesmo na ausência do uso dos antibióticos no sistema de produção (BEDNORZ et al., 2013; CAVACO; HASMAN; AARESTRUP, 2011; YAZDANKHAH; RUDI; BERNHOFT, 2014).

Preocupada com os possíveis efeitos tóxicos e de indução de resistência bacteriana, a legislação europeia já limita a utilização de ZnO nas dietas de suínos em no máximo 150 mg de Zn/kg de ração (EUROPEAN COMMUNITIES, 2003), ou seja, limitando-se apenas a atender às exigências nutricionais de Zn dos suínos. Desta forma, outras formas de suplementação de ZnO de zinco vêm sendo estudadas, como por exemplo, o uso de Zn quelatado ou complexado com aminoácidos e o ZnO encapsulado (CASE; CARLSON, 2002; CARLSON et al., 2004; KIM et al., 2010).

#### **4.5 Óxido de zinco nanoparticulado**

Nanopartículas são partículas que apresentam dimensões menores que 100 nanômetros (nm). Quando comparadas às micropartículas, as nanopartículas apresentam uma maior área superficial específica e um maior número de partículas por unidade de massa, sendo que suas propriedades podem ser idênticas ou muito diferentes do material de origem (BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007; SIRELKHATIM et al., 2015).

Muitas reações químicas e biológicas ocorrem na superfície das nanopartículas e, assim, as nanopartículas tendem a ser muito mais reativas, sendo sua reatividade aumentada em cerca de 1000 vezes (BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007). Outra particularidade é que as nanopartículas se distribuem mais facilmente nos sistemas biológicos e atravessam com facilidade as barreiras biológicas como o intestino e os pulmões. Devido a esta capacidade, estas partículas podem entrar nas células, interagir com os componentes celulares e produzir danos irreversíveis como estresse oxidativo e lesões nas organelas. Dentre os efeitos tóxicos possíveis em função destas propriedades destacam-se as doenças respiratórias e neurodegenerativas, doenças autoimunes, formação de coágulos sanguíneos, arritmias e morte cardíaca e, enfermidades no fígado e rins. Cabe ressaltar que nem todas as nanopartículas são

tóxicas, sua toxicidade depende da sua composição química, forma, tamanho e tempo de exposição, sendo que quanto menor seu tamanho maior seu potencial de toxidez em virtude da facilidade de internalização e translocação (BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007).

Nanopartículas oriundas a partir de uma diversidade de composições químicas apresentam uma série de características desejáveis e são utilizadas nas áreas da medicina (no controle do diabetes e tratamento de cânceres), em cosméticos (como componente de protetores solar e cremes faciais), agricultura, automobilismo, transportes e telecomunicação, remediação ambiental e materiais de revestimentos (AKHTAR et al., 2012; HANLEY et al., 2008; PRASAD et al., 2012; RAHMAN; KADIRGAMA, 2014; SMIJS; PAVEL, 2011; UMRANI; PAKNIKAR, 2014).

O ZnO também é encontrado na forma de nanopartículas, sendo comumente utilizado na indústria química e farmacêutica (BECHERI et al., 2008; KHAN et al., 2008; RASMUSSEN et al., 2010). Comparado ao ZnO convencional, o ZnO nanoparticulado (ZnO-N) apresenta maior atividade química e antimicrobiana e maior taxa de absorção pelo organismo animal, devido ao seu menor tamanho de partícula e à maior área superficial específica (HOSEINZADEH et al., 2013; WANG et al., 2012a; ZHAO et al., 2014), que proporcionam maior reatividade (SIRELKHATIM et al., 2015). Estas propriedades despertam o interesse do uso do ZnO-N em substituição ao ZnO convencional utilizado na nutrição animal (ZHAO et al., 2014).

Na literatura, trabalhos *in vitro* relatam que os óxidos nanoparticulados como o ZnO-N, óxido de magnésio e óxido de cobre, utilizados em suspensão, apresentam efeito antimicrobiano contra várias bactérias, patogênicas ou não, tais como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (AKBAR; ANAL, 2014; APPLEROT et al., 2012; DUTTA et al., 2013; LIU et al., 2009; STOIMENOV et al., 2002), sendo sua atividade antimicrobiana mais potente contra bactérias Gram-positivas (como, por exemplo, *Staphylococcus aureus*) do que contra Gram-negativas (como, por exemplo, *Escherichia coli*) (EMAMI-KARVANI; CHEHRAZI, 2011; SAWAI, 2003). Dentre algumas vantagens da utilização de óxidos nanoparticulados estão a sua estabilidade, maior vida útil e maior área superficial para atuação, que garantem maior interação com os microrganismos (DUTTA et al., 2013).

Alguns mecanismos propostos para o efeito antimicrobiano incluem: a) a abrasividade da superfície das nanopartículas, que promove uma desorganização da parede celular da bactéria (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008); b) o acúmulo e a internalização celular das partículas de ZnO-N, que levam a deformações na parede celular das bactérias

(BRAYNER et al., 2006); c) a geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente peróxido de hidrogênio, na superfície das nanopartículas, que são potentes agentes oxidantes prejudiciais para as células bacterianas (LIPOVSKY et al., 2009); d) a liberação de íons  $Zn^{2+}$ , que promovem danos à membrana plasmática e interagem com os conteúdos intracelulares, promovendo perturbações na sua atividade (BRAYNER et al., 2006); e) a depleção dos níveis de trifosfato de adenosina (ATP), que é a principal forma de energia imediatamente utilizável pela célula bacteriana (BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007); f) e uma possível toxidez seletiva às bactérias patogênicas (REDDY et al., 2007).

A propriedade antimicrobiana do ZnO-N tem sido amplamente explorada em produtos ligados a alimentação humana (DUTTA et al., 2013; RAGHUPATHI; KOODALI; MANNA, 2011). Estas nanopartículas têm se demonstrado não tóxicas para as células humanas, o que possibilita sua utilização em produtos com a finalidade de nutrição humana (SIRELKHATIM et al., 2015). Por outro lado, o ZnO-N é utilizado como um agente antibacteriano nas embalagens dos alimentos, entrando em contato com a superfície dos alimentos onde promove a morte das bactérias potencialmente patogênicas, reduzindo a ocorrência das doenças de origem alimentar (SIRELKHATIM et al., 2015).

Poucos trabalhos avaliaram o efeito da inclusão de ZnO-N na saúde animal. Em ratos, os trabalhos se concentram nos estudos de toxicidade das nanopartículas de ZnO, tendo sido observado que doses acima de 500 e 1000mg de Zn/kg de peso vivo, já provocam pequenos efeitos tóxicos com elevação das concentrações plasmáticas de Zn, acúmulo de Zn nos rins, fígado e pulmões, nefrotoxicidade, inflamações no trato respiratório e estresse oxidativo nas membranas celulares (CHUNG et al., 2013; HONG et al., 2014; ROY; DAS; DWIVEDI, 2015; YAN et al., 2012).

Em frangos de corte, a suplementação de 20 a 60 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) melhora o desempenho e a capacidade antioxidante, sem apresentar efeitos tóxicos ou deletérios quando comparado ao ZnO convencional (AHMADI et al., 2014; ZHAO et al., 2014). São observados maior ganho de peso, menor consumo de alimento e melhor conversão alimentar, quando se compara a suplementação do ZnO-N em comparação ao ZnO comumente utilizado na nutrição animal (AHMADI et al., 2013; ZHAO et al., 2014). No soro sanguíneo e no tecido hepático, se observa maior atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase, e uma redução na concentração do composto orgânico malondialdeído, um importante índice indicador da peroxidação lipídica e dos danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ZHAO et al., 2014). Por outro lado, em suínos, na literatura são encontrados poucos trabalhos que envolvam os efeitos da

suplementação das nanopartículas de ZnO sobre a saúde e o desempenho animal e os mesmos não apresentam resultados concretos sobre sua eficácia (LI et al., 2016).



## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido na creche experimental do Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), localizada no município de Piracicaba, estado de São Paulo, Brasil. Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da ESALQ/USP, sendo aprovados sob o número de protocolo 2015-28.

### **5.1 Caracterização do óxido de zinco nanoparticulado**

O ZnO convencional e o ZnO-N foram caracterizados pelas técnicas de Difração de raios X (fases cristalinas presentes) e pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM-FEG) (forma, tamanho e distribuição). Todas as análises foram realizadas na Embrapa Instrumentação São Carlos – SP pelo acadêmico Bruno Mascarenhas, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Físico-Química da Universidade Federal de São Carlos, sob a supervisão da Dra. Elaine Cristina Paris, pesquisadora da Embrapa Instrumentação São Carlos.

#### **5.1.1 Difração de raio X (DRX)**

Os ensaios de difração de raio X (DRX) foram realizados em um equipamento Shimadzu XRD 6000, utilizando radiação Cu K $\alpha$ , para determinação das fases cristalinas obtidas. Variou-se  $2\theta$  de 5 a 85° com velocidade de 1°min<sup>-1</sup>, aplicando uma tensão de 30kV.

#### **5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG)**

Para a determinação de forma, tamanho e distribuição das partículas foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo, SEM-FEG (Scanning Electron Microscopy - Field Emission Gun), Jeol, modelo JSM-6701F. As amostras de ZnO foram dispersas em acetona por meio de ultrassom de ponteira, Branson, por 2 min em amplitude de 20%, em seguida, gotejadas em porta amostras previamente aquecidos e recobertos com tinta carbono.

## 5.2 Unidade de creche experimental

A sala de creche utilizada para condução do experimento é construída em alvenaria e possui 102,50 m<sup>2</sup> de área construída com pé direito de 2,85 m, com piso em concreto e cobertura de telhas de barro. As paredes possuem aberturas laterais para renovação do ar na instalação.

A sala é provida de 25 baias metálicas suspensas, dispostas em cinco fileiras contendo cinco baias cada. Cada baia apresenta área útil de 1,80 m<sup>2</sup> (1,20 x 1,50 m), onde a área logo abaixo ao bebedouro é composta por piso metálico vazado e a área adjacente ao comedouro e de aquecimento em concreto. O sistema de bebedouro consiste em chupetas e o comedouro é do tipo semiautomático. O controle de temperatura é realizado por um sistema manual de abertura e fechamento de cortinas e por um sistema de aquecimento composto por lâmpadas infravermelhas de 250 W, sendo a temperatura da sala registrada por meio de termômetros de temperatura máxima e mínima.

## 5.3 Ensaio piloto

Para definição dos níveis de suplementação de Zn, na forma de ZnO-N, utilizou-se como base um trabalho de Ahmadi et al. (2013), onde avaliou-se o efeito da suplementação de Zn, na forma de ZnO-N, no desempenho de frangos de corte, uma vez que, até o momento da condução deste experimento, não havia estudos com leitões recém-desmamados.

A partir dos dados de desempenho obtidos por Ahmadi et al. (2013), calculou-se o peso metabólico dos frangos de corte e o consumo de ZnO-N em função do peso metabólico. Elaborou-se então, uma equação quadrática a partir da qual estimou-se o nível ótimo de suplementação de ZnO-N para os frangos de corte.

Na sequência, realizou-se um levantamento nos trabalhos recentes de experimentos, Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado realizados na ESALQ/USP que tiveram como foco de pesquisa leitões recém-desmamados, obtendo-se dados de desempenho do 1° ao 21° dia pós-desmame. Com estas informações fez-se uma relação entre o consumo de ZnO-N/kg de peso metabólico dos frangos de corte e o consumo em relação ao peso metabólico dos leitões, definindo-se assim um nível de base a ser suplementado, a partir do qual foram definidos os demais níveis.

Passada a fase de definição dos níveis, realizou-se um ensaio piloto com duração de sete dias, onde se objetivou avaliar o efeito da suplementação de ZnO-N na dieta de leitões no período pós-desmame sobre o consumo de ração e verificar a ocorrência de possíveis efeitos tóxicos em função dos níveis suplementados. Foram utilizados 32 leitões, sendo 50% machos castrados e 50% fêmeas. Dos 32 leitões, 24 foram desmamados na ocasião do ensaio, aos 21 dias de idade, com aproximadamente  $6,06 \pm 1,41$  kg de peso vivo, e oito animais já haviam sido desmamados e estavam com aproximadamente 42 dias de idade e peso vivo médio de  $13,16 \pm 1,83$  kg.

Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental em blocos casualizados (definidos pela idade e peso inicial, sexo e ninhada), com quatro tratamentos, quatro repetições (blocos) por tratamento, e dois animais por unidade experimental (baia). Cada unidade experimental foi composta por um macho castrado e uma fêmea.

Foram testados quatro níveis de suplementação de Zn, na forma de ZnO-N, sendo a dieta basal dos animais suplementada *on top* com 0, 60, 120 ou 240 mg de ZnO-N/kg de ração, correspondendo a 0, 48, 96 ou 192 mg de Zn/kg de ração. A dieta basal (Tabela 1) foi formulada de acordo com as recomendações nutricionais para leitões na fase de creche (NRC, 2012), sendo similar a dieta Pré-inicial II do experimento.

## **5.4 Experimento**

### **5.4.1 Animais e delineamento experimental**

Foram utilizados 192 leitões híbridos comerciais, desmamados aos 21 dias, com aproximadamente  $5,90 \pm 0,82$  kg de peso vivo, sendo 50% machos castrados e 50% fêmeas. Os animais eram provenientes de uma granja comercial de suínos em sistema de ciclo completo localizada no município de Mogi Mirim, estado de São Paulo.

Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental em blocos completos casualizados com seis tratamentos, oito repetições (blocos) por tratamento, e quatro animais por unidade experimental (baia). Cada unidade experimental foi composta por dois machos castrados e duas fêmeas. Os blocos foram formados de acordo com o peso inicial e sexo dos animais.

A sala de creche foi lavada apenas com água antes do recebimento dos animais, não sendo utilizados desinfetantes químicos, visando propiciar um maior desafio sanitário aos leitões.



### 5.4.2 Dietas basais e tratamentos

As dietas experimentais foram confeccionadas na Fábrica de Ração do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Piracicaba – SP.

As dietas basais (Tabela 1), isonutritivas, comuns a todos os tratamentos, foram formuladas de acordo com as recomendações nutricionais para leitões na fase de creche (NRC, 2012). Foi utilizado um programa nutricional de três fases: pré-inicial I (1 a 7 dias de experimento), pré-inicial II (8 a 21 dias de experimento) e inicial (22 a 35 dias de experimento). Todas as dietas foram suplementadas com 100 mg de Zn/kg na forma de ZnO para atender às exigências de Zn dos leitões. Ração e água foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental de 35 dias.

Tabela 1 - Composição das dietas basais (matéria natural)

Item	Pré-inicial I	Pré-inicial II	Inicial
Ingredientes, %			
Milho	50,32	54,73	61,90
Farelo de soja, 46% PB	25,00	28,00	30,00
Soro de leite desidratado	13,52	6,76	0,00
Plasma sanguíneo desidratado	5,00	2,50	0,50
Açúcar	2,50	4,00	4,00
Óleo de soja	0,30	0,62	0,14
Fosfato bicálcico	1,08	1,14	1,05
Calcário calcítico	0,90	0,81	0,84
Sal	0,30	0,46	0,57
L-Lisina, 78%	0,46	0,42	0,44
DL-Metionina, 99%	0,19	0,16	0,15
L-Treonina, 98,5%	0,13	0,11	0,13
L-Valina, 98,5%	0,03	0,02	0,01
Premix mineral <sup>1</sup>	0,10	0,10	0,10
Premix vitamínico <sup>2</sup>	0,15	0,15	0,15
Antioxidante	0,02	0,02	0,02
Total, %	100,00	100,00	100,00
Composição calculada			
Energia metabolizável, kcal/kg	3349,69	3345,92	3303,22
Proteína bruta, %	21,79	20,74	19,93
Cálcio, %	0,80	0,75	0,70
Fósforo disponível, %	0,45	0,40	0,33
Lactose, %	10,00	5,00	0,00
Lisina digestível, %	1,50	1,35	1,25
Metionina + cistina digestível, %	0,82	0,74	0,69
Treonina digestível, %	0,88	0,79	0,74
Triptofano digestível, %	0,26	0,23	0,21
Valina digestível, %	0,95	0,86	0,79
Isoleucina digestível, %	0,77	0,74	0,70

<sup>1</sup>Fornecendo por kg da dieta: cobalto, 1 mg; cobre, 10 mg; ferro, 100 mg; iodo, 1,5 mg; manganês, 40 mg e zinco, 100 mg.

<sup>2</sup>Fornecendo por kg da dieta: vitamina A, 9000 UI; vitamina D<sub>3</sub>, 2250 UI; vitamina E, 22,5 UI; vitamina K<sub>3</sub>, 2,25 mg; ácido fólico, 0,9 mg; ácido pantotênico, 14 mg; biotina, 0,12 mg; cianocobalamina, 30 µg; niacina, 30 mg; piridoxina, 3 mg; riboflavina, 6 mg; selênio, 0,45 mg e tiamina, 2 mg.

Os tratamentos utilizados foram:

- Controle negativo - dieta basal;
- Controle positivo - dieta basal suplementada *on top* com 3000 mg de ZnO/kg de ração, equivalendo a 2400 mg de Zn/kg de ração.

Além desses tratamentos, foram testados quatro níveis de suplementação de Zn na forma de ZnO-N, sendo a dieta basal (Controle negativo) suplementada *on top* com 15, 30, 60 ou 120 mg de ZnO-N/kg de ração, correspondendo a 12, 24, 48 ou 96 mg de Zn/kg de ração.

Os leitões receberam as dietas experimentais, durante os primeiros 21 dias de experimento. Dos 22 aos 35 dias de experimento, todos os animais foram alimentados com uma dieta - com níveis basais de Zn - comum a todos os tratamentos para que fosse avaliado o efeito residual dos tratamentos sobre o desempenho dos animais.

#### **5.4.3 Desempenho**

Os animais foram pesados no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dia do período experimental para calcular o ganho diário de peso (GDP). Foram quantificadas as rações fornecidas e, ao final de cada fase, foi realizada a quantificação das sobras de ração para a determinação do consumo diário de ração (CDR) e da conversão alimentar (CA).

#### **5.4.4 Frequência da ocorrência de diarreia**

A presença (fezes líquidas) ou ausência (fezes normais) de diarreia foi avaliada por meio de observação visual de sinais de diarreia em cada animal. Diariamente, quantificou-se o número de animais com presença e ausência de diarreia em cada baia. Para cada baia, fez-se a média do número de observações indicando a presença de diarreia em relação ao número de animais na baia. A partir deste número, calculou-se a porcentagem de dias com diarreia no período experimental.

#### 5.4.5 Digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta

A fim de se avaliar o efeito da suplementação do ZnO-N sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta, foi utilizado o método de coleta parcial de fezes (SAKOMURA; ROSTAGNO, 2007), com a inclusão de 0,1% de óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) à dieta pré-inicial II, como indicador de indigestibilidade da dieta. A dieta com o marcador foi fornecida por um período de 14 dias, correspondendo aos dias oito a 21 do experimento.

Após o início do consumo da ração com marcador, foi fornecido um período de sete dias para manutenção do fluxo do indicador pelo trato digestório e, após, realizado a coleta de fezes por um período de sete dias. A coleta de fezes foi realizada duas vezes ao dia (manhã e tarde) diretamente do reto dos leitões (coleta realizada em pelo menos dois leitões por baía por coleta) e totalizou aproximadamente 500 gramas por baía.

Amostras de ração de cada tratamento foram coletadas no momento da confecção das mesmas, totalizando um quilo de amostra.

As fezes e as rações coletadas foram armazenadas em sacos plásticos a  $-18^\circ\text{C}$  até o momento da realização das análises bromatológicas.

Posteriormente, as amostras de fezes e rações foram enviadas ao Laboratório de Bromatologia e Minerais do Instituto de Zootecnia (IZ), Nova Odessa-SP, onde foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas, moídas e submetidas a análises para determinação dos teores de energia bruta, extrativo não nitrogenado, matéria mineral, matéria seca, e proteína bruta seguindo procedimentos descritos por Silva e Queiroz (2006).

A determinação dos teores do marcador óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) nas fezes e nas rações foi realizada por meio da técnica de fluorescência de raio-X com dispersão por comprimento de onda realizada em espectrofotômetro de dispersão por raio-X (SHIMADZU EDX-720) pela equipe técnica do Laboratório Multiusuário em Produção Vegetal do Departamento de Produção Vegetal (LPV) da ESALQ/USP, Piracicaba – SP, sob a supervisão do Dr. Tiago Tezotto.

A determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDap) da energia bruta, do extrativo não nitrogenado, da matéria mineral, da matéria seca, e da proteína bruta foi realizada utilizando a equação proposta por Matterson et al. (1965):

$$\text{CDap} = 100 - 100 \times \left( \frac{\% \text{ marcador na ração}}{\% \text{ marcador nas fezes}} \right) \times \left( \frac{\% \text{ nutrientes nas fezes}}{\% \text{ nutrientes na ração}} \right)$$

#### **5.4.6 Quantificação da excreção de zinco nas fezes**

A determinação dos teores de Zn nas rações foi realizada por meio da técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (310 - Perkin Elmer) enquanto que a determinação dos teores de Zn nas fezes foi realizada por meio da técnica de fluorescência de raio-X com dispersão por comprimento de onda realizada em espectrofotômetro de dispersão por raio-X (SHIMADZU EDX-720) pela equipe técnica do Laboratório Multiusuário em Produção Vegetal do Departamento de Produção Vegetal (LPV) da ESALQ/USP, Piracicaba – SP, sob a supervisão do Dr. Tiago Tezotto.

#### **5.4.7 Análises sanguíneas**

Para a realização das análises sanguíneas foi selecionado o macho castrado com peso vivo mais próximo a média de peso dos animais da baía.

Dois dias antes do abate, a coleta de sangue foi realizada por punção na veia cava anterior. O animal selecionado foi disposto em posição de decúbito dorsal sobre um suporte para coleta e teve a região de coleta limpa e desinfetada com algodão embebido em álcool 70%. A coleta foi realizada a vácuo utilizando agulha múltipla 25 X 0,8MM.

##### **5.4.7.1 Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)**

Realizou-se a coleta de 4 mL de sangue em um frasco de tampa vermelha (soro ativador de coagulação - VACUETTE) para a quantificação da atividade enzimática das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) a fim de determinar possíveis danos hepáticos no caso de efeitos tóxicos em virtude da suplementação do ZnO-N. As amostras coletadas foram mantidas sobre uma superfície de isopor por 20 minutos, em temperatura ambiente, para promover a coagulação do sangue.

As amostras coletadas foram embaladas e acondicionadas em caixa térmica e encaminhadas ao laboratório privado Animal Labor Especialidade Laboratoriais LTDA onde a atividade enzimática das enzimas ALT e AST foram quantificadas utilizando o método cinético automático (analisador químico BS – 120 Mindray).

#### **5.4.7.2 Concentração de zinco no plasma**

Uma amostra de 10 mL foi colhida em frascos de tampa verde contendo o anticoagulante Heparina sódica (VACUETTE). As amostras de plasma coletadas para quantificação dos níveis plasmáticos de Zn foram encaminhadas ao laboratório privado Animal Labor Especialidade Laboratoriais LTDA para separação do plasma sanguíneo e em seguida congeladas a -18°C em tubos plásticos para posterior análise.

A quantificação dos teores de Zn no plasma foi realizada pela equipe técnica do Laboratório Multiusuário em Produção Vegetal do Departamento de Produção Vegetal (LPV) da ESALQ/USP, Piracicaba – SP, sob a supervisão do Dr. Tiago Tezotto. Antes da quantificação, as amostras de plasma foram misturadas com ácido tricloroacético (TCA) 20% numa proporção de 1:1 e centrifugadas a 1020x g durante 15 minutos. Um ml do sobrenadante foi recolhido e diluído com 4 mL de HCl (0,6N) (REVVY et al., 2002). Para determinação dos teores de Zn no plasma foi utilizada a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (310 - Perkin Elmer).

#### **5.4.7.3 Hemograma**

Uma amostra de 4 mL de sangue foi colhida em frasco de tampa roxa contendo o anticoagulante K3EDTA (VACUETTE) para realização de hemograma. As amostras coletadas foram embaladas e acondicionadas em caixa térmica e encaminhadas ao laboratório privado Animal Labor Especialidade Laboratoriais LTDA onde o hemograma foi realizado utilizando o método automático (equipamento Cell dyn 3500 – ABBOTT).

O hemograma constou da avaliação de parâmetros da série vermelha (eritrócitos), da série branca (leucócitos) e da série plaquetária (plaquetas). A análise da série vermelha foi constituída pelas seguintes determinações: contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (V.c.m.), concentração da hemoglobina corpuscular média (C.h.c.m.), metarrubricitos e proteína total. A série branca foi analisada para os seguintes índices: contagem total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos (eosinófilos, basófilos, heterófilos, linfócitos típicos, células atípicas, mielócitos, metamielócitos, monócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados). A série plaquetária correspondeu à contagem de plaquetas.

#### **5.4.8 Morfometria e peso de órgãos**

No 21º dia do experimento, os animais utilizados para a coleta das amostras de sangue, foram insensibilizados por corrente elétrica e abatidos.

No momento do abate foram pesados o baço, estômago, fígado, intestino delgado e pâncreas e foram calculados o peso absoluto e o peso dos órgãos em relação ao peso vivo dos animais. Para pesagem, separou-se a vesícula biliar do fígado e procedeu-se o esvaziamento do estômago. Também se mediu o comprimento do intestino delgado para o cálculo da densidade do intestino, utilizando uma fita métrica afixada em uma mesa.

#### **5.4.9 Histologia do epitélio intestinal**

No animal abatido dos blocos 5, 6, 7 e 8, foi coletada uma amostra de 3 cm do duodeno (15 cm a partir da válvula pilórica) e uma amostra de 3 cm do jejuno (voltando 150 cm da junção ileocecal). As amostras foram lavadas em solução salina (0,85% de NaCl), fixadas em solução de formol tamponado neutro a 10% e, a partir destas, foram confeccionadas lâminas histológicas para mensuração da altura de vilosidade, profundidade de cripta e contagem do número de células caliciformes.

As lâminas foram confeccionadas no laboratório privado HISTOTECH Lâminas Didáticas, São Paulo – SP, sendo coradas pelo método PAS+ hematoxilina (AFIP, 1994), e na sequência levemente coradas pelo método eosina (AFIP, 1994), adaptado, para melhor visualização das vilosidades intestinais.

A partir destas, foram realizados registros de imagens utilizando um microscópio óptico (BELKIN 2000) com um sistema de análise de imagens acoplado. Posteriormente foram realizadas as mensurações propostas.

Para mensuração de altura de vilosidade e profundidade de cripta, utilizou-se o aumento de 10X e foram realizadas mensurações em 15 vilosidades e 15 criptas por lâmina. As mensurações foram realizadas no Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP com o auxílio da Dra. Débora Botéquio Moretti e da acadêmica de Engenharia Agrônômica, Caroline Batista dos Santos.

Para contagem de células caliciformes utilizou-se o aumento de 40X e foram realizadas contagens em 15 vilosidades e 15 criptas por lâmina.

#### 5.4.10 Contagem bacteriana

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” do Departamento de Genética da ESALQ/USP sob responsabilidade da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Caroline Quecine Verdi e auxílio do técnico de laboratório José Antônio da Silva.

Para contagem bacteriana foram coletadas, em tubos Falcon estéreis, amostras de 10 g de conteúdo intestinal do jejuno e ceco, sendo estas mantidas em refrigeração até o momento da cultura microbiológica.

Para a realização das culturas microbiológicas preparou-se a diluição  $10^{-1}$  onde 1 g de conteúdo intestinal foi pesado e submetido à diluição em 9 mL de solução salina 0,85% e homogeneizado em vortex por 30 segundos. A seguir, a partir da diluição  $10^{-1}$ , foram realizadas diluições seriadas até a diluição  $10^{-6}$  pipetando-se 100  $\mu$ L da solução anterior em *ependorfs* com 900  $\mu$ L de solução salina 85%. Estas diluições foram homogeneizadas por cerca de 10 segundos no vortex.

Uma alíquota de 100  $\mu$ L das diluições  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  foram semeadas por espalhamento em superfície em placas de Petri contendo meio de cultura específico preparado de acordo com as recomendações do fabricante.

Depois de semeadas as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e as colônias foram contadas de acordo com a coloração descrita para cada meio de cultura segundo recomendações do fabricante. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram transformadas em  $\log_{10}$  e convertidas de UFC/ $\mu$ L para UFC/mL.

##### 5.4.10.1 Contagem bacteriana total

As alíquotas das diluições foram semeadas em Agar Mueller-Hinton (KASVI). Este meio permite a determinação de colônias correspondentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* e *Escherichia coli*. Foi realizada a contagem das colônias com coloração branca correspondente ao gênero *Enterococcus*.

##### 5.4.10.2 Contagem de enterobactérias

As alíquotas das diluições foram semeadas pelo método de espalhamento de superfície em Agar Eosina Azul de Metileno (E.M.B. Levine - BD). Este meio permite o isolamento de

bactérias entéricas Gram-negativas e a diferenciação entre bactérias fermentadoras de lactose (colônias azul escuro para os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*. e *Escherichia coli*) e não fermentadoras de lactose (incolor para os gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas*). Foi realizada a contagem das colônias com coloração azul escuro com brilho verde metálico correspondente a bactéria *Escherichia coli*.

#### 5.4.10.3 Contagem de lactobacilos

As alíquotas das diluições foram semeadas em Agar MRS (BD). Este meio permite o cultivo, isolamento e contagem de colônias das bactérias do gênero *Lactobacillus* que apresentam a coloração branca.

#### 5.4.11 Análise estatística

Os dados foram submetidos a testes para verificação da adequação ao modelo linear e da não violação das pressuposições da análise de variância (aditividade do modelo, normalidade dos erros, homogeneidade das variâncias) e foram submetidos a análise da variância utilizando-se o procedimento MIXED do SAS<sup>®</sup> (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

Os dados de desempenho, frequência da ocorrência de diarreia, digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta, excreção de Zn nas fezes e matéria seca das fezes, foram analisados como um delineamento em blocos casualizados usando a baía como unidade experimental. O modelo matemático incluiu os efeitos fixos dos tratamentos, os efeitos aleatórios dos blocos e erro experimental, conforme segue:

$$Y(ij) = \mu + t(i) + b(j) + \varepsilon(ij), \text{ onde:}$$

$Y(ij)$  = variável resposta;  $\mu$  = média geral;  $t(i)$  = efeito fixo do  $i$ -ésimo tratamento ( $i = 1, \dots, 6$ );  $b(j)$  = efeito aleatório do  $j$ -ésimo bloco ( $j = 1, \dots, 8$ );  $\varepsilon(ij)$  = erro experimental, NID ( $0, \sigma^2$ ).

Os dados das análises sanguíneas, morfometria e peso de órgãos, histologia do epitélio intestinal e contagem bacteriana, foram analisados como um delineamento inteiramente casualizado, usando o peso vivo aos 21 dias como co-variável. O modelo matemático incluiu os efeitos fixos dos tratamentos e erro experimental, conforme segue:



$$Y(ij) = \mu + t(i) + \varepsilon(ij), \text{ onde:}$$

$Y(ij)$  = variável resposta;  $\mu$  = média geral;  $t(i)$  = efeito fixo do  $i$ -ésimo tratamento ( $i = 1, \dots, 6$ );  $\varepsilon(ij)$  = erro experimental, NID ( $0, \sigma^2$ ).

Valores de probabilidade foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

A análise de regressão polinomial com desdobramento dos graus de liberdade dos níveis de suplementação de 12, 24, 48 ou 96 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) em seus componentes individuais (linear, quadrático e cúbico) foi realizada. Contrastes ortogonais foram utilizados para comparar o tratamento controle positivo com cada um dos níveis de ZnO-N.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização do óxido de zinco nanoparticulado

Através da indexação dos picos do difratograma (Figura 1) é possível afirmar que as amostras não apresentaram presença de fase adicional e podem ser caracterizadas como hexagonal (Zincita) (CHEN et al., 2007), exibindo todos os picos referentes aos planos cristalográficos deste sistema.

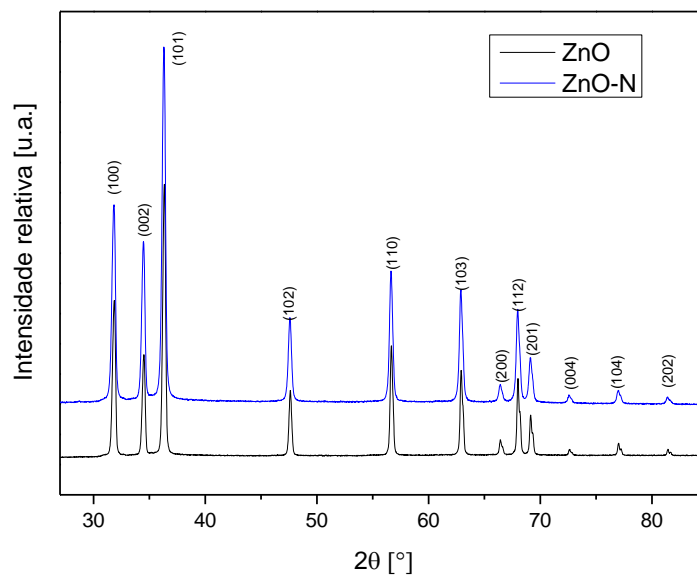


Figura 1 - Difração de Raios X para as amostras de ZnO

A avaliação estatística dos diâmetros do material, apresentada nos histogramas (Figuras 2 e 3), revela que, em média, o ZnO-N apresenta uma distribuição de tamanho de partículas menor se comparado ao ZnO convencional, apresentando o ZnO convencional tamanho médio de partícula de 150 nm e o ZnO-N, 70nm.

Quanto à forma dos materiais (Figuras 2 e 3), tanto o ZnO como o ZnO-N não apresentam um padrão morfológico definido, sendo encontradas partículas em formato de bastões alongados e de pseudoesferas em todas as amostras.

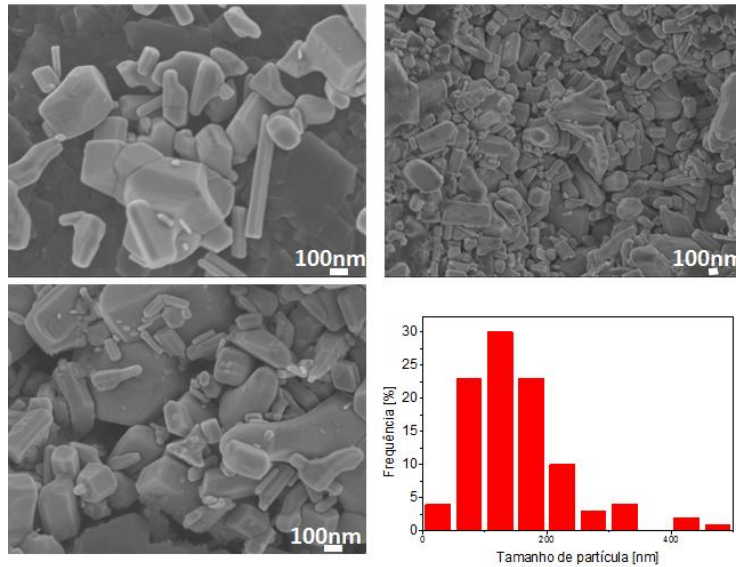


Figura 2 - Microscopia eletrônica e distribuição de tamanho das partículas do ZnO convencional

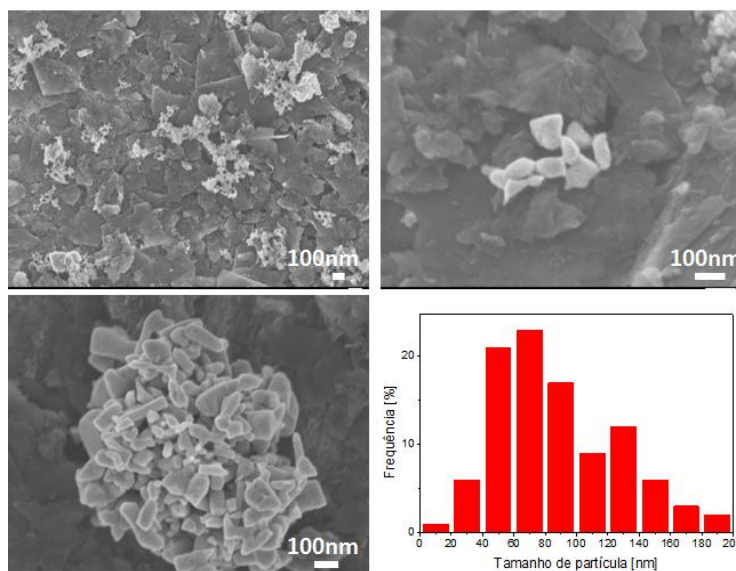


Figura 3 - Microscopia eletrônica e distribuição de tamanho das partículas do ZnO-N

## 6.2 Ensaio piloto

Os resultados para as variáveis de desempenho dos leitões obtidos no ensaio piloto estão apresentados na Tabela 2.

Não foram observados efeitos dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) ( $P > 0,05$ ) para as variáveis de peso vivo, GDP e CDR. Resultados semelhantes foram obtidos com a suplementação de níveis de 80 e 120 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO) e 120 mg de Zn/kg de ração, na forma de ZnO-N, na dieta de leitões recém-desmamados (LI et al., 2016).

Tabela 2 - Efeito da suplementação de níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre o desempenho zootécnico de leitões no pós-desmame durante o ensaio piloto<sup>1</sup>

Item	Tratamentos				EPM	P =
	Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg					
	0	48	96	192		
Peso vivo inicial, kg						
Dia 0	7,59	8,02	8,14	7,58	1,63	0,2091
Dia 7	10,59	10,94	10,65	11,07	0,33	0,4285
GDP, g/dia						
1 a 7 dias	394	443	402	462	0,04	0,4391
CDR, g/dia						
1 a 7 dias	621	695	723	705	0,05	0,2703

CDR = Consumo diário de ração; EPM = Erro padrão da média; GDP = Ganho diário de peso.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 4 repetições por tratamento e 2 leitões por baía.

Durante o ensaio piloto, não foram observados efeitos tóxicos nos animais, como por exemplo, redução no desempenho, artrites, problemas de pele, letargia e hemorragias, e nem a presença de animais refugos ou ocorrência de morte de leitões. Em ratos, sintomas anormais como fezes moles, feridas, diarreia, problemas de pele e opacidade do globo ocular foram observados, quando os animais foram suplementados diariamente com 500 mg de ZnO-N/kg de peso vivo por períodos acima de 90 dias. Nestas condições, não foram observados sinais de toxicidade aguda, como mortalidade, por exemplo, mas concluiu-se, que a ingestão de níveis diários de 500 mg de ZnO-N/kg de peso vivo, muito superiores aos suplementados neste experimento, pode induzir alguns efeitos tóxicos nos animais (CHUNG et al., 2013). Por outro lado, no presente ensaio piloto, os animais receberam a suplementação de Zn, na forma de ZnO-N, por apenas 7 dias, tempo que talvez não tenha sido o suficiente para possibilitar a manifestação de alguns efeitos tóxicos nos animais.

Outros estudos com ratos mostraram que doses diárias acima de 500 e 1000mg de Zn/kg de peso vivo (na forma de ZnO-N) provocam efeitos tóxicos com elevação das concentrações plasmáticas de Zn, acúmulo de Zn nos rins, fígado e pulmões, nefrotoxicidade, aumento da viscosidade sanguínea com riscos de trombose, inflamações no trato respiratório e estresse oxidativo nas membranas celulares (CHUNG et al., 2013; HONG et al., 2014; ROY; DAS; DWIVEDI, 2015; WANG et al., 2008; YAN et al., 2012).

Li et al. (2016) não observaram efeitos tóxicos da suplementação de 120 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) para leitões após o desmame. Por outro lado, níveis de ZnO-N acima de 100 mg/kg de ração provocaram toxicidade em frangos de corte com redução no ganho de peso, piora na conversão alimentar (AHMADI et al., 2013; ZHAO et al., 2014) e indícios de injúrias hepáticas associadas com o aumento do estresse oxidativo (ZHAO et al., 2014).

### 6.3 Experimento

Não foram utilizados antimicrobianos como melhoradores do desempenho nas dietas deste experimento, porém é importante salientar que, em função da alta ocorrência de diarreia nos animais, nos dias 7, 8 e 9 do experimento, foi realizada uma aplicação diária do antibiótico de amplo-espectro amoxicilina tri-hidratada via intramuscular, em todos os animais do experimento, na dosagem de 1 mL por animal.

Durante todo o experimento ocorreu a morte de quatro animais, sendo dois animais do controle negativo, tratamento que não recebeu a inclusão de Zn suplementar, um animal do tratamento que recebeu a suplementação de 48 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO) e um animal do tratamento que recebeu a suplementação de 96 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO).

#### 6.3.1 Desempenho

Os resultados para as variáveis de desempenho dos leitões, durante o período de 35 dias de experimentação, estão apresentados na Tabela 3. Não foram observados efeitos dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) ( $P>0,05$ ) para as variáveis peso vivo, GDP, CDR e CA dos animais.

No período de 1 a 7 dias, o controle negativo e a suplementação de 24 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) apresentaram menores peso vivo ( $P<0,03$ ), GDP ( $P<0,03$ ) e CDR ( $P<0,02$ ), quando comparado ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Foi observado, também, menor ( $P=0,04$ ) CDR dos animais que receberam 96 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) relação ao controle positivo. Estes resultados corroboram com estudos em que, na primeira semana após o desmame, doses farmacológicas de Zn, acima de 2000 mg de Zn/kg (na forma de ZnO), promoveram melhorias no desempenho dos animais quando comparadas a outras formas de suplementação de Zn que são fornecidas em menores níveis para os animais como, por exemplo, o ZnSO<sub>4</sub> (CASE; CARLSON, 2002; HILL et al., 2001; MAVROMICHALIS et al., 2000).

Tabela 3 - Efeito dos níveis Zn na dieta sobre o desempenho zootécnico de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	Tratamentos						EPM	P =
	2400 mg de Zn/kg	Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48	96		
Peso vivo inicial, kg	5,89	5,90	5,89	5,89	5,90	5,88	0,28	0,7692
Período de 1 a 7 dias de experimentação								
Peso vivo, kg	7,21	6,50 <sup>†</sup>	7,01	6,74 <sup>†</sup>	6,99	6,91	0,36	0,0180
GDP, g/dia	188	85 <sup>†</sup>	159	121 <sup>†</sup>	155	146	21,54	0,0150
CDR, g/dia	281	227 <sup>†</sup>	265	238 <sup>†</sup>	247	245 <sup>†</sup>	17,53	0,0379
CA	1,63	3,04	1,91	2,88	2,18	2,20	0,43	0,1052
Período de 1 a 21 dias de experimentação								
Peso vivo, kg	13,24	12,16	12,83	12,38	12,46	12,27	0,52	0,1192
GDP, g/dia	349	298	330	309	312	303	17,44	0,1149
CDR, g/dia	513	434 <sup>†</sup>	464 <sup>†</sup>	440 <sup>†</sup>	446 <sup>†</sup>	434 <sup>†</sup>	18,69	0,0013
CA	1,47	1,46	1,41	1,43	1,45	1,44	0,04	0,7644
Período de 1 a 35 dias de experimentação								
Peso vivo, kg	19,76	18,97	19,68	19,49	19,41	19,01	0,81	0,8632
GDP, g/dia	396	373	393	388	386	375	20,43	0,8615
CDR, g/dia	644	610	604	603	602	584	23,83	0,2628
CA	1,64	1,64	1,54	1,56	1,56	1,57	0,04	0,1380
Período de 21 a 35 dias de experimentação*								
GDP, g/dia	447	497	481	512	499	490	28,70	0,5716
CDR, g/dia	804	891	799	857	843	825	25,95	0,1258
CA	1,84	1,81	1,68	1,69	1,69	1,71	0,07	0,2721

Ca = Conversão alimentar; CDR = Consumo diário de ração; EPM = Erro padrão da média; GDP = Ganho diário de peso.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento e 4 leitões por baía dos 1 aos 21 dias e 3 leitões por baía dos 21 aos 35 dias.

\*Peso vivo do dia 21 utilizado como co-variável.

<sup>†</sup>Diferente do controle positivo (2400 mg de Zn/kg como ZnO convencional) pelo teste de contraste ortogonal (P<0,05).

Numericamente, foi observada uma piora na CA quando se comparou o controle negativo e os níveis de Zn (na forma de ZnO-N) com o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Houve uma grande variabilidade nos dados obtidos neste período, 9,7% dos leitões perderam peso, o que resultou em um coeficiente de variação de 58,50% para a CA. Resultados semelhantes foram observados por Broom et al. (2006), que obtiveram valores de conversão alimentar de 1,68 para os animais que receberam dietas contendo 3100 mg de ZnO/kg e valores de 3,10 para os leitões que não receberam a suplementação de ZnO.

No período de 1 a 21 dias, foi observado um menor CDR (P<0,02) para o controle negativo e para os níveis de Zn (na forma de ZnO-N) em comparação ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Estes resultados corroboram com a afirmação de que o efeito de doses farmacológicas de Zn (na forma de ZnO) como melhorador de desempenho está associado a um aumento no consumo de ração pelos leitões no pós-desmame (HILL et al., 2001). Sendo assim, os níveis de Zn (na forma de ZnO-N)

suplementados neste experimento, não foram eficientes como melhoradores do desempenho de leitões no período de 1 a 21 dias após o desmame, sugerindo que as propriedades químicas e físicas conferidas pela forma nanoparticulada não promoveram um aumento no poder de ação do ZnO.

Para o período de 21 a 35 dias, quando todos os animais foram alimentados com a mesma dieta, sem a inclusão de Zn suplementar, não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) para as variáveis peso vivo, GDP, CDR e CA. Estes resultados podem indicar que os animais recuperaram o *déficit* no desempenho observado no período de 1 a 7 dias de experimentação, uma vez que, numericamente, foi observado um maior ganho de peso e consumo de alimento e uma melhor conversão alimentar no período de 21 a 35 dias para o controle negativo e os níveis de Zn (na forma de ZnO-N).

No período de 1 aos 35 dias, não foram observadas diferenças significativas para as variáveis peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar ( $P>0,05$ ), de forma semelhante ao observado nos trabalhos de Case e Carlson (2002); Hill, Mahan e Jolliff (2014) e Poulsen (1995), onde se comparou a suplementação de diferentes níveis de Zn na forma inorgânica. Li et al. (2016), suplementando 80 e 120 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO, 250000 nm) e 120 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N, 142 nm), durante um período de 45 dias após o pós-desmame, também não observaram diferenças significativas para o peso final, GDP, CDR e CA dos animais.

Embora não tenham sido observados efeitos sobre o desempenho no período de 1 a 35 dias, os animais do controle negativo apresentaram um peso vivo final 0,79 kg menor do que os animais do controle positivo. Por sua vez, os animais que receberam a suplementação de Zn, na forma de ZnO-N, apresentaram um peso vivo final médio 0,36 kg menor do que os animais do controle positivo. Isto ressalta a capacidade de 2400 mg de Zn (na forma de ZnO) como melhorador de desempenho. Analisando ainda o período total de experimentação, observou-se, numericamente, uma redução no peso vivo, GDP e CDR e uma piora na CA conforme o aumento nos níveis de suplementação de Zn (na forma de ZnO-N), o que reforça a ideia de que, quanto maior o nível suplementado de Zn, na forma de ZnO-N, maior prejuízo ao desempenho é observado, com possível ocorrência de toxicidade (AHMADI et al., 2013; CHUNG et al., 2013; HONG et al., 2014; ROY; DAS; DWIVEDI, 2015; WANG et al., 2008; YAN et al., 2012; ZHAO et al., 2014).

### 6.3.2 Frequência da ocorrência de diarreia

Os resultados para a frequência da ocorrência de diarreia nos leitões, durante o período de 35 dias de experimentação, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a frequência da ocorrência de diarreia de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	Tratamentos					EPM	P =
	2400 mg de Zn/kg	Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg					
		0	12	24	48	96	
Frequência de diarreia, %							
1 a 7 dias <sup>2</sup>	6,24	37,94 <sup>†</sup>	23,66 <sup>†</sup>	27,23 <sup>†</sup>	20,53 <sup>†</sup>	24,55 <sup>†</sup>	4,23 <0,0001
1 a 21 dias	3,86	24,60 <sup>†</sup>	22,91 <sup>†</sup>	25,14 <sup>†</sup>	20,68 <sup>†</sup>	19,34 <sup>†</sup>	3,38 <0,0001
1 a 35 dias	4,46	16,25 <sup>†</sup>	16,42 <sup>†</sup>	17,55 <sup>†</sup>	15,68 <sup>†</sup>	16,29 <sup>†</sup>	2,38 0,0016
21 a 35 dias	5,35	3,72	6,69	6,17	8,18	6,47	2,41 0,8483

EPM = Erro padrão da média.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento e 4 leitões por baia.

<sup>2</sup>Efeito quadrático (P<0,05) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a frequência da ocorrência de diarreia.

<sup>†</sup>Diferente do controle positivo (2400 mg de Zn/kg como ZnO convencional) pelo teste de contraste ortogonal (P<0,05).

Frequência de diarreia de 1 a 7 dias =  $0,0044*x^2 - 0,5299*x + 35,078$ ,  $R^2=0,7386$ .

Foi observado um efeito quadrático (P=0,0164) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a frequência da ocorrência de diarreia entre os dias 1 e 7 de experimentação (Figura 4). O aumento do nível de Zn (na forma de ZnO-N) proporcionou uma redução na diarreia até o nível de 57,21 mg de Zn/kg de ração, com a mínima frequência da ocorrência da diarreia de 19,16%. Não há uma explicação concreta para o efeito quadrático dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a frequência da ocorrência de diarreia neste estudo. Por outro lado, não foram observados efeitos (P>0,05) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a frequência da ocorrência de diarreia entre os dias 1 e 21 de experimentação.

No período de 1 a 7 dias bem como no período total de 1 a 21 dias, os leitões do controle negativo e os que receberam a dieta suplementada com qualquer nível de Zn (na forma de ZnO-N) apresentaram maior (P<0,01) frequência na ocorrência de diarreia em comparação ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg na forma de ZnO). Esta é uma indicação de que os níveis de Zn, na forma de ZnO-N, não foram efetivos no controle da ocorrência de diarreia nos leitões nas primeiras três semanas após o desmame, período no qual os animais são mais susceptíveis à sua ocorrência e severidade. Estudos relatam que a suplementação de doses farmacológicas de Zn (na forma de ZnO), reduz a frequência da ocorrência da diarreia em leitões após o desmame, quando comparada a suplementação de Zn (na forma de ZnO) em



menores níveis (MEI; ZHI-SHENG; AN-GUO, 2009; MUNIZ et al., 2010; OU et al., 2007; POULSEN, 1995; TRCKOVA, et al., 2015).

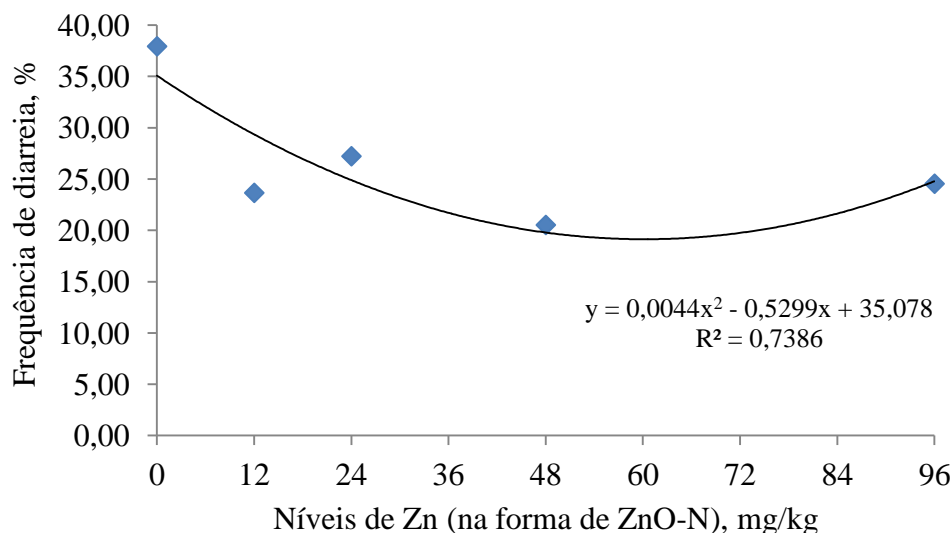


Figura 4 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a frequência da ocorrência de diarreia no período de 1 a 7 dias de experimentação

No período de 21 a 35 dias, quando todos os animais foram alimentados com a mesma dieta, sem a inclusão de Zn suplementar, não foram observados efeitos dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) sobre a frequência da ocorrência de diarreia. Estudos relatam uma maior frequência da ocorrência da diarreia entre o 4º e o 9º dia após o desmame, com uma redução natural em duas ou três semanas após o desmame (BALL; AHERNE, 1987; FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005; MADEC et al., 1998; PARTANEN et al., 2007). Estes estudos sugerem que cerca de duas semanas são necessárias para que o trato gastrintestinal dos leitões se adapte ao consumo de alimentos sólidos, a imunidade ativa dos leitões se estabeleça e, de forma geral, este é o tempo suficiente para os animais se adaptarem às novas condições ambientais que eram consideradas estressantes no momento do desmame (BALL; AHERNE, 1987).

Outra explicação, que corrobora com a redução na frequência da ocorrência da diarreia ao longo do tempo, é o momento em que a *Escherichia coli* atua no intestino causando diarreia. Relata-se que a *Escherichia coli* F4 provoca diarreia nos leitões nos primeiros dias após o desmame, ao passo que a *Escherichia coli* F18 provoca diarreia entre 5 e 14 dias após o desmame (SVENDSEN et al.; 1974 apud PARTANEN et al., 2007).

Não foram observados efeitos dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) ( $P > 0,05$ ) sobre a frequência da ocorrência de diarreia entre os dias 1 e 35 de experimentação. Neste período, os

leitões do controle negativo e os que receberam a suplementação de qualquer um dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) apresentaram maior ( $P<0,01$ ) frequência na ocorrência de diarreia quando comparado ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO).

### 6.3.3 Concentração de matéria seca e excreção de zinco nas fezes

Os resultados para a concentração de matéria seca e para a excreção de Zn nas fezes dos leitões na fase pré-inicial II do experimento, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a concentração de matéria seca e a excreção de zinco nas fezes de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	2400 mg de Zn/kg	Tratamentos					EPM	P =
		Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48	96		
Matéria seca, %	21,46	24,36 <sup>†</sup>	24,10 <sup>†</sup>	23,41 <sup>†</sup>	25,07 <sup>†</sup>	23,56 <sup>†</sup>	0,64	0,0074
Zinco, mg/kg MS	10744,00	578,55 <sup>†</sup>	685,81 <sup>†</sup>	747,15 <sup>†</sup>	913,44 <sup>†</sup>	1043,94 <sup>†</sup>	212,35	<0,0001

EPM = Erro padrão da média.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento e 4 leitões por baía.

<sup>†</sup>Diferente do controle positivo (2400 mg de Zn/kg como ZnO convencional) pelo teste de contraste ortogonal ( $P<0,05$ ).

Não foram observados efeitos ( $P>0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a concentração de matéria seca das fezes. Por outro lado, observou-se uma maior ( $P<0,0001$ ) concentração de matéria seca das fezes, para o controle negativo e para qualquer um dos níveis de suplementação de Zn (na forma de ZnO-N), em comparação ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Estes resultados diferem dos resultados encontrados na literatura nos quais não se observaram diferenças entre a suplementação de níveis basais e farmacológicos de Zn (JANCZYK et al., 2015; WALK; WILCOCK; MAGOWAN, 2015). Contudo, a concentração de matéria seca nas fezes dos animais do tratamento controle positivo (21,46%) foi inferior àquela divulgada na literatura (24,60%) (JANCZYK et al., 2015; WALK; WILCOCK; MAGOWAN, 2015).

Alterações na concentração de matéria seca nas fezes estão associadas à ocorrência de diarreia nos animais. Nos quadros de diarreia, ocorre uma redução na absorção de  $\text{Na}^+$  nas vilosidades intestinais e um aumento na secreção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas criptas intestinais, o que resulta em um acúmulo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no lúmen intestinal, gerando um gradiente osmótico para a difusão de água ao longo do intestino. O  $\text{Zn}^{2+}$  exerce um efeito direto no fluxo de água e íons através do trato gastrointestinal. Os íons  $\text{Zn}^{2+}$  bloqueiam os canais de  $\text{K}^+$  que regulam o fluxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , inibindo a secreção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  para o lúmen intestinal o que reduz o fluxo

de água e íons ao longo do trato gastrintestinal inibindo o processo diarreico (CANANI et al., 2010; FIELD, 2003; HOQUE; RAJENDRAN; BINDER, 2005). Por consequência, este efeito do  $Zn^{2+}$  sobre o fluxo de água e íons ao longo do trato gastrintestinal, também promove a redução na concentração de água nas fezes resultando num maior teor de matéria seca nas fezes (WALK; WILCOCK; MAGOWAN, 2015).

Estes resultados, contudo, são contrários aos resultados apresentados na literatura. Os leitões dos tratamentos que apresentaram uma maior concentração de matéria seca nas fezes apresentaram uma maior frequência da ocorrência de diarreia no período de 1 a 21 dias de experimentação.

Não foram observados efeitos ( $P>0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a excreção de Zn nas fezes. Observa-se uma tendência de efeito linear ( $P=0,0962$ ), na excreção de Zn nas fezes, conforme o aumento de dos níveis de Zn suplementados. Estes resultados corroboram com resultados de outros trabalhos que obtiveram aumentos na excreção de Zn, conforme o aumento da quantidade suplementada de Zn, independentemente da fonte de Zn utilizada, seja ela orgânica ou inorgânica (BUFF et al., 2005; CASE; CARLSON, 2002; POULSEN; LARSEN, 1995; REVY et al., 2002).

Observaram menores ( $P<0,0001$ ) excreções de Zn/kg de matéria seca para o tratamento controle negativo e para todos os níveis de suplementação de Zn (na forma de ZnO-N), quando comparados ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). A excreção de Zn nas fezes de suínos alimentados com níveis de até 500 mg de Zn/kg corresponde entre 6 e 24% da excreção de Zn nas fezes de animais suplementados com doses farmacológicas de Zn (CASE; CARLSON, 2002). Neste trabalho, a excreção de Zn nas fezes dos leitões, que receberam a suplementação dos níveis de Zn (na forma de ZnO), correspondeu, em média, a 7% da excreção de Zn nos animais do controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO).

A homeostase do Zn no organismo envolve mecanismos de ajustes na absorção e na excreção de Zn, sendo que as alterações na excreção de Zn ocorrem antes da regulação na absorção (KING; SHAMES; WOODHOUSE, 2000). As fezes são a maior rota de excreção de Zn nos suínos, enquanto que a excreção urinária é limitada em cerca de 1 mg de Zn/dia. A excreção de Zn via fezes é dependente da quantidade de Zn no alimento ingerido, sendo que quanto maior a quantidade de Zn ingerida, maior a quantidade de Zn excretada, ao passo que a quantidade de Zn excretada na urina não se altera com a quantidade de Zn ingerida (POULSEN; LARSEN, 1995). Em situações de elevado consumo de Zn, as fezes são a principal via de excreção do Zn endógeno, sendo importante para a manutenção do equilíbrio

do Zn no organismo, evitando, assim, a ocorrência de toxidez (KING; SHAMES; WOODHOUSE, 2000).

Embora neste experimento a suplementação de 2400 mg de Zn/kg (na forma de ZnO convencional) tenha sido mais eficiente no desempenho dos animais, os menores níveis de Zn utilizados trouxeram benefícios para reduzir a quantidade de Zn excretada via fezes. Estes resultados são muito importantes do ponto de vista ambiental. Como a concentração de animais é grande nas unidades industriais de produção de suínos, há um acúmulo de grande quantidade de dejetos numa mesma área, o que resulta numa limitação na capacidade de suporte de nutrientes pelas terras de cultivo próximas a estas unidades de produção. Isto é mais grave quando doses farmacológicas de Zn são utilizadas, uma vez que resultam em uma maior concentração deste mineral nos dejetos suínos e, conseqüentemente, um acúmulo de Zn no solo (BRUGGER; WINDISCH, 2015; BUFF et al., 2005; L'HERROUX et al., 1997). Grandes acúmulos de Zn no solo podem se tornar tóxicos aos microrganismos do solo e causar a contaminação de rios, lagos e das águas subterrâneas (ASADA et al., 2010; HSU; LO, 2001; MOFFETT et al., 2003), trazendo riscos à saúde dos animais e ao homem devido à possibilidade de ingestão excessiva de Zn via água e alimentos (NICHOLSON et al., 2003).

Uma outra preocupação é que a suplementação de Zn na dieta animal possibilita o desenvolvimento de resistência microbiana da microbiota intestinal. Estudos indicam que a suplementação de Zn tem uma elevada relação com a taxa de resistência microbiana em isolados intestinais de *Escherichia coli* (BEDNORZ et al., 2013; VAHJEN et al., 2015) e *Staphylococcus aureus* (CAVACO; HASMAN; AARESTRUP, 2011), bem como em cepas presentes nos dejetos suínos (HÖLZEL et al., 2012). Foram relatadas associações entre o Zn e a resistência bacteriana à ampicilina, tetraciclina e sulfonamidas (BEDNORZ et al., 2013; HÖLZEL et al., 2012). Isto gera uma preocupação devido à possibilidade de transferência das bactérias resistentes para os humanos pelo consumo de produtos de origem animal e também devido ao uso destes antibióticos na medicina animal e humana.

A legislação europeia já limita a utilização de ZnO nas dietas de suínos em no máximo 150 mg de Zn/kg de ração, visando atender às exigências metabólicas de Zn (EUROPEAN COMMUNITIES, 2003). Acredita-se que no futuro haverá uma redução ainda maior nos limites máximos de Zn permitidos nos alimentos, visando atender às concentrações seguras deste mineral nos dejetos suínos, que variam de 200 a 450 mg de Zn/kg de matéria seca de dejetos (BRUGGER; WINDISCH, 2015).

Todas estas implicações demonstram a importância da busca por fontes alternativas de suplementação de Zn que maximizem o desempenho animal e resultem numa menor excreção de Zn para o ambiente.

### 6.3.4 Digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia bruta

Os resultados para a digestibilidade aparente dos nutrientes (extrativo não nitrogenado, matéria mineral, matéria seca e proteína bruta) e da energia bruta, referente à dieta pré-inicial II, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	Tratamentos						EPM	P =
	2400 mg de Zn/kg	Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48	96		
Energia bruta, % <sup>2</sup>	77,29	72,67	77,02	77,65	80,27	79,79	1,23	0,0010
Extrativo não nitrogenado, % <sup>2</sup>	89,35	87,62	88,92	89,32	90,46	90,45	0,60	0,0189
Matéria mineral, %	47,39	47,08	49,00	50,65	53,56	52,17	2,19	0,1700
Matéria seca, % <sup>2</sup>	79,28	76,42	79,13	79,86	81,50	81,12	1,03	0,0121
Proteína bruta, % <sup>2</sup>	70,29	65,95 <sup>†</sup>	70,26	72,50	74,31	73,25	1,53	0,0024

EPM = Erro padrão da média.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento e 4 leitões por baia.

<sup>2</sup>Efeito linear ( $P < 0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a histologia do epitélio intestinal de leitões recém-desmamados.

<sup>†</sup>Diferente do controle positivo (2400 mg de Zn/kg como ZnO convencional) pelo teste de contraste ortogonal ( $P < 0,05$ ).

Digestibilidade aparente da energia bruta =  $0,0615x + 75,266$ ,  $R^2 = 0,5975$ .

Digestibilidade aparente do extrativo não nitrogenado =  $0,0264x + 88,41$ ,  $R^2 = 0,7166$ .

Digestibilidade aparente da matéria seca =  $0,0411x + 78,13$ ,  $R^2 = 0,5961$ .

Digestibilidade aparente da proteína bruta =  $0,0619x + 69,03$ ,  $R^2 = 0,5012$ .

O aumento dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) aumentou linearmente ( $P < 0,01$ ) a digestibilidade aparente da energia bruta (Figura 5), do extrativo não nitrogenado (Figura 6), da matéria seca (Figura 7) e da proteína bruta da dieta (Figura 8). O aumento dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) não afetou ( $P > 0,05$ ) a digestibilidade aparente da matéria mineral da dieta.

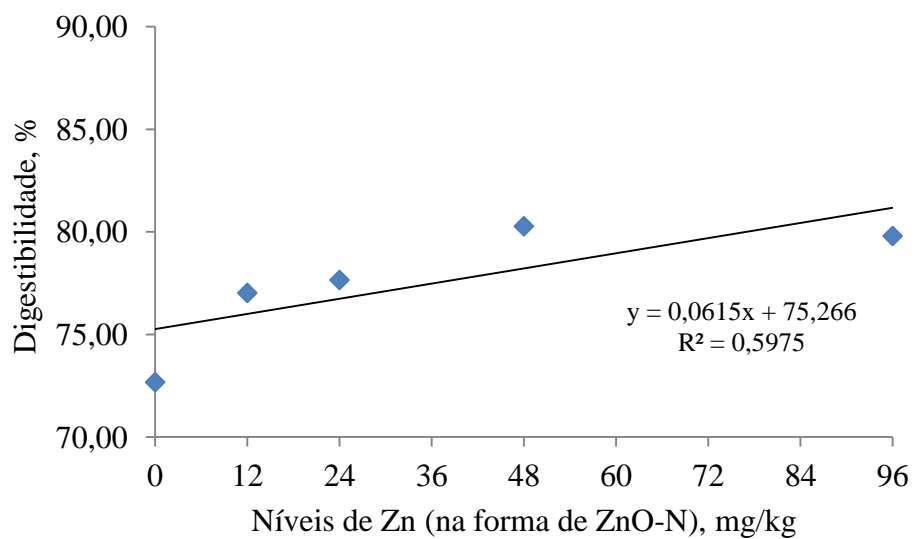


Figura 5 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a digestibilidade aparente da energia bruta da dieta pré-inicial II

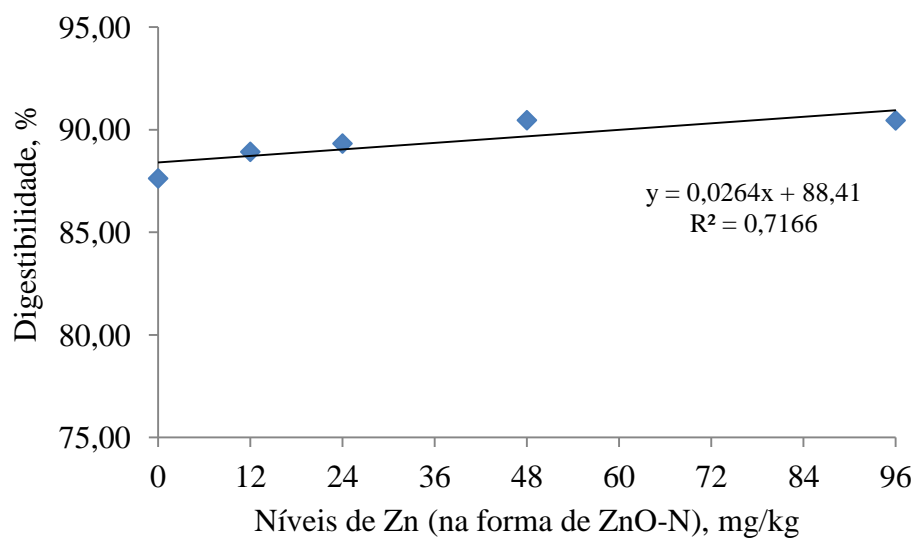


Figura 6 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a digestibilidade aparente do extrativo não nitrogenado da dieta pré-inicial II

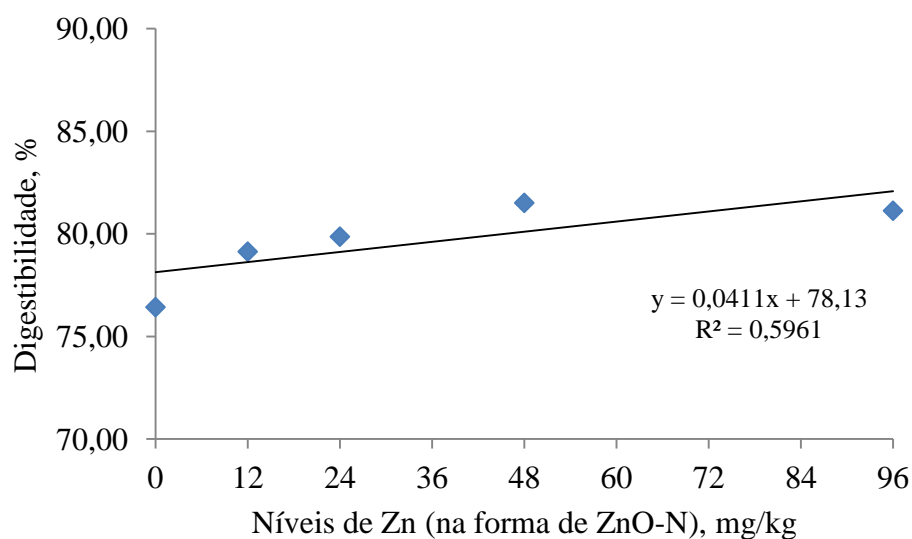


Figura 7 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a digestibilidade aparente da matéria seca da dieta pré-inicial II

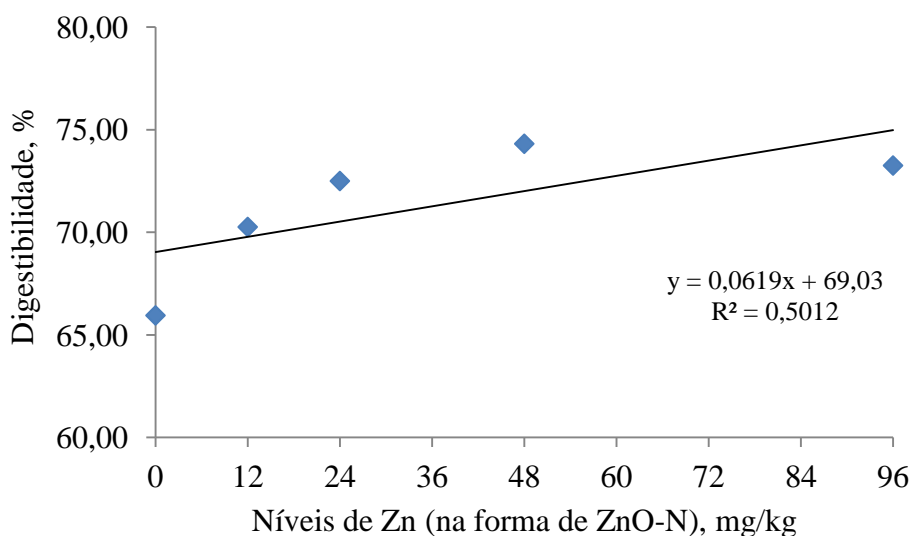


Figura 8 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a digestibilidade aparente da proteína bruta da dieta pré-inicial II

Foi observada uma menor digestibilidade aparente da energia bruta ( $P=0,0091$ ) e da proteína bruta ( $P=0,0359$ ), e uma tendência de menor digestibilidade aparente da matéria seca ( $P=0,0517$ ) e do extrativo não nitrogenado ( $P=0,0512$ ) da dieta quando se comparou o tratamento controle negativo com o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Estes resultados corroboram com a afirmação de que a suplementação de Zn na dieta de leitões, além do requerido para o atendimento das necessidades metabólicas, tem o

potencial de promover uma melhor digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta, devido às melhorias observadas na estrutura do epitélio intestinal, o que, por consequência, pode aumentar a atividade das enzimas da borda em escova e propiciar melhores digestão e absorção de nutrientes (BOSI et al., 2003; CARLSON; POULSEN; VESTERGAARD, 2004; LI et al., 2001).

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para a digestibilidade aparente da energia bruta, do extrativo não nitrogenado, da matéria mineral, da matéria seca e da proteína bruta da dieta, quando se comparou o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO) com a suplementação dos níveis de 12, 24, 48 e 96 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N). De forma semelhante, ao comparar a suplementação de níveis farmacológicos e menores níveis de Zn suplementados, Han e Thacker (2009) (comparando a suplementação de Zn na forma de ZnSO<sub>4</sub> e ZnO) e Li et al. (2016) (comparando a suplementação de Zn na forma de ZnO-N e ZnO) não observaram diferenças na digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta.

Embora tenha sido observado um aumento linear na digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta conforme o aumento dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N), os resultados parecem indicar que o ganho na melhoria da digestibilidade neste estudo está associada à suplementação de Zn para os animais, mas não à forma de Zn utilizada e nem a um nível ideal de Zn, pois, estatisticamente, não foi possível definir o nível de Zn suplementado que proporcionou uma maior digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta, uma vez que os níveis de Zn (na forma de ZnO-N) resultaram em digestibilidades estatisticamente semelhantes ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO).

É importante lembrar que os leitões que consumiram as dietas contendo qualquer um dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) apresentaram uma maior frequência na ocorrência de diarreia no período de 1 a 21 dias de experimentação. Embora a digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta esteja negativamente correlacionada com a incidência e a severidade da diarreia (BALL; AHERNET, 1987), estes resultados podem indicar que a suplementação de Zn (na forma de ZnO-N) pode minimizar os efeitos negativos da diarreia sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta.

A suplementação de Zn (na forma de ZnO-N) minimizou os efeitos da diarreia sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da dieta, uma vez que os resultados de digestibilidade para os tratamentos com uma maior frequência na ocorrência de diarreia foram semelhantes ( $P>0,05$ ) e, por vezes, numericamente superiores à digestibilidade para o tratamento controle positivo.



### 6.3.5 Análises sanguíneas

#### 6.3.5.1 Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e concentração de zinco no plasma

Os resultados para os valores médios de atividade enzimática sérica de ALT e AST e a concentração de Zn no plasma estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre os valores médios de atividade enzimática sérica de ALT e AST e a concentração de zinco no plasma de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	Tratamentos						EPM	P =
	2400 mg de Zn/kg	Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48	96		
ALT, U/L*	39,30	29,76	29,80	30,86	34,01	32,24	2,33	0,0567
AST, U/L*	82,43	76,11	67,27	68,12	78,79	67,75	5,61	0,2576
Zn no plasma, mg/L* <sup>2</sup>	2,37	1,39 <sup>†</sup>	1,04 <sup>†</sup>	1,09 <sup>†</sup>	0,85 <sup>†</sup>	1,72	0,27	0,0049

ALT = Alanina aminotransferase; AST = Aspartato aminotransferase; EPM = Erro padrão da média.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento.

\*Peso vivo do dia 21 utilizado como co-variável.

<sup>2</sup>Efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre os níveis plasmáticos de zinco de leitões recém-desmamados.

<sup>†</sup>Diferente do controle positivo (2400 mg de Zn/kg como ZnO convencional) pelo teste de contraste ortogonal ( $P < 0,05$ ).

Concentração plasmática de Zn =  $0,0003x^2 - 0,0234x + 1,3729$ ,  $R^2 = 0,9468$ .

Não foram observados efeitos ( $P > 0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a atividade enzimática sérica de ALT e AST, de forma semelhante ao descrito por Ahmadi et al. (2014), quando níveis entre 0 e 120 mg de Zn/kg de ração, na forma de ZnO-N, foram suplementados na dieta de frangos de corte durante 21 dias.

Em um estudo com ratos, observou-se um efeito dose-dependente inverso na atividade de ALT e AST, quando níveis entre 5 a 2000 mg de ZnO-N/kg de peso vivo foram suplementados diariamente para ratos (PASUPULETI et al., 2012). Neste estudo as atividades das enzimas ALT e AST também diminuíram conforme o aumento do nível de Zn (na forma de ZnO-N).

Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para a atividade de ALT e AST quando se comparou o controle negativo e os níveis de Zn (na forma de ZnO-N) com o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Houve apenas uma tendência ( $P < 0,10$ ) da atividade de ALT ser menor nos animais suplementados com os níveis

de Zn (na forma de ZnO-N) em comparação aos animais suplementados do controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). As atividades de ALT (29,68 a 39,00 U/L) e AST (66,87 a 81,43 U/L), obtidas neste estudo, situam-se dentro da faixa normal para leitões desmamados, citada por Friendship et al. (1984), que varia de 8 a 46 U/L para ALT, e de 21 a 94 U/L para AST.

A magnitude da alteração das atividades séricas de ALT e AST pode ser classificada de acordo com os valores de referência estabelecidos e irão refletir o grau de injúria hepática (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; WOLF, 1999). A classificação pode ser definida como leve (atividade até três vezes o valor de referência), moderada (entre três e 20 vezes o valor de referência) ou severa (atividade maior que 20 vezes o valor de referência) (THAPA; WALIA, 2007; WOLF, 1999). Desta forma, as atividades de ALT e AST obtidas neste estudo, indicam a não ocorrência de injúrias hepáticas em função da ingestão dos níveis de Zn suplementados.

Os resultados obtidos neste experimento corroboram com outros estudos científicos onde foram observadas atividades enzimáticas médias de ALT entre 22,46 U/L e 47,87 U/L, e de AST entre 13,69 U/L e 68,77 U/L, quando níveis de 0 a 4500 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO) foram suplementados nas dietas de leitões após o desmame (ARANTES et al., 2007; MEI; ZHI-SHENG; AN-GUO, 2009; WANG et al., 2012b). No entanto, apesar dos valores de AST do presente experimento situarem-se dentro da faixa normal de atividade para leitões desmamados, os valores encontram-se acima dos valores apresentados nos citados estudos. Por outro lado, em ratos, o consumo de dietas contendo Zn na forma de ZnO-N resultou em maior atividade enzimática de ALT e AST em comparação a dietas contendo Zn em outras formas, como por exemplo, na forma de ZnO microparticulado (MANSOURI et al., 2015; PASUPULETI et al., 2012).

Foi observado um efeito quadrático ( $P=0,0475$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a concentração plasmática de Zn (Figura 9). O aumento do nível de Zn (na forma de ZnO-N) proporcionou uma diminuição na concentração de Zn no plasma até o nível de 37,05 mg de Zn/kg de ração, com a concentração mínima de Zn no plasma de 0,91 mg/L. Este resultado difere dos resultados de Hill et al. (2001) e Revy et al. (2002), que observaram um aumento na concentração plasmática de Zn conforme o aumento dos níveis de Zn na ração no período após o desmame, apresentando um ponto de inflexão quando a absorção de Zn atende às necessidades metabólicas do organismo.

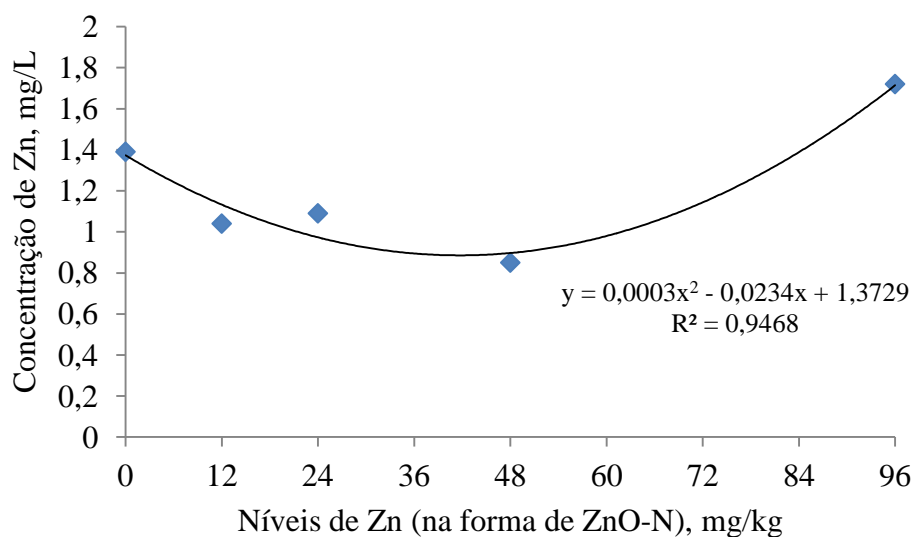


Figura 9 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a concentração plasmática de Zn de leitões aos 19 dias de experimentação

Os animais do controle negativo e os que receberam a suplementação dos níveis de 12, 24 e 48 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) apresentaram menores ( $P < 0,02$ ) concentrações plasmáticas de Zn em comparação ao controle positivo. A concentração plasmática de Zn dos animais suplementados com 120 mg de Zn/kg de ração não diferiu ( $P = 0,0807$ ) dos animais do controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO), com os valores de 1,72 e 2,37 mg/L, respectivamente. Os resultados deste trabalho são consistentes com os de outros experimentos, onde foram observadas menores concentrações plasmáticas quando leitões recém-desmamados foram suplementados com fontes inorgânicas de Zn em níveis de 0 a 500 mg de Zn/kg de ração (0,26 a 1,09 mg de Zn/L) em comparação a níveis farmacológicos de Zn (acima de 2000 mg de Zn/kg de ração) na forma de ZnO (1,66 a 3,18 mg de Zn/L) (BUFF et al., 2005; CARLSON et al., 2004; CASE; CARLSON, 2002; HILL et al., 2001; REVY et al., 2002). Por outro lado, a suplementação de 0, 50 e 300 mg de ZnO-N/kg de peso vivo, não influenciou na concentração plasmática de Zn em ratos (MANSOURI et al., 2015).

As concentrações plasmáticas de Zn obtidas neste experimento, nos animais do controle negativo (1,39 mg/L) e nos animais suplementados com os níveis de Zn na forma de ZnO-N (0,85 a 1,72 mg/L), situam-se dentro da faixa de referência de concentração plasmática de Zn para a espécie, que é 0,5 a 1,5 mg/L (CASE; CARLSON, 2002). Os animais do controle positivo apresentaram uma concentração plasmática de Zn (2,37 mg/L) acima dos valores de referência para a espécie, porém, não foram observados sinais clínicos de toxidez nestes animais.

A concentração de Zn no plasma é um indicativo da biodisponibilidade do Zn, sendo que uma maior concentração de Zn no plasma indica uma maior biodisponibilidade da fonte de Zn avaliada (HAHN; BAKER, 1993; SCHELL; KORNEGAY, 1996; WEDEKIND et al., 1994). Embora não tenha sido realizado um ensaio de biodisponibilidade neste experimento, extrapolando a conclusão obtida nos estudos utilizados como referência, e tomando o contraste entre 120 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) e o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO), pode-se inferir que, o Zn na forma de ZnO-N apresenta uma maior biodisponibilidade quando comparado ao Zn na forma de ZnO, uma vez que um menor nível de Zn na forma de ZnO-N resultou em uma concentração plasmática semelhante ( $P>0,05$ ) àquele observado com o alto nível de Zn na forma de ZnO.

#### **6.3.5.2 Hemograma**

Os resultados para os valores médios de hemácias, hemoglobina, hematócrito, V.c.m., C.h.c.m., metarrubricitos e proteína total estão apresentados na Tabela 8. Foi observado um efeito quadrático ( $P<0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre os valores médios do hematócrito (Figura 10) e a concentração de metarrubricitos (Figura 11). Foi observado um efeito cúbico ( $P=0,0011$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a concentração de hemoglobina (Figura 12).

O aumento do nível de Zn (na forma de ZnO-N) proporcionou um aumento no valor do hematócrito até o nível de 38,76 mg de Zn/kg de ração, com o máximo valor do hematócrito de 37,97%, e proporcionou também um aumento na concentração sérica de metarrubricitos até o nível de 51,93 mg de Zn/kg de ração, com o valor máximo de metarrubricitos de 0,96%.

Tabela 8 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre os valores de C.h.c.m., hemácias, hemoglobina, hematócrito, metarrubríctos, proteína total e V.c.m. de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	Tratamentos						EPM	P =
	2400 mg de Zn/kg	Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48	96		
C.h.c.m., %*	30,64	31,17	30,19	30,28	31,31	30,89	0,31	0,0818
Hemácias, milhões/ $\mu$ L*	6,57	6,70	6,61	6,39	6,98	6,18	0,18	0,0729
Hemoglobina, g/dL <sup>3</sup>	11,61	11,56	11,21	10,79	12,40	10,84	0,31	0,0075
Hematócrito, % <sup>2</sup>	37,91	37,10	37,14	35,61	39,61	35,10 <sup>†</sup>	0,93	0,0201
Metarrubríctos, % <sup>2</sup>	0,19	0,52	0,10	0,01	1,50 <sup>†</sup>	0,02	0,31	0,0121
Proteína total, g/dL	5,19	5,16	5,06	5,08	5,20	4,98	0,11	0,6986
V.c.m., fL*	58,02	55,51	56,47	55,89	56,76	56,79	1,35	0,8456

C.h.c.m = concentração da hemoglobina corpuscular média; V.c.m. = volume corpuscular médio; EPM = Erro padrão da média.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento.

\*Peso vivo do dia 21 utilizado como co-variável.

<sup>2</sup>Efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre os valores médios do hematócrito (%) e de metarrubríctos (%).

<sup>3</sup>Efeito cúbico ( $P < 0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre os valores médios de hemoglobina (g/dL).

<sup>†</sup>Diferente do controle positivo (2400 mg de Zn/kg como ZnO convencional) pelo teste de contraste ortogonal ( $P < 0,05$ ).

Hematócrito =  $-0,001x^2 + 0,0816x + 36,306$ ,  $R^2 = 0,3815$ .

Metarrubríctos =  $-0,0003x^2 + 0,0328x + 0,0686$ ,  $R^2 = 0,2928$ .

Hemoglobina =  $-3E-05x^3 + 0,0038x^2 - 0,1008x + 11,649$ ,  $R^2 = 0,9195$ .

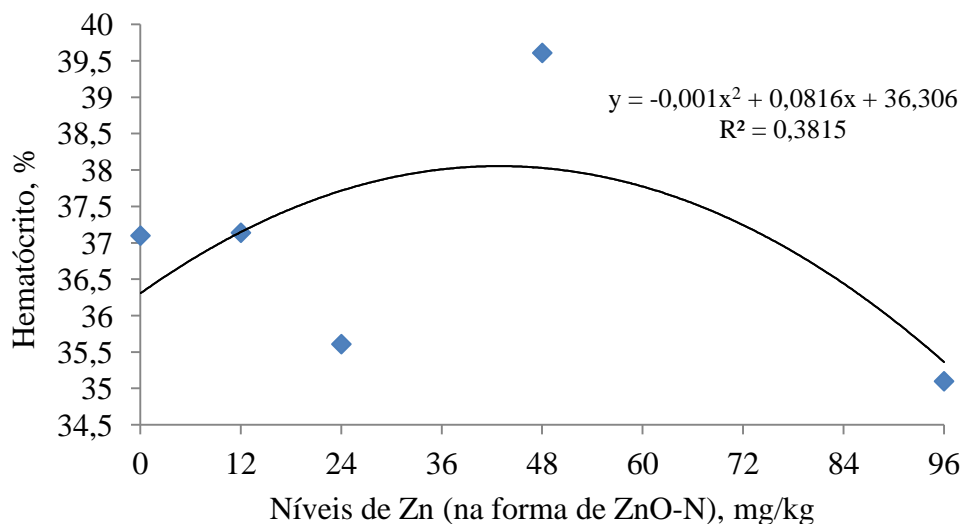


Figura 10 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre os valores do hematócrito de leitões aos 19 dias de experimentação

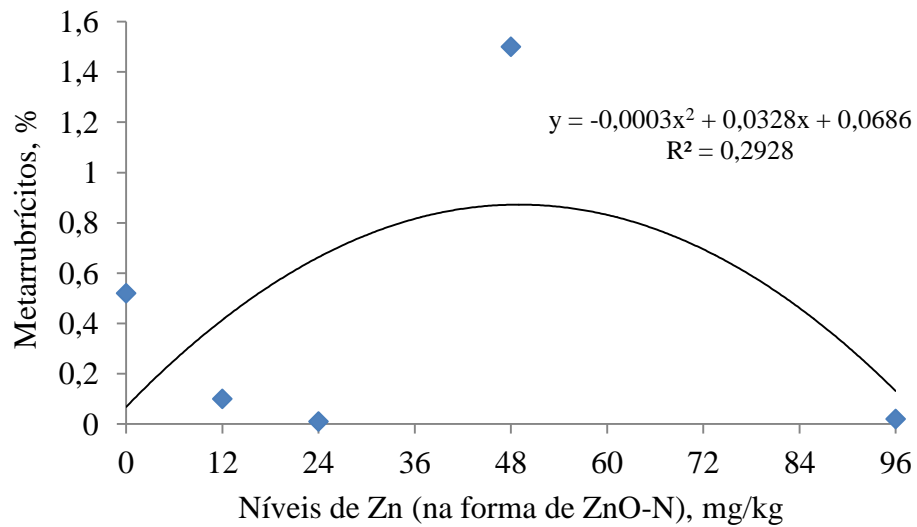


Figura 11 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a concentração de metarrubrócitos de leitões aos 19 dias de experimentação

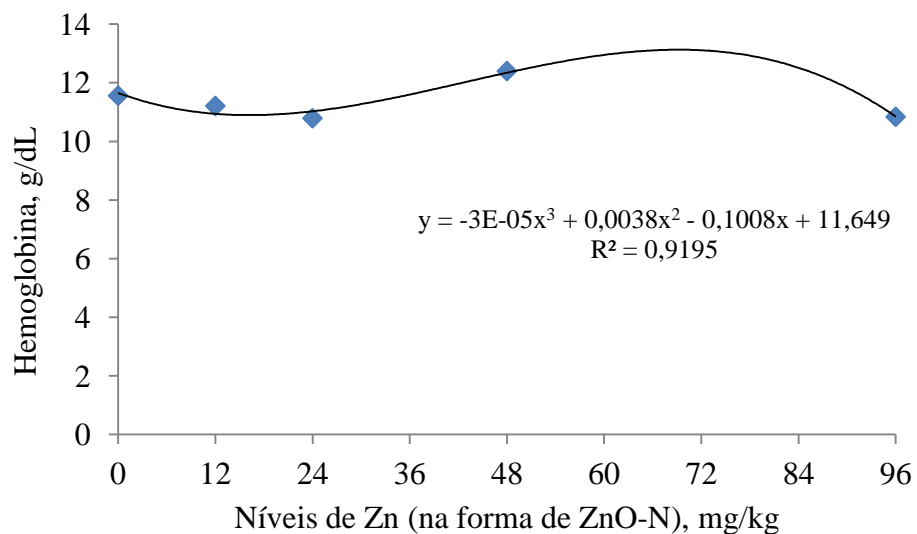


Figura 12 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a concentração de hemoglobina de leitões aos 19 dias de experimentação

O nível de 48 mg de Zn (na forma de ZnO-N) resultou em uma maior ( $P=0,0058$ ) concentração de metarrubrócitos, quando comparado ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Outro efeito foi observado para a suplementação de 96 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) que resultou em um maior ( $P=0,0421$ ) valor para o hematócrito, quando comparado ao controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Não foram observados efeitos significativos ( $P>0,05$ ) para os valores médios de C.h.c.m. e V.c.m., e a concentração de hemácias, hemoglobina e proteína total.

Os resultados deste estudo corroboram com os resultados descritos por Arantes et al. (2007), Berto et al. (1997), Botelho et al. (1995), Lima et al. (1994), Mamami (1996), e Trckova et al. (2015), em que não foram observadas alterações nas concentrações de hemoglobina e nos valores do hematócrito de leitões suplementados com diferentes níveis de Zn na dieta (na forma de ZnO).

Níveis de 1 a 268,4 mg de ZnO-N/kg de peso vivo não afetaram as concentrações do hematócrito, hemoglobina, proteína total, C.h.c.m e V.c.m de ratos (BEN-SLAMA et al., 2015; NIA et al., 2014; SEOK et al., 2013). Porém, a suplementação de 536,8 mg de ZnO-N/kg de peso vivo resultou em uma maior concentração para os parâmetros analisados e em um desequilíbrio na homeostase do Zn e do ferro, o que ocasionou a deficiência de ferro no organismo e a ocorrência de anemia nos animais.

A concentração de hemoglobina no sangue é comumente utilizada como medida do *status* do ferro no organismo, uma vez que cerca de 80 a 90% do ferro do organismo encontra-se na hemoglobina (PERRI et al., 2016). Concentrações de hemoglobina no sangue abaixo de 8,0 g/dL indicam anemia, e concentrações abaixo de 6,0 g/dL indicam a ocorrência de anemia severa (McDOWELL, 2003). Os valores de C.h.c.m e V.c.m. também são indicadores do *status* do ferro no organismo (PERRI et al., 2016).

O consumo de dietas contendo altas concentrações de Zn (acima de 2000 mg de Zn/kg de ração) pode estar associado com a ocorrência de anemia nos leitões após o desmame. O Zn afeta a absorção de ferro devido a sua competição pelos sítios de transporte (PERRI et al., 2016). Altas concentrações de Zn interferem na absorção e no armazenamento de Fe e promovem uma redução na concentração de hemoglobina no sangue (YADRICK; KENNEY, WINTERFELDT, 1989). Animais consumindo níveis entre 2000 e 3000 mg de Zn/kg de ração possuem cerca de 3,4 vezes mais chance de desenvolver quadros de anemia em comparação a animais consumindo dietas com níveis nutricionais de Zn. Já em suínos consumindo níveis elevados de Zn, acima de 3000 mg de Zn/kg de ração, o risco é 4,1 vezes maior (PERRI et al., 2016).

Neste experimento, os parâmetros da série vermelha quantificados por meio do hemograma situaram-se dentro dos valores de referência citados por Thorn (2010), indicando que os níveis suplementados de Zn, na forma de ZnO-N e na forma de ZnO convencional, não foram tóxicos aos animais. Estes parâmetros também não indicam qualquer sinal de ocorrência de anemia nos animais.

Neste estudo foram observadas baixas concentrações séricas de proteína total para todos os tratamentos, caracterizando um quadro de hipoproteinemia. Os valores se

apresentaram entre 4,98 e 5,20 g/dL e os valores de referência citados por Thorn (2010) situam-se entre 6,00 e 8,00 g/dL. Quadros de hipoproteinemia estão associados à deficiência de Zn no organismo (EL HENDY; YOUSEF; EL-NAGA, 2001) e à anemia (O'ROURKE, 2010), o que não foi o caso deste experimento. Também estão associados a quadros de hepatotoxicidade, deficiência de vitamina K, vasculite, peritonite (WEISS; WARDROP, 2010) e aflatoxicose (SHI et al., 2005).

Os resultados para os valores de eosinófilos, leucócitos, linfócitos típicos, monócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados e plaquetas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre os valores de leucócitos, eosinófilos, linfócitos típicos, monócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	Tratamentos					EPM	P =	
	2400 mg de Zn/kg	Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48	96		
Leucócitos, mil/ $\mu$ L*	14,99	14,59	15,67	15,89	14,55	15,07	1,19	0,9530
Eosinófilos, %*	1,09	0,89	1,61	1,38	1,87	0,51	0,45	0,3208
Linfócitos típicos, %*	54,32	62,55	48,02	49,42	54,04	53,75	3,48	0,0797
Monócitos, %*	6,00	4,24	7,00	4,62	4,87	1,74	1,33	0,1452
Neutrófilos bastonetes, %*	0,20	0,40	0,10	0,51	0,50	0,89	0,26	0,3820
Neutrófilos segmentados, %*	38,37	31,90	43,25	44,06	38,69	43,08	3,61	0,1700
Plaquetas, mil/ $\mu$ L*	537,15	576,62	498,14	538,96	639,78	548,85	45,58	0,3723

EPM = Erro padrão da média.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento.

\*Peso vivo do dia 21 utilizado como co-variável.

Não foram observados efeitos dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) ( $P > 0,05$ ) sobre os valores de eosinófilos, leucócitos, linfócitos típicos, monócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados e plaquetas. Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para os valores de eosinófilos, leucócitos, linfócitos típicos, monócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados e plaquetas quando comparou-se o controle negativo e qualquer um dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) com o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Neste experimento, os parâmetros quantificados da série branca situaram-se dentro dos valores de referência citados por Thorn (2010). Os resultados deste estudo corroboram com os resultados descritos por Lima et al. (1994) e Trckova et al. (2015) onde níveis farmacológicos de Zn (na forma de ZnO) foram suplementados.



### 6.3.6 Morfometria e peso de órgãos

Os resultados para a morfometria e peso de órgãos dos leitões aos 21 dias de experimentação estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a morfometria e peso de órgãos de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	Tratamentos					EPM	P =	
	2400 mg de Zn/kg	Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48			96
Peso ao abate, kg	13,24	12,17	12,83	12,39	12,46	12,27	0,52	0,1191
Peso absoluto, g								
Baço*	21,53	22,60	21,70	23,20	18,00	27,10	2,40	0,3125
Estômago*	93,46	97,23	101,90	95,70	87,50	95,72	4,40	0,3447
Fígado*	384,70	399,00	400,30	419,70	350,10	405,70	19,30	0,1948
ID*	803,00	740,90	737,40	754,00	695,50	771,90	33,90	0,3589
Pâncreas *	10,84	9,55	9,15	8,63	10,70	9,47	1,60	0,9121
Peso relativo, %								
Baço	0,17	0,17	0,17	0,18	0,14	0,21	0,01	0,1095
Estômago	0,73	0,77	0,81	0,76	0,69	0,77	0,03	0,3083
Fígado	3,04	3,17	3,16	3,34	2,79	3,27	0,15	0,1785
ID	6,27	6,00	5,82	6,08	5,55	6,28	0,29	0,4972
Pâncreas	0,08	0,07	0,07	0,06	0,08	0,07	0,01	0,3551
Comprimento do ID, m*	12,35	12,42	12,08	12,34	11,56	12,91	0,44	0,4328
Densidade do ID, g/m*	65,20	59,73	60,90	60,97	60,03	59,81	2,11	0,4746

EPM = Erro padrão da média; ID = Intestino delgado.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento.

\*Peso vivo do dia 21 utilizado como co-variável.

Não foram observados efeitos ( $P>0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a morfometria e peso de órgãos dos leitões. Não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) para a morfometria e peso de órgãos dos leitões, quando se comparou o controle negativo e qualquer um dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) com o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Estes resultados corroboram com os resultados de Davin et al. (2013) e Li et al. (2006), onde não foram observados efeitos da suplementação de diferentes níveis Zn (na forma de ZnO convencional) sobre a morfometria e peso de órgãos.

### 6.3.7 Histologia do epitélio intestinal

Os resultados para a histologia do epitélio intestinal aos 21 dias de experimentação estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a histologia do epitélio intestinal (duodeno e jejuno) de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	2400 mg de Zn/kg	Tratamentos					EPM	P =
		Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48	96		
<b>Duodeno*</b>								
Altura de vilosidade, µm	600,48	561,52	569,23	537,99	736,19	581,13	46,11	0,0817
Profundidade de cripta, µm	283,33	313,42	319,93	292,61	291,21	319,04	16,20	0,4582
Relação vilo/cripta <sup>3</sup>	2,11	1,82	1,78	1,83	2,62	1,81	0,17	0,0197
Células caliciformes, n°	11,17	9,66	13,96	13,62	16,07	13,25	1,71	0,1819
<b>Jejuno*</b>								
Altura de vilosidade, µm	391,91	477,44	464,79	388,17	449,82	437,29	34,99	0,3809
Profundidade de cripta, µm	205,98	221,80	240,34	219,84	239,57	213,93	12,46	0,3413
Relação vilo/cripta	1,91	2,14	1,94	1,76	1,86	2,03	0,10	0,2366
Células caliciformes, n° <sup>2</sup>	8,09	8,19	8,42	11,85 <sup>†</sup>	9,17	11,64 <sup>†</sup>	0,97	0,0345

EPM = Erro padrão da média.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento.

\*Peso vivo do dia 21 utilizado como co-variável.

<sup>2</sup>Efeito linear (P<0,05) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a histologia do epitélio intestinal de leitões recém-desmamados

<sup>3</sup>Efeito quadrático (P<0,05) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a histologia do epitélio intestinal (duodeno e jejuno) de leitões recém-desmamados

<sup>†</sup>Diferente do controle positivo (2400 mg de Zn/kg como ZnO convencional) pelo teste de contraste ortogonal (P<0,05).

Relação altura de vilosidade e profundidade de cripta do duodeno =  $-0,0003x^2 + 0,0274x + 1,6211$ ,  $R^2 = 0,5659$ .

Contagem de células caliciformes nas vilosidades do jejuno =  $0,0294x + 8,7958$ ,  $R^2 = 0,3992$ .

Não foram observados efeitos (P>0,05) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a altura de vilosidade e profundidade de cripta do duodeno e jejuno, bem como sobre a contagem de células caliciformes nas vilosidades do duodeno e sobre a relação altura de vilosidade e profundidade de cripta do jejuno dos leitões. Foi observado um efeito quadrático (P=0,0067) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a relação altura de vilosidade e profundidade de cripta do duodeno (Figura 13). O aumento do nível de Zn (na forma de ZnO-N) proporcionou um aumento na relação altura de vilosidade e profundidade de cripta até o nível de 43,38 mg de Zn/kg de ração, com a máxima relação altura de vilosidade e profundidade de cripta de 2,24.

Foi observado um efeito linear (P=0,0351) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a contagem de células caliciformes nas vilosidades do jejuno dos leitões (Figura 14).

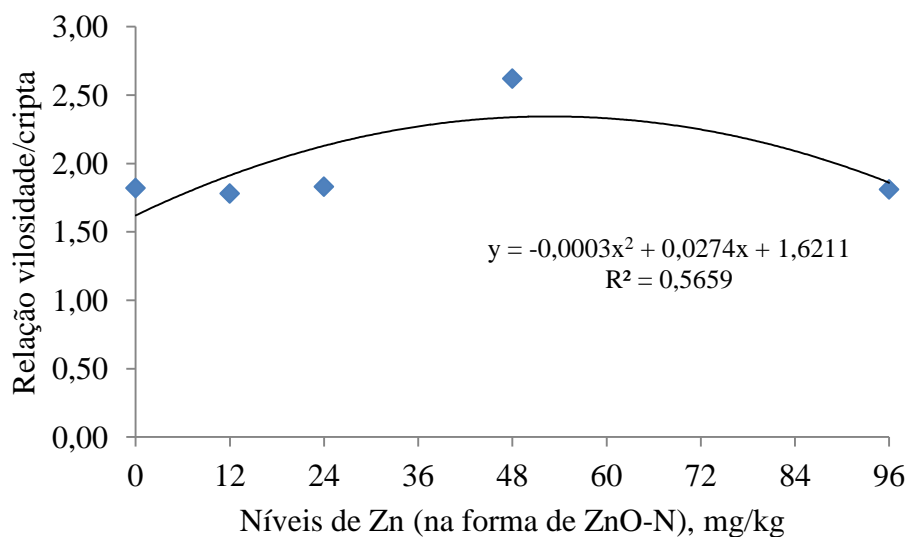


Figura 13 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a relação altura de vilosidade e profundidade de cripta do duodeno de leitões aos 21 dias de experimentação

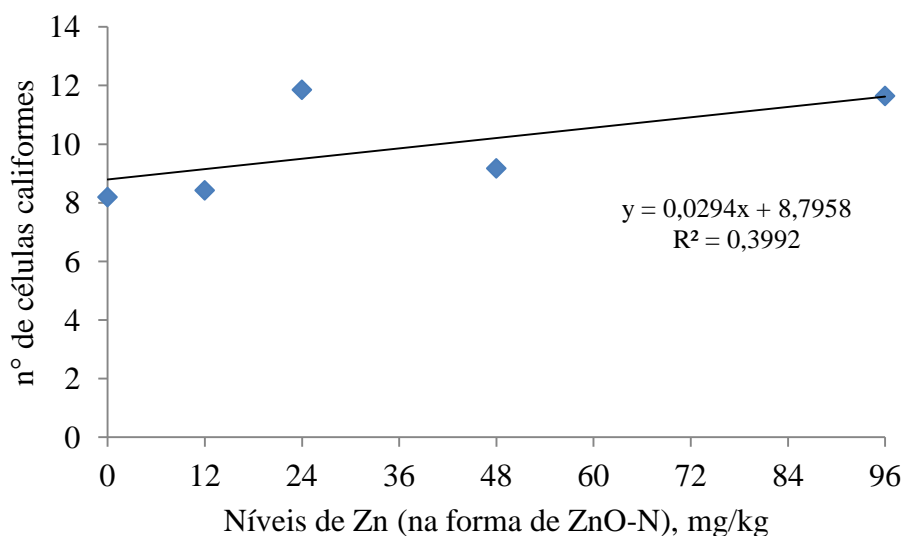


Figura 14 - Efeito dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) na dieta sobre a contagem de células caliciformes nas vilosidades do jejuno de leitões aos 21 dias de experimentação

Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para a altura de vilosidade e profundidade de cripta do duodeno e jejuno, bem como para a contagem de células caliciformes nas vilosidades do duodeno e para a relação altura de vilosidade e profundidade de cripta do jejuno, quando comparou-se o controle negativo e qualquer um dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) com o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Foi observado maior ( $P < 0,03$ ) número de células caliciformes nas vilosidades do jejuno dos

leitões suplementados com 24 e 96 mg de Zn/kg de ração (na forma de ZnO-N) em comparação aos animais do controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO).

Tem-se relatado que a suplementação de níveis farmacológicos de Zn (na forma de ZnO) proporciona um efeito positivo na altura das vilosidades intestinais, aumenta a espessura da mucosa intestinal e a relação vilosidade:cripta, e reduz a profundidade de cripta (BOSI et al., 2003; LI et al., 2001), e que o Zn possui um efeito direto na regulação e diferenciação dos tecidos intestinais (SIMMEN et al., 2007). Entretanto, neste estudo, quando se comparou o controle negativo e o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO), não se identificou qualquer diferença ( $P>0,05$ ) nas variáveis histológicas analisadas. Os efeitos observados neste experimento não demonstraram um padrão de ação evidente do Zn na forma de ZnO-N. De forma semelhante, outros estudos não demonstraram efeitos da suplementação de Zn sobre a histologia do epitélio intestinal (GRILLI et al., 2015; JANG et al., 2014; LIU et al., 2014; MAVROMICHALIS et al., 2000; PARK et al., 2015).

Existem evidências do efeito do tempo após a desmama sobre a regeneração estrutural do intestino, em função da adaptação dos animais a dieta e ao desafio sanitário imposto (LIU et al., 2014; MAVROMICHALIS et al., 2000; MAZZONI et al., 2010; SBARDELLA et al., 2016). A atrofia máxima das vilosidades intestinais ocorre por volta do 3° e 5° dia após o desmame. Depois do 5° dia após o desmame, a altura das vilosidades começa a aumentar e, aos 14 dias, as vilosidades e as criptas intestinais retornam a altura normal. Entretanto, são necessárias cerca de 5 semanas após o desmame para se estabelecer uma relação altura de vilosidade e profundidade de cripta ótima (AL MASRI et al., 2015).

### **6.3.8 Contagem bacteriana no conteúdo intestinal**

Os resultados para a contagem bacteriana no conteúdo intestinal dos segmentos jejuno e ceco dos leitões aos 21 dias de experimentação estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Efeito dos níveis de Zn na dieta sobre a contagem bacteriana no conteúdo intestinal (jejuno e ceco) de leitões recém-desmamados<sup>1</sup>

Item	2400 mg de Zn/kg	Tratamentos					EPM	P =
		Níveis de Zn (na forma de ZnO-N), mg/kg						
		0	12	24	48	96		
Jejuno, log UFC/g*								
<i>Enterococcus</i> sp.	8,62	8,67	8,53	8,94	8,38	8,67	0,23	0,6679
<i>Escherichia coli</i>	8,46	8,54	8,54	8,71	8,39	8,40	0,29	0,9819
<i>Lactobacillus</i> sp.	9,04	9,24	8,83	9,19	9,23	8,82	0,22	0,6093
Ceco, log UFC/g*								
<i>Enterococcus</i> sp.	9,43	9,21	8,94	9,26	8,94	9,07	0,15	0,1588
<i>Escherichia coli</i>	8,98	8,36	8,11	8,49	8,76	8,20	0,29	0,3186
<i>Lactobacillus</i> sp.	9,68	9,66	9,50	9,77	9,73	9,62	0,09	0,4744

EPM = Erro padrão da média.

<sup>1</sup>Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento.

\*Peso vivo do dia 21 utilizado como co-variável.

Não foram observados efeitos ( $P > 0,05$ ) dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N) sobre a contagem de bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* e de *Escherichia coli* no jejuno e no ceco dos leitões. Estudos realizados *in vitro* indicam que as nanopartículas de ZnO tem efeito antibacteriano sobre a *Escherichia coli*, tendo ação bacteriostática e bactericida, e que a atividade antibacteriana do ZnO aumenta conforme o aumento na concentração de ZnO-N (DUTTA et al., 2013; LIU et al., 2009; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008; PASQUET et al., 2014; WANG et al., 2012a). O principal efeito antibacteriano das nanopartículas de ZnO se dá pela destruição dos lipídios e proteínas da membrana celular, através da geração de espécies reativas de oxigênio, o que provoca uma ruptura da membrana que ocasiona o extravasamento dos componentes citosólicos e, conseqüentemente, a morte bacteriana (LIU et al., 2009; WANG et al., 2012a). O efeito antimicrobiano do Zn (na forma de ZnO-N) nos estudos *in vitro* não foi observado neste estudo *in vivo*.

Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para a contagem de bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* e de *Escherichia coli* quando se comparou o controle negativo e os níveis de Zn (na forma de ZnO-N) com o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Normalmente ocorre uma redução na contagem de bactérias do gênero *Lactobacillus* e um aumento na contagem de bactérias do gênero *Enterococcus*, quando doses farmacológicas de Zn (na forma de ZnO) são suplementados na dieta de leitões no pós-desmame (HØJBERG et al., 2005; STARKE et al., 2014). Estes resultados indicam que o efeito do Zn ao modular a população bacteriana no intestino resulta na supressão de bactérias Gram-positivas comensais o que promove uma redução no uso de nutrientes pelas bactérias no trato gastrintestinal deixando mais nutrientes e energia disponível

para utilização pelo hospedeiro, contribuindo para o crescimento dos animais (HØJBERG et al., 2005).

A ação do Zn sobre a população bacteriana no intestino não deve ter ocorrido no presente experimento, uma vez que não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) na contagem bacteriana com a suplementação do nível farmacológico de Zn (na forma de ZnO) e os demais tratamentos. Outros trabalhos também relataram que a suplementação de doses farmacológicas de Zn (na forma de ZnO) não afeta a contagem de bactérias dos gêneros *Enterococcus* (JENSEN-WAERN et al., 1998; LI et al., 2001) e *Lactobacillus* (CHO et al., 2015; LI et al., 2001) no conteúdo intestinal e nas fezes de leitões após o desmame.

Embora a ação da *Escherichia coli* no intestino seja considerada uma das principais causas da ocorrência da diarreia no pós-desmame de leitões, Jensen-Waern et al. (1998) e Cho et al. (2015) relataram que a suplementação de diferentes formas e níveis de Zn não afeta a contagem de *Escherichia coli* no intestino ou nas fezes de leitões após o desmame. Estudos demonstram que a redução na ocorrência da diarreia no pós-desmame não está diretamente relacionada com a redução na contagem de *Escherichia coli* no intestino, mas sim, ao seu efeito protetor ao impedir a adesão e a internalização bacteriana (ROSELLI et al., 2003).

Trabalhos relatam que o principal efeito do Zn sobre as bactérias Gram-negativas se dá por meio da alteração na diversidade na população e através da manutenção do equilíbrio da comunidade de coliformes, o que promove uma maior competição pela colonização dos sítios de adesão intestinal entre as estirpes não patogênicas e patogênicas (KATOULI et al., 1999; STARKE et al. 2014; VAHJEN; PIEPER; ZENTEK, 2011). Isto induz uma resistência contra a adesão e invasão de bactérias patogênicas, que reduz o efeito deletério das toxinas produzidas por estes patógenos e confere uma maior proteção ao organismo (HØJBERG et al., 2005).

Os resultados do presente estudo corroboram com aqueles de trabalhos anteriores, uma vez que se observou uma menor frequência na ocorrência de diarreia para o controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO) em comparação com qualquer um dos níveis de Zn (na forma de ZnO-N). Contudo, não se detectou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na contagem de *Escherichia coli* para a mesma comparação. Também confirma a afirmação já estabelecida de que o efeito do Zn sobre a microbiota intestinal não se dá por ação antimicrobiana direta sobre a *Escherichia coli* no intestino, não ocorrendo uma redução na contagem de *Escherichia coli* (KATOULI et al., 1999; STARKE et al. 2014; VAHJEN; PIEPER; ZENTEK, 2011).

Estudos realizados *in vitro* indicam que o Zn, na forma de ZnO-N, possui efeito como agente antibacteriano podendo ser utilizado no desenvolvimento de agentes capazes de controlar a propagação e a infecção de várias de estirpes bacterianas potencialmente patogênicas ao homens e aos animais (JONES et al., 2008; LIU et al., 2009; PASQUET et al., 2014; WANG et al., 2012a). Entretanto, a partir dos resultados obtidos neste estudo, não foi possível constatar capacidade antimicrobiana do Zn na forma de ZnO-N *in vivo*, uma vez que não se obteve efeito da suplementação de Zn sobre a frequência da ocorrência de diarreia.

Pode-se observar então, através dos estudos já publicados e dos resultados deste experimento, que o efeito do Zn, na forma de ZnO-N, sobre as bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* e da bactéria *Escherichia coli* no conteúdo intestinal, é muito variável e que o Zn não promove um efeito antibacteriano em termos de redução no número da população.

Embora os resultados deste experimento não tenham sido conclusivos quanto à ação antimicrobiana do Zn (na forma de ZnO-N) é necessário a realização de outros trabalhos *in vivo* para verificar o modo de ação em relação aos estudos realizados *in vitro*. Também é importante caracterizar a melhor forma e nível de suplementação, assim como os possíveis efeitos tóxicos que possam decorrer do uso do Zn (na forma de ZnO-N), buscando compreender o seu efeito e a sua estabilidade em meio às secreções do trato gastrintestinal e aos processos de digestão e absorção no organismo, uma vez que ainda não se sabe o mecanismo de ação destas o exato mecanismo de como estas nanopartículas de ZnO.

## 7 CONCLUSÃO

A suplementação dos níveis de Zn, na forma de ZnO-N, na dietas dos leitões recém-desmamados, embora tenha resultado em um desempenho semelhante ao dos leitões suplementados com 2400 mg de Zn/kg de ração, na forma de ZnO convencional, não foi eficiente no controle da diarreia dos leitões após o desmame. Os níveis utilizados de Zn, na forma de ZnO-N, promoveram um aumento linear na digestibilidade da energia e dos nutrientes da dieta, cujos valores não diferiram do controle positivo (2400 mg de Zn/kg de ração na forma de ZnO). Os níveis utilizados de Zn, na forma de ZnO-N) não ocasionaram toxicidade nos animais e promoveram uma redução na excreção de zinco nas fezes e, conseqüentemente, para o ambiente.





## REFERÊNCIAS

- ABPA– Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2016**. São Paulo, 2016. 136p.
- ABU-HAMDAN, D.K.; MIGDAL, S.D.; WHITEHOUSE, R.; RABBANI, P.; PRASAD, A.S.; MCDONALD, F.D. Renal handling of zinc: effect of cysteine infusion. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 241, n. 5, p. 487-494, 1981.
- ADEOLA, O.; LAWRENCE, B.V.; SUTTON, A.L.; CLINE, T.R. Phytase-Induced Changes in Mineral Utilization in Zinc-Supplemented Diets for Pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 11, p. 3384-3391, 1995.
- AFIP. ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY. **Laboratory Methods in Histotechnology**, Washington: AFIP, 1994. 274p.
- AHMADI, F.; EBRAHIMNEZJAD, Y.; GHALEHKANDI, J.G.; SIS, N.M. The Effect of Dietary Zinc Oxide Nanoparticles on the Antioxidant State and Serum Enzymes Activity in Broiler Chickens During Starter. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL, CIVIL AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING, 2014, Dubai. **Anais...** Dubai: [s.n.], 2014. 3p.
- AHMADI, F.; EBRAHIMMEZHAD, Y.; SIS, N.M.; GHALEHKANDI, J.G. The effects of zinc oxide nanoparticles on performance, digestive organs and serum lipid concentrations in broiler chickens during starter period. **International Journal of Biosciences**, Dhaka, v. 3, n. 7, p. 23-29, 2013.
- AKBAR, A.; ANAL, A.K. Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat poultry meat. **Food Control**, Guildford, v. 38, p. 88-95, 2014.
- AKHTAR, M.J.; AHAMED, M.; KUMAR, S.; KHAN, M.A.M.; AHMAD, J.; ALROKAYAN, S.A. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. **International journal of nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 845-857, 2012.
- AL MASRI, S.; HÜNIGEN, H.; AL AIYAN, A.; RIEGER, J.; ZENTEK, J.; RICHARDSON, K.; PLENDL, J. Influence of age at weaning and feeding regimes on the postnatal morphology of the porcine small intestine. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 23, n. 4, p. 186-203, 2015.
- ANRAKU, Y.; GOTO, F.; KIN, E. Transport of Sugars and Amino Acids in Bacteria: Mechanism of Selective Inhibition of the Active Transport Reactions for Proline, Leucine, and Succinate by Zinc Ions. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 78, n. 1, p. 149-157, 1975.
- APPLEROT, G.; LELLOUCHE, J.; LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; LUBART, R.; GEDANKEN, A.; BANIN, E. Understanding the Antibacterial Mechanism of CuO Nanoparticles: Revealing the Route of Induced Oxidative Stress. **Small Journal**, Weinheim, v. 8, n. 21, p. 3326-3327, 2012.

ARANTES, V.M.; THOMAZ, M.C.; KRONKA, R.N.; MALHEIROS, E.B.; BARROS, V.M.; PINTO, E.S.; BUDIÑO, F.E.L.; FRAGA, A.L.; HUAYNATE, R.A.R.; RUIZ, U.S. Níveis de Zinco na Dieta de Leitões Recém-Desmamados Sobre o Perfil de Parâmetros Sangüíneos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 2, p. 193-205, 2007.

ASADA, K.; TOYOTA, K.; NISHIMURA, T.; IKEDA, J.-I.; HORI, K. Accumulation and mobility of zinc in soil amended with different levels of pig-manure compost. **Journal of Environmental Science and Health - Part B**, New York, v. 45, n. 4, p. 285-292, 2010.

ASAKAWA, A.; INUI, A.; KAGA, T.; YUZURIHA, H.; NAGATA, T.; UENO, N.; MAKINO, S.; FUJIMIYA, M.; NIJIMA, A.; FUJINO, M.A.; KASUGA, M. Ghrelin Is an Appetite-Stimulatory Signal From Stomach With Structural Resemblance to Motilin. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 120, n. 2, p. 337-345, 2001.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M.S.; STEPANAUSKAS, R.; MCARTHUR, J.V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 14, n. 4, p.176-182, 2006.

BALL, R.O.; AHERNET, F.X. Influence of dietary nutrient density, level of feed intake and weaning age on young pigs. II. Apparent nutrient digestibility and incidence and severity of diarrhea. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 67, n. 4, p. 1105-1115, 1987.

BECHERI, A.; DÜRR, M.; LO NOSTRO, P.; BAGLIONI, P. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 10, n. 4, p. 679-689, 2008.

BEDNORZ, C.; OELGESCHLÄGER, K.; KINNEMANN, B.; HARTMANN, S.; NEUMANN, K.; PIEPER, R.; BETHE, A.; SEMMLER, T.; TEDIN, K.; SCHIERACK, P.; WIELER, L.H.; GUENTHER, S. The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 303, n. 6/7, p. 396-403, 2013.

BEN-SLAMA, I.; MRAD, I.; RIHANE, N.; EL MIR, L.; SAKLY, M.; AMARA, S. Sub-Acute Oral Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles in Male Rats. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, Los Angeles, v. 6, n. 3, p. 1-6, 2015.

BERTO, D.A.; CURI, P.R.; WATANABE, L.G. Efeitos d adição de cobre e zinco nas rações com nível normal de ferro (100ppm) sobre o desempenho e hematologia de leitões. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA ZOOTECNIA, 34., 1997, Brasília. **Anais...** Juiz de Fora: Sociedade Brasileira Zootecnia, 1997. p. 118-120.

BEYERSMANN, D.; HAASE, H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. **BioMetals**, Oxford, v. 14, n. 3/4, p. 331-341, 2001.

BORAH, S.; SARMAH, B.C.; CHAKRAVARTY, P.; NASKAR, S.; DUTTA, D.J.; KALITA, D. Effect of zinc supplementation on growth, reproductive performance, immune and endocrine response in grower pigs. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 84, n. 2, p. 186-190, 2014.

BOSI, P.; MERIALDI, G.; SARLI, G.; CASINI, L.; GREMOKOLINI, C.; PREZIOSI, R.; BRUNETTI, B.; TREVISI, P. Effects of doses of ZnO or Zn-Glutamate on growth performance, gut characteristics, health and immunity of early-weaned pigs orally challenged with *E. coli* K88. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 2, suppl. 1, p. 361-363, 2003.

BOTELHO, F.G.A.; MIYADA, V.S.; MENTEN, J.F.M.; BEDUSCHI NETO, F.; PACKER, I.U. Efeitos de altos níveis de zinco suplementar em dietas semi-complexas de leitões recém desmamados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira Zootecnia, 1995. p. 484-485.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M.F.; FIÉVET, F. Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. **Nano Letters**, Washington, v. 6, n. 4, p. 866-870, 2006.

BROOM, L.J.; MILLER, H.M.; KERR, K.G.; KNAPP, J.S. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 80, n. 1, p. 45-54, 2006.

BRUGGER, D.; WINDISCH, W.M. Environmental responsibilities of livestock feeding using trace mineral supplements. **Animal Nutrition**, Beijing, v. 1, n. 3, p. 113-118, 2015.

BUFF, C.E.; BOLLINGER, D.W.; ELLERSIECK, M.R.; BROMMELSIEK, W.A.; VEUM, T.L. Comparison of growth performance and zinc absorption, retention, and excretion in weanling pigs fed diets supplemented with zinc-polysaccharide or zinc oxide. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 10, p. 2380-2386, 2005.

BUZEA, C.; BLANDINO, I.I.P.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, New York, v. 2, n. 4, p. MR17-MR172, 2007.

CAMPBELL, J.M.; CRENSHAW, J.D.; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2013.

CANANI, R.B.; CIRILLO, P.; BUCCIGROSSI, V.; RUOTOLO, S.; PASSARIELLO, A.; DE LUCA, P.; PORCARO, F.; DE MARCO, G.; GUARINO, A. Zinc Inhibits Cholera Toxin – Induced, but Not *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin–Induced, Ion Secretion in Human Enterocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 191, n. 7, p. 1072-1077, 2005.

CANANI, R.B.; SECONDO, A.; PASSARIELLO, A.; BUCCIGROSSI, V.; CANZONIERO, L.M.T.; RUOTOLO, S.; PUZONE, C.; PORCARO, F.; PENSA, M.; BRAUCCI, A.; PEDATA, M.; ANNUNZIATO, L.; GUARINO, A. Zinc inhibits calcium-mediated and nitric oxide-mediated ion secretion in human enterocytes. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 626, n. 2/3, p. 266-270, 2010.

CARLSON, M.S.; HILL, G.M.; LINK, E. Early - and Traditionally Weaned Nursery Pigs Benefit from Phase-Feeding Pharmacological Concentrations of Zinc Oxide: Effect on Metallothionein and Mineral Concentrations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 5, p. 1199-1207, 1999.

CARLSON, D.; POULSEN, H.D.; VESTERGAARD, M. Additional dietary zinc for weaning piglets is associated with elevated concentrations of serum IGF-I. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 88, n. 9/10, p. 332-339, 2004.

CARLSON, D.; SEHESTED, J.; POULSEN, H.D. Zinc reduces the electrophysiological responses in vitro to basolateral receptor mediated secretagogues in piglet small intestinal epithelium. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 144, n.4, p. 514-519, 2006.

CARLSON, M.S.; BOREN, C.A.; WU, C.; HUNTINGTON, C.E.; BOLLINGER, D. W.; VEUM, T.L. Evaluation of various inclusion rates of organic zinc either as polysaccharide or proteinate complex on the growth performance, plasma, and excretion of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 5, p. 1359-1366, 2004.

CASE, C.L.; CARLSON, M.S. Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 7, p. 1917-1924, 2002.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 313-322, 2004.

CAVACO, L.M.; HASMAN, H.; AARESTRUP, F.M. Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. **Veterinary Microbiology**, Ames, v. 150, n. 3/4, p. 344-348, 2011.

CHEN, Y.; YU, R.; SHI, Q.; QIN, J.; ZHENG, F. Hydrothermal synthesis of hexagonal ZnO clusters. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 61, n. 22, p. 4438-4441, 2007.

CHIQUIERI, J. **Probiótico e prebiótico na alimentação de suínos em crescimento e terminação**. 2003. 59p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2003.

CHO, J.H.; UPADHAYA, D.S.; KIM, I.H. Effects of dietary supplementation of modified zinc oxide on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, fecal microbial shedding and fecal score in weanling pigs. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 86, n. 6, p. 617-623, 2015.

CHUNG, H.E.; YU, J.; BAEK, M.; LEE, J.A.; KIM, M.S.; KIM, S.H.; MAENG, E.H.; LEE, J.K.; JEONG, J.; CHOI, S.J. Toxicokinetics of zinc oxide nanoparticles in rats. **Journal of Physics: Conference Series**, Bristol, v. 429, p. 12037-12045, 2013.

COUSINS, R.J. Absorption, Transport and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 65, n. 2, p. 238-309, 1985.

COUSINS, R.J.; MCMAHON, R.J. Integrative Aspects of Zinc Transporters. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 130, suppl. 5, p. 1384-1387, 2000.

DARDENNE, M. Zinc and immune function. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 56, suppl. 3, p. 20-23, 2002.

DAVIES, N.T.; NIGHTINGALE, R. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc, and whole-body retention of Zn, copper, iron and manganese in rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 34, n. 2, p. 243-258, 1975.

DAVIN, R.; MANZANILLA, E.G.; KLASING, K.C.; PÉREZ, J.F. Effect of weaning and in-feed high doses of zinc oxide on zinc levels in different body compartments of piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 97, suppl. 1, p. 6-12, 2013.

DUTTA, R.K.; NENAVATHU, B.P.; GANGISHETTY, M.K.; REDDY, A.V.R. Antibacterial effect of chronic exposure of low concentration ZnO nanoparticles on E. coli. **Journal of Environmental Science and Health - Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, New York, v. 48, n. 8, p. 871-878, 2013.

EL HENDY, H.A.; YOUSEF, M.I.; EL-NAGA, N.I.A. Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growing rats. **Toxicology**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 163-170, 2001.

EMAMI-KARVANI, Z.; CHEHRAZI, P. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram-positive and gram-negative bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 5, n. 12, p. 1368-1373, 2011.

ESCOBAR, O.; SANDOVAL, M.; VARGAS, A.; HEMPE, J; M. Role of Metallothionein and Cysteine-Rich Intestinal Protein in the Regulation of Zinc Absorption by Diabetic Rats. **Pediatric Research**, New York, v. 37, n. 3, p. 321-327, 1995.

ETHERIDGE, R.D.; SEERLEY, R.W.; WYATT, R.D. The effect of diet on performance, digestibility, blood composition and intestinal microflora of weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, n. 6, p. 1396-1402, 1984.

EUROPEAN COMMUNITIES. **Official Journal of the European Union**. Commission regulation (EC) n° 1334/2003 of 25 July 2003. Amending the conditions for authorization of a number of additives in feeding stuffs belonging to the group of trace elements, 2003. 6 p.

FAIRBROTHER, J.M.; NADEAU, E.; GYLES, C.L. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 6, n. 1, p. 17-39, 2005.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 111, n. 7, p. 931-943, 2003.

FORSTNER, G. Signal Transduction, Packaging and Secretion of Mucins. **Annual review of physiology**, Palo Alto, v. 57, p. 585-605, 1995.

FRIENDSHIP, R.M.; LUMSDEN, J.H.; MCMILLAN, I.; WILSON, M.R. Hematology and Biochemistry Reference Values for Ontario Swine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 48, n. 4, p. 390-393, 1984.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association journal**, Ottawa, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

GIROUX, E.; PRAKASH, N.J. Influence of Zinc-Ligand Mixtures on Serum Zinc Levels in Rats. **Journal de Médecine de Bordeaux et du Sud-Ouest**, Bordeaux, v. 6, n. 3, p. 391-395, 1977.

GRÄBER, I.; HANSEN, J.F.; OLESEN, S.E.; PETERSEN, J.; OSTERGAARD, H.S.; KROGH, L. Accumulation of Copper and Zinc in Danish Agricultural Soils in Intensive Pig Production Areas. **Geografisk Tidsskrift - Danish Journal of Geography**, Kjøbenhavn, v. 105, n. 2, p. 15-22, 2005.

GRELA, E.R.; PASTUSZAK, J. Zywniowe i profilaktyczne znaczenie cynku w chowie świń. **Medycyna Weterynaryjna**, Poland, v. 60, n. 12, p. 1254-1258, 2004.

GRILLI, E.; TUGNOLI, B.; VITARI, F.; DOMENEGHINI, C.; MORLACCHINI, M.; PIVA, A.; PRANDINI, A. Low doses of microencapsulated zinc oxide improve performance and modulate the ileum architecture, inflammatory cytokines and tight junctions expression of weaned pigs. **Animal**, Cambridge, v. 9, n. 11, p. 1760-1768, 2015.

GROPPER, S.S.; SMITH, J.L.; GROFF, J.L. **Advanced Nutrition and Human Metabolism**. 5<sup>th</sup> . ed. Belmont: Wadsworth, 2009. 624p.

HAHN, J.D.; BAKER, D.H. Growth and Plasma Zinc Responses of Young Pigs Fed Pharmacologic Levels of Zinc. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 11, p. 3020-3024, 1993.

HAN, Y.-K.; THACKER, P.A. Performance, Nutrient Digestibility and Nutrient Balance in Weaned Pigs Fed Diets Supplemented with Antibiotics or Zinc Oxide. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 8, n. 5, p. 868-875, 2009.

HANLEY, C.; LAYNE, J.; PUNNOOSE, A.; REDDY, K.M.; COOMBS, I.; COOMBS, A.; FERIS, K.; WINGETT, D. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 19, n. 29, p. 1-10, 2008.

HEDEMANN, M.S.; HØJSGAARD, S.; JENSEN, B.B. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 87, n. 1/2, p. 32-41, 2003.

HEDEMANN, M.S.; JENSEN, B.B.; POULSEN, H.D. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 12, p. 3310-3320, 2006.

HEIM, G.; WALSH, A.M.; SWEENEY, T.; DOYLE, D.N.; O'SHEA, C.J.; RYAN, M.T.; O'DOHERTY, J.V. Effect of seaweed-derived laminarin and fucoidan and zinc oxide on gut morphology, nutrient transporters, nutrient digestibility, growth performance and selected microbial populations in weaned pigs. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 111, n. 9, p. 1577-1585, 2014.

HEMPE, J.M.; COUSINS, R.J. Cysteine-Rich Intestinal Protein and Intestinal Metallothionein: An Inverse Relationship as a Conceptual Model for Zinc Absorption in Rats. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 122, n. 1, p. 89-95, 1992.

HENRIQUES, G.S.; HIRATA, M.H.; COZZOLINO, S.M.F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da Enzima Conversora de Angiotensina. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 333-345, 2003.

HEO, J.M.; OPAPEJU, F.O.; PLUSKE, J.R.; KIM, J.C.; HAMPSON, D.J.; NYACHOTI, C.M. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 97, n. 2, p. 207-237, 2013.

HEO, J.M.; KIM, J.C.; HANSEN, C.F.; MULLAN, B.P.; HAMPSON, D.J.; MARIBO, H.; KJELDSSEN, N.; PLUSKE, J.R. Effects of dietary protein level and zinc oxide supplementation on the incidence of post-weaning diarrhoea in weaner pigs challenged with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 133, n. 1/3, p. 210-213, 2010.

HILL, G.M.; SPEARS, J.W. Trace and ultratrace elements in swine nutrition. In: Lewis, A.J.; Southern, L.L (Ed.). **Swine Nutrition**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 213-228.

HILL, G.M.; MAHAN, D.C.; JOLLIFF, J.S. Comparison of organic and inorganic zinc sources to maximize growth and meet the zinc needs of the nursery pig. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1582-1594, 2014.

HILL, G.M.; MAHAN, D.C.; CARTER, S.D.; CROMWELL, G.L.; EWAN, R.C.; HARROLD, R.L.; LEWIS, A.J.; MILLER, P.S.; SHURSON, G.C.; VEUM, T.L. Effect of pharmacological concentrations of zinc oxide with or without the inclusion of an antibacterial agent on nursery pig performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p. 934-941, 2001.

HØJBERG, O.; CANIBE, N.; POULSEN, H.D.; HEDEMANN, M.S.; JENSEN, B.B. Influence of Dietary Zinc Oxide and Copper Sulfate on the Gastrointestinal Ecosystem in Newly Weaned Piglets. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2267-2277, 2005.

HÖLZEL, C.S.; MÜLLER, C.; HARMS, K.S.; MIKOLAJEWSKI, S.; SCHÄFER, S.; SCHWAIGER, K.; BAUER, J. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. **Environmental Research**, New York, v. 113, p. 21-27, 2012.

HONG, J.-S.; PARK, M.-K.; KIM, M.-S.; LIM, J.-H.; PARK, G.-J.; MAENG, E.-H.; SHIN, J.-H.; KIM, M.-K.; JEONG, J.; PARK, J.-A.; KIM, J.-C.; SHIN, H.-C. Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 9, suppl. 2, p. 159-171, 2014.

HOQUE, K.M.; RAJENDRAN, V.M.; BINDER, H.J. Zinc inhibits cAMP-stimulated Cl secretion via basolateral K-channel blockade in rat ileum. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 5, p. 956-963, 2005.

HOSEINZADEH, E.; ALIKHANI, M.-Y.; SAMARGHANDI, M.-R.; SHIRZAD-SIBONI, M. Antimicrobial potential of synthesized zinc oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. **Desalination and Water Treatment**, Hopkinton, v. 18, n. 25/27, p. 1-8, 2013.



- HSU, J.H.; LO, S.L. Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese, and zinc from swine manure. **Environmental Pollution**, Barking, v.114, n. 1, p. 119-127, 2001.
- HU, C.H.; XIAO, K.; SONG, J.; LUAN, Z.S. Effects of zinc oxide supported on zeolite on growth performance, intestinal microflora and permeability, and cytokines expression of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 181, n. 1/4, p. 65-71, 2013.
- HUGUET, A.; SEVE, B.; LE DIVIDICH, J.; LE HUEROU-LURON, I. Effects of a bovineco lostrum-supplemented diet on some gut parameters in weaned piglets. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 46, n. 2, p. 167-178, 2006.
- JANCZYK, P.; BÜSING, K.; DOBENECKER, B.; NÖCKLER, K.; ZEYNER, A. Effect of high dietary zinc oxide on the caecal and faecal shortchain fatty acids and tissue zinc and copper concentration in pigs is reversible after withdrawal of the high zinc oxide from the diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 99, suppl. 1, p. 13-22, 2015.
- JANG, I.; KWON, C.H.; HA, D.M.; JUNG, D.Y.; KANG, S.Y.; PARK, M.J.; HAN, J.H.; PARK, B.-C.; LEE, C.Y. Effects of a lipid-encapsulated zinc oxide supplement on growth performance and intestinal morphology and digestive enzyme activities in weanling pigs. **Journal of Animal Science and Technology**, London, v. 56, n. 29, p. 1-6, 2014.
- JENSEN, M.S.; JENSEN, S.K.; JAKOBSEN, K. Development of Digestive Enzymes in Pigs with Emphasis on Lipolytic Activity in the Stomach and Pancreas. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 437-445, 1997.
- JENSEN-WAERN, M.; MELIN, L.; LINDBERG, R.; JOHANNISSON, A.; PETERSSON, L.; WALLGREN, P. Dietary zinc oxide in weaned pigs - effects on performance, tissue concentrations, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 225-231, 1998.
- JONES, N.; RAY, B.; RANJIT, K.T.; MANNA, A.C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 279, n. 1, p. 71-76, 2008.
- KASAHARA, M.; ANRAKU, Y. Inhibition of the Respiratory Chain of *Escherichia coli* by Zinc Ions. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 72, n. 3, p. 777-781, 1972.
- KATOULI, M.; MELIN, L.; JENSEN-WAERN, M.; WALLGREN, P.; MÖLLBY, R. The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 564-573, 1999.
- KHAN, R.; KAUSHIK, A.; SOLANKI, P.R.; ANSARI, A.A.; PANDEY, M.K.; MALHOTRA, B.D. Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 616, n. 2, p. 207-213, 2008.

KIM, J.C.; HANSEN, C.F.; PLUSKE, J.R.; MULLAN, B.P. **Evaluating the replacement of zinc oxide with an encapsulated zinc oxide product as a means of controlling post-weaning diarrhoea in piglets.** Australia: Co-operative Research Centre, 2010. 16p. Relatório preparado pelo Co-operative Research Centre para a Indústria Suinícola Internacionalmente competitiva.

KING, J.C.; COUSINS, R.J. Zinc. In: ROSS, A.C.; CABALLERO, B.; COUSINS, R.J.; TUCKER, K.L.; ZIEGLER, T.R. (Ed.). **Modern Nutrition in Health and Disease.** 11. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2014. p. 189-205.

KING, J.C.; SHAMES, D.M.; WOODHOUSE, L.R. Zinc Homeostasis in Humans. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 130, suppl. 5, p. 1360-1366, 2000.

LALLÈS, J.P. Nutrition and gut health of the young pig around weaning: what news? **Archiva Zootechnica**, Romania, v. 11, n. 1, p. 5-15, 2008.

LEI, X.; KU, P.K.; MILLER, E.R.; ULLREY, D.E.; YOKOYAMA, M.T. Supplemental Microbial Phytase Improves Bioavailability of Dietary Zinc to Weanling Pigs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 123, n. 6, p. 1117-1123, 1993.

L'HERROUX, L.; LE ROUX, S.; APPRIOU, P.; MARTINEZ, J. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). **Environmental Pollution**, Barking, v. 97, n. 1/2, p. 119-130, 1997.

LI, X.L.; DONG, B.; LI, D.F.; YIN, J.D. Mechanisms Involved in the Growth Promotion of Weaned Piglets by High-level Zinc Oxide. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 1, n. 1, p. 59-67, 2010.

LI, B.T.; VAN KESSEL, A.G.; CAINE, W.R.; HUANG, S.X.; KIRKWOOD, R.N. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 81, n. 4, p. 511-516, 2001.

LI, M.-Z.; HUANG, J.-T.; TSAI, Y.-H.; MAO, S.-Y.; FU, C.-M.; LIEN, T.-F. Nanosize of zinc oxide and the effects on zinc digestibility, growth performances, immune response and serum parameters of weanling piglets. **Animal Science Journal**, Tokyo, 2016.

LI, X.; YIN, J.; LI, D.; CHEN, X.; ZANG, J.; ZHOU, X. Dietary Supplementation with Zinc Oxide Increases IGF-I and IGF-I Receptor Gene Expression in the Small Intestine of Weanling Piglets. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 136, n. 7, p. 1786-1791, 2006.

LIMA, G.J.M.M.; MORES, N.; FIALHO, F.B.; PAIVA E BRITO, M.A.V.; GOMES, P.C. Efeito do período de suplementação de zinco na dieta sobre o desempenho de suínos desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 23, n. 6, p. 949-958, 1994.

LIPOVSKY, A.; TZITRINOVICH, Z.; FRIEDMANN, H.; APPLEROT, G.; GEDANKEN, A.; LUBART, R. EPR Study of Visible Light-Induced ROS Generation by Nanoparticles of ZnO. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 113, n. 36, p. 15997-16001, 2009.

LIU, Y.; HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z.Q.; LIN, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 4, p. 1193-1201, 2009.

LIU, P.; PIEPER, R.; TEDIN, L.; MARTIN, L.; MEYER, W.; RIEGER, J.; PLENDL, J.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. Effect of dietary zinc oxide on jejunal morphological and immunological characteristics in weaned piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 11, p. 5009-50018, 2014.

LÖNNERDAL, B. Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 130, suppl. 5, p. 1378-1383, 2000.

MACDONALD, R.S. The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 130, suppl. 5, p. 1500-1508, 2000.

MADEC, F.; BRIDOUX, N.; BOUNAIX, S.; JESTIN, A. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 53-72, 1998.

MAMAMI, N.J.P. **Efeitos da suplementação de altos níveis dietéticos de cobre e zinco no desempenho de leitões**. 1996. 62 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

MANSOURI, E.; KHORSANDI, L.; ORAZIZADEH, M.; JOZI, Z. Dose-dependent hepatotoxicity effects of Zinc oxide nanoparticles. **Nanomedicine journal**, Mashhad, v. 2, n. 4, p. 273-282, 2015.

MATTERSON, L.D.; POTTER, L.M.; STUTZ, M.W.; SINGSEN, E.P. **The metabolizable energy of feed ingredients for chickens**. Storrs: University of Connecticut, 1965. 11p.

MAVROMICHALIS, I.; PETER, C. M.; PARR, T.M.; GANESSUNKER, D.; BAKER, D.H. Growth-promoting efficacy in young pigs of two sources of zinc oxide having either a high or a low bioavailability of zinc. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 2896-2902, 2000.

MAZZONI, M.; MERIALDI, G.; SARLI, G.; TREVISI, P.; BOSI, P. Effect of Two Doses of Different Zinc Sources (Inorganic vs. Chelated form) on the Epithelial Proliferative Activity and the Apoptotic Index of Intestinal Mucosa of Early-weaned Pigs Orally Challenged with *E. coli* K88. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 23, n. 6, p. 777-785, 2010.

MCCALL, K.A.; HUANG, C.; FIERKE, C.A. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 130, suppl. 5, p. 1437-1446, 2000.

MCDOWELL, L.R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. 2<sup>nd</sup> . ed. Amsterdam: Elsevier, 2003. 660p.

MEI, Y.; ZHI-SHENG, W.; AN-GUO, Z. Performance and Biochemical Responses in Early Weaned Piglets Fed Diets with Different Protein and Zinc Levels. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2009.

- MIYADA, V.S.; MENTEN, J.F.M.; BOTELHO, F.G.A.; BEDUSCHI NETO, F. Efeitos de níveis de zinco dietético suplementar e período de fornecimento sobre o desempenho de leitões em recria. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996 .p. 113-115.
- MIYADA, V.S.; MENTEN, J.F.M.; PACKER, I.U.; LAVORENTI, A. Avaliação de níveis crescentes de zinco dietético suplementar como promotor de crescimento de leitões na fase de creche. In:REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p. 383.
- MOFFETT, B.F.; NICHOLSON, F.A.; UWAKWE, N.C.; CHAMBERS, B.J.; HARRIS, J.A.; HILL, T.C.J. Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 13-9, 2003.
- MONTEIRO, S.C.; LOFTS, S.; BOXALL, A.B.A. **Pre-assessment of environmental impact of zinc and copper used in animal nutrition**. Parma: European Food Safety Authority, 2010. 325 p. Relatório Técnico/Científico submetido ao EFSA.
- MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; MORENO, A.M. Manejo do leitão desde o nascimento até o abate. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SESTI, L.A.C. (Eds.). **Suinocultura intensiva: Produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p.135-162.
- MORÉS, N.; AMARAL, A.L. Patologias associadas ao desmame. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Concórdia: Embrapa CNPSA, 2001. p. 215-224.
- MUNIZ, M.H.B.; BERTO, D.A.; HAUPTLI, L.; FRACAROLLI, C.; TRINDADE NETO, M.A.; TAMASSIA, L.F.M.; WECHSLER, F.S. Fontes orgânicas e inorgânicas de zinco e cobre como melhoradores de desempenho em leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 9, p. 1999-2005, 2010.
- NABUURS, M.J.A.; HOOGENDOOM, A.; VAN DER MOLEN, E.J.; VAN OSTA, A.L.M. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 78-84, 1993.
- NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, Germany, v. 295, n. 6/7, p. 443-454, 2005.
- NIA, H.M.; HABIBI, A.; VARZI, H.N.; SHAKERIAN, S.; ZAMANEH, H.T. Nano and Conventional ZnO with Aerobic Exercise have Effects on Some of Hematological Parameters in Male Rat. **New York Science Journal**, Brooklyn, v. 7, n. 5, p. 33-37, 2014.
- NICHOLSON, F.A.; SMITH, S.R.; ALLOWAY, B.J.; CARLTON-SMITH, C.; CHAMBERS, B.J. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 311, n. 1/3, p. 205-219, 2003.
- NIES, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v. 27, n. 2/3, p. 313-339, 2003.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Swine**. 11<sup>th</sup> . ed. Washington: NRC, 2012. 400p.

O'DELL, B.L. Cysteine-Rich Intestinal Protein (CRIP): A New Intestinal Zinc Transport Protein. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 50, n. 8, p. 232-233, 1992.

O'ROURKE, L.G. Preclinical Evaluation of Compound-Related Cytopenias. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup> . ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 85-91.

OU, D.; LI, D.; CAO, Y.; LI, X.; YIN, J.; QIAO, S.; WU, G. Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the small intestine of weanling pigs. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 18, n. 12, p. 820-826, 2007.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, New York, v. 9, p. 35004-35011, 2008.

PARK, B.C.; JUNG, D.Y.; KANG, S.Y.; KO, Y.H.; HÁ, D.M.; KWON, C.H.; PARK, M.J.; HAN, J.H.; JANG, I.; LEE, C.Y. Effects of dietary supplementation of a zinc oxide product encapsulated with lipid on growth performance, intestinal morphology, and digestive enzyme activities in weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 200, p. 112-117, 2015.

PARTANEN, K.; SILJANDER-RASI, H.; PENTIKÄINEN, J.; PELKONEN, S.; FOSSI, M. Effects of weaning age and formic acid-based feed additives on pigs from weaning to slaughter. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 61, n. 5, p. 336-356, 2007.

PASQUET, J.; CHEVALIER, Y.; COUVAL, E.; BOUVIER, D.; NOIZET, G.; MORLIÈRE, C.; BOLZINGER, M.-A. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 460 n. 1/2, p. 92-100, 2014.

PASUPULETI, S.; ALAPATI, S.; GANAPATHY, S.; ANUMOLU, G.; PULLY, N.R.; PRAKHYA, B.M. Toxicity of zinc oxide nanoparticles through oral route. **Toxicology and Industrial Health**, Princeton, v. 28, n. 8, p. 675-286, 2012.

PEKAS, J.C. Zinc 65 metabolism: gastrointestinal secretion by the pig. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 211, n. 2, p. 407-413, 1966.

PELTIER, E.; VINCENT, J.; FINN, C.; GRAHAM, D.W. Zinc-induced antibiotic resistance in activated sludge bioreactors. **Water Research**, Oxford, v. 44, n. 13, p. 3829-3836, 2010.

PERRI, A.M.; FRIENDSHIP, R.M.; HARDING, J.C.S.; O'SULLIVAN, T.L. An investigation of iron deficiency and anemia in piglets and the effect of iron status at weaning on post-weaning performance. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 24, n. 1, p. 10-20, 2016.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 51, n. 1/3, p. 215-236, 1997.

PLUSKE, J.R.; WILLIAMS, I.H.; AHERNE, F.X. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. **Animal Science**, Scotland, v. 62, n. 1, p. 131-144, 1996.

POULSEN, H.D. Zinc Oxide for Weanling Piglets. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science**, Copenhagen, v. 45, n. 3, p. 159-167, 1995.

POULSEN, H.D.; LARSEN, T. Zinc excretion and retention in growing pigs fed increasing levels of zinc oxide. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 235-242, 1995.

PRASAD, A.S.; OBERLEAS, D.; WOLF, P.; HORWITZ, J.P.; MILLER, E.R.; LUECKE, R.W. Changes in Trace Elements and Enzyme Activities in Tissues of Zinc-Deficient Pigs. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 22, n. 5, p. 628-637, 1969.

PRASAD, T.N.V.K.V.; SUDHAKAR, P.; SREENIVASULU, Y.; LATHA, P.; MUNASWAMY, V.; RAJA REDDY, K.; SREEPRASAD, T.S.; SAJANLAL, P.R.; PRADEEP, T. Effect of Nanoscale Zinc Oxide Particles on the Germination, Growth and Yield of Peanut. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 35, n. 6, p. 905-927, 2012.

RAGHUPATHI, K.R.; KOODALI, R.T.; MANNA, A.C. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. **Langmuir**, Washington, v. 27, p. 4020-4028, 2011.

RAHMAN, M.M.; KADIRGAMA, K. Performance of Water-Based Zinc Oxide Nanoparticle Coolant during Abrasive Grinding of Ductile Cast Iron. **Journal of Nanoparticles**, Cairo, v. 2014, p. 1-7, 2014.

RASMUSSEN, J.W.; MARTINEZ, E.; LOUKA, P.; WINGETT, D.G. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v. 7, n. 9, p. 1063-1077, 2010.

REDDY, K.M.; FERIS, K.; BELL, J.; WINGETT, D.G.; HANLEY, C.; PUNNOOSE, A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. **Applied Physics Letters**, New York, v. 90, p. 1-3, 2007.

REVVY, P.S.; JONDREVILLE, C.; DOURMAD, J.Y.; NYS, Y. Effect of zinc supplemented as either an organic or an inorganic source and of microbial phytase on zinc and other minerals utilization by weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 116, n. 1/2, p. 93-112, 2004.

REVVY, P.-S.; JONDREVILLE, C.; DOURMAD, J.-Y.; GUINOTTE, F.; NYS, Y. Bioavailability of two sources of zinc in weanling pigs. **Animal Research**, Les Ulis, v. 51, p. 315-326, 2002.

REYES, J.G. Zinc transport in mammalian cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, Bethesda, v. 270, n. 2, p. 401-410, 1996.

RINCKER, M.J.; HILL, G.M.; LINK, J.E.; MEYER, A.M.; ROWNTREE, J.E. Effects of dietary zinc and iron supplementation on mineral excretion, body composition, and mineral status of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 12, p. 2762-2774, 2005.

- RINK, L.; GABRIEL, P. Zinc and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 59, n. 4, p. 541-552, 2000.
- ROPPA, L. Nutrição de leitões na fase pós-desmame. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1., 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: [s.n.], 1998. p. 265-271.
- ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; GARAGUSO, I.; BRITTI, M.S.; MENGHERI, E. Zinc Oxide Protects Cultured Enterocytes from the Damage Induced by *Escherichia coli*. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 133, n. 12, p. 4077-4082, 2003.
- ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; BRITTI, M.S.; BOSI, P.; OSWALD, I.; MENGHERI, E. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. **Animal Research**, Cambridge, v. 54, p. 203-218, 2005.
- ROUSSEL, P.; DELMOTTE, P. The Diversity of Epithelial Secreted Mucins. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 8, n. 5, p. 413-437, 2004.
- ROY, R.; DAS, M.; DWIVEDI, P.D. Toxicological mode of action of ZnO nanoparticles: Impact on immune cells. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 63, n. 9, p. 184-192, 2015.
- SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: Funep, 2007. 283p.
- SALGUEIRO, M.J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; SARABIA, M.I.; CARE, R.; DE PAOLI, T.; HAGER, A.; WEILL, R.; BOCCIO, J. Zinc as an Essential Micro Nutrient: A Review. **Nutrition Research**, New York, v. 20, n. 5, p. 737-755, 2000.
- SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 177-182, 2003.
- SBARDELLA, M.; PERINA, D.P.; ANDRADE, C.; SANTOS, C.B.; CAIRO, P.L.G.; MARQUES, E.L.S.; REZENDE, R.P.; COSTA, L.B.; MIYADA, V.S. Effects of dietary hop  $\beta$ -acids or colistin on the performance, nutrient digestibility, and intestinal health of weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 217, p. 67-75, 2016.
- SCHELL, T.C.; KORNEGAY, E.T. Zinc Concentration in Tissues and Performance of Weanling Pigs Fed Pharmacological Levels of Zinc from ZnO, Zn-Methionine, Zn-Lysine, or ZnSO<sub>4</sub>. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 7, p. 1584-1593, 1996.
- SEILER, C.; BERENDONK, T.U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 14, n. 3, p. 1-10, 2012.
- SEOK, S.H.; CHO, W.-S.; PARK, J.S.; NA, Y.; JANG, A.; KIM, H.; CHO, Y.; KIM, T.; YOU, J.-R.; KO, S.; KANG, B.-C.; LEE, J.K.; JEONG, J.; CHE, J.-H. Rat pancreatitis produced by 13-week administration of zinc oxide nanoparticles: biopersistence of nanoparticles and possible solutions. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 33, n. 10, p. 1089-1096, 2013.

SHAHEEN, A.A.; ABD EL-FATTAH, A.A. Effect of Dietary Zinc on Lipid Peroxidation, Glutathione, Protein Thiols Levels and Superoxide Dismutase Activity in Rat Tissues. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 89-95, 1995.

SHANKAR, A.H.; PRASAD, A.S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, suppl. 2, p. 447-463, 1998.

SHI, Y.H.; XU, Z. R.; FENG, J.L.; XIA, M.S.; HU, C.H. Effects of Modified Montmorillonite Nanocomposite on Growing/Finishing Pigs during Aflatoxicosis. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 18, n. 9, p. 1305-1309, 2005.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 235p.

SIMMEN, F.A.; XIAO, R.; VELARDE, M.C.; NICHOLSON, R.D.; BOWMAN, M.T.; FUJII-KURIYAMA, Y.; OH, S.P.; SIMMEN, R.C.M. Dysregulation of intestinal crypt cell proliferation and villus cell migration in mice lacking Krüppel like factor. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 292, n. 6, p. 1757-1769, 2007.

SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; KAUS, N.H.M.; ANN, L.C.; BAKHORI, S.K.M.; HASAN, H.; MOHAMAD, D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. **Nano-Micro Letters**, Shanghai, v. 7, n. 3, p. 219-242, 2015.

SMIJS, T.G.; PAVEL, S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. **Nanotechnology, Science and Applications**, Auckland, v. 5, p. 95-112, 2011.

SÖDERBERG, T.A.; SUNZEL, B.; HOLM, S.; ELMROS, T.; HALLMANS, G.; SJÖBERG, S. Antibacterial effect of zinc oxide in vitro. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery**, Stockholm, v. 24, n. 3, p. 193-197, 1990.

SONG, M.K.; LEE, D.B.N.; ADHAM, N.F. Influence of prostaglandins on unidirectional zinc fluxes across the small intestine of the rat. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 59, n. 3, p. 417-428, 1988.

STARCHER, B.C.; GLAUBER, J.G.; MADARAS, A.G. Zinc Absorption and Its Relationship to Intestinal Metallothionein. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 110, n. 7, p. 1391-1397, 1980.

STARKE, I.C.; ZENTEK, J.; VAHJEN, W. Ex Vivo - Growth Response of Porcine Small Intestinal Bacterial Communities to Pharmacological Doses of Dietary Zinc Oxide. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2013.

STARKE, I.C.; PIEPER, R.; NEUMANN, K.; ZENTEK, J.; VAHJEN, W. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 416-427, 2014.



- STOIMENOV, P.K.; KLINGER, R.L.; MARCHIN, G.L.; KLABUNDE, K.J. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. **Langmuir**, Washington, v. 18, n. 17, p. 6679-6686, 2002.
- THAPA, B.R.; WALIA, A. Liver Function Tests and their Interpretation. **Indian Journal of Pediatrics**, New Delhi, v. 74, n. 7, p. 663-671, 2007.
- THORN, C.E. Hematology of the Pig. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 843-851.
- TORRE, M.; RODRIGUEZ, A.R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of Dietary Fiber and Phytic Acid on Mineral Availability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 1, n. 1, p. 1-22, 1991.
- TRCKOVA, M.; LORENCOVA, A.; HAZOVA, K.; SRAMKOVA ZAJACOVA, Z. Prophylaxis of post-weaning diarrhoea in piglets by zinc oxide and sodium humate. **Veterinární Medicína**, Praha, v. 60, n. 7, p. 351-360, 2015.
- UMRANI, R.D.; PAKNIKAR, K.M. Zinc oxide nanoparticles show antidiabetic activity in streptozotocin-induced Type 1 and 2 diabetic rats. **Nanomedicine**, London, v. 9, n. 1, p. 89-104, 2014.
- VAHJEN, W.; PIEPER, R.; ZENTEK, J. Increased dietary zinc oxide changes the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 8, p. 2430-2439, 2011.
- VAHJEN, W.; PIETRUSZYŃSKA, D.; STARKE, I.C.; ZENTEK, J. High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. **Gut pathogens**, London, v. 7, n. 23, p. 1-5, 2015.
- VALLEE, B.L.; FALCHUK, K.H. The Biochemical Basis of Zinc Physiology. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 73, n. 1, p. 79-118, 1993.
- WALK, C.L.; SRINONGKOTE, S.; WILCOCK, P. Influence of a microbial phytase and zinc oxide on young pig growth performance and serum minerals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 286-291, 2013.
- WALK, C.L.; WILCOCK, P.; MAGOWAN, E. Evaluation of the effects of pharmacological zinc oxide and phosphorus source on weaned piglet growth performance, plasma minerals and mineral digestibility. **Animal**, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 1145-1152, 2015.
- WALLACH, J.; KANAAN, S. **Interpretação de exames laboratoriais**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 1067 p.
- WANG, Y.Z.; XU, Z.R.; LIN, W.X.; HUANG, H.Q.; WANG, Z.Q. Developmental Gene Expression of Antimicrobial Peptide PR-39 and Effect of Zinc Oxide on Gene Regulation of PR-39 in Piglets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 17, n. 12, p. 1635-1640, 2004.
- WANG, C.; LIU, L.-L.; ZHANG, A.-T.; XIE, P.; LU, J.-J.; ZOU, X.-T. Antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on *Escherichia coli* K88. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 44, p. 10248-10254, 2012a.

WANG, M.Q.; TAO, W.J.; YE, S.S.; DU, Y.J.; WANG, C.; SHEN, S.X. Effects of Dietary Pharmacological Zinc on Growth , Liver Methallothionein, Cu, Zn-SOD Concentration and Serum Parameters in Piglets. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 11, n. 9, p. 1390-1394, 2012b.

WANG, B.; FENG, W.; WANG, M.; WANG, T.; GU, Y.; ZHU, M.; OUYANG, H.; SHI, J.; ZHANG, F.; ZHAO, Y.; CHAI, Z.; WANG, H.; WANG, J. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. **Journal of Nanoparticle Research: an interdisciplinary forum for nanoscale science and Technology**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 263-276, 2008.

WEARY, D.M.; JASPER, J.; HOTZEL, M.J. Understanding weaning distress. **Applied Animal Behaviour Science**, Seoul, v. 110, n. 1/2, p. 24-41, 2008.

WEDEKIND, K.J.; LEWIS, A.J.; GIESEMANN, M.A.; MILLER, P.S. Bioavailability of Zinc from Inorganic and Organic Sources for Pigs Fed Corn-Soybean Meal Diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 10, p. 2681-2689, 1994.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J (Eds.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup> . ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010.1232p.

WOLF, P.L. Biochemical diagnosis of liver disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, Patna, v. 14, n. 1, p. 59-90, 1999.

YADRICK, M.K.; KENNEY, M.A.; WINTERFELDT, E.A. Iron, copper, and zinc status: response to supplementation with zinc or zinc and iron. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 145-150, 1989.

YAN, G.; HUANG, Y.; BU, Q.; LV, L.; DENG, P.; ZHOU, J.; WANG, Y.; YANG, Y.; LIU, Q.; CEN, X.; ZHAO, Y. Zinc oxide nanoparticles cause nephrotoxicity and kidney metabolism alterations in rats. **Journal of Environmental Science and Health - Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, New York, v. 47, n. 4, p. 577-588, 2012.

YAZDANKHAH, S.; RUDI, K.; BERNHOFT, A. Zinc and copper in animal feed-development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. **Microbial Ecology in Health and Disease**, Chichester, v. 25, p. 1-7, 2014.

YIN, J.; LI, X.; LI, D.; YUE, T.; FANG, Q.; NI, J.; ZHOU, X.; WU, G. Dietary supplementation with zinc oxide stimulates ghrelin secretion from the stomach of young pigs. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 20, n. 10, p. 783-790, 2009.

YOUSEF, M.I.; EL HENDY, H.A.; EL-DEMERDASH, F.M.; ELAGAMY, E.I. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. **Toxicology**, Amsterdam, v. 175, n. 1/3, p. 223-234, 2002.

ZHAO, C.-Y.; TAN, S.-X.; XIAO, X.-Y.; QIU, X.-S.; PAN, J.-Q.; TANG, Z.-X. Effects of Dietary Zinc Oxide Nanoparticles on Growth Performance and Antioxidative Status in Broilers. **Biological Trace Element Research**, London, v. 160, n. 3, p. 361-367, 2014.