



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL

MAITÊ VIDAL MENDONÇA

**Efeitos da associação de diferentes fontes de cobre e zinco na dieta
de leitões desmamados**

Pirassununga

2018

MAITÉ VIDAL MENDONÇA

Efeitos da associação de diferentes fontes de cobre e zinco na dieta de leitões desmamados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof^ª. Dr^ª. Simone Maria Massami Kitamura
Martins

De acordo: Simone M. M. K. Martins

Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3671
FMVZ

Mendonça, Maitê Vidal
Efeitos da associação de diferentes fontes de cobre e zinco na dieta de leitões desmamados / Maitê Vidal Mendonça. – 2018.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Maria Massami Kitamura Martins.

1. Incidência de diarreia. 2. Óxido de zinco. 3. Redução de níveis. 4. Suínos. 5. Sulfato de cobre. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da associação de diferentes fontes de cobre e zinco na dieta de leitões desmamados", protocolada sob o CEUA nº 9842240217, sob a responsabilidade de **Simone Maria Massami Kitamura Martins e equipe; Maitê Vidal Mendonça; Heloisa Nunes Dominguez** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2017.

We certify that the proposal "Effects of the association of different copper and zinc sources in the diet of weaned piglets", utilizing 160 Swines (males and females), protocol number CEUA 9842240217, under the responsibility of **Simone Maria Massami Kitamura Martins and team; Maitê Vidal Mendonça; Heloisa Nunes Dominguez** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 05/2017 a 07/2018

Área: [Nutrição E Produção Animal](#)

Origem: [Animais provenientes de outros projetos](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [21 a 63 dias](#)

N: [160](#)

Linhagem: [Híbrido](#)

Peso: [5 a 22 kg](#)

Resumo: O desmame precoce dos leitões foi realizado com a finalidade de reduzir o intervalo entre partos e, conseqüentemente aumentar o número de leitões desmamados por fêmea por ano. Nas granjas suínícolas isso ocorre em média aos 21 dias de idade e possibilita o aparecimento de quadros diarreicos seguidos de redução no crescimento e aumento na mortalidade. Dentre os minerais, o cobre e o zinco tem despertado maior interesse, pois além das inúmeras funções biológicas, quando utilizados em níveis farmacológicos possuem ação antimicrobiana, e deste modo atuam no controle da incidência de diarreias pós-desmame, ocasionada pela baixa digestibilidade das dietas, associada às alterações no pH intestinal e ao desequilíbrio no sistema imunológico. Assim, o objetivo do presente estudo será comparar a eficácia da associação de diferentes fontes de cobre e zinco em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho e a biodisponibilidade. Serão utilizados 160 leitões desmamados aos 21 dias de idade distribuídos em 4 tratamentos, T1, 15 ppm de sulfato de cobre e 100 ppm de sulfato de zinco; T2, 180 ppm de sulfato de cobre e 100 ppm de sulfato de zinco; T3, 180 ppm de cloreto de cobre tribásico e 100 ppm de cloreto de zinco tribásico e T4, 15 ppm cloreto de cobre tribásico e 100 ppm de cloreto de zinco tribásico. Serão avaliados nos leitões o desempenho até 63 dias de idade, a frequência de dias com diarreia, concentração plasmática do cobre e do zinco e excreção fecal desses minerais. Os dados referentes à frequência de diarreia serão submetidos à transformação pela função arcoseno e o desempenho, a concentração plasmática e excreção serão submetidos à análise de variância (PROC MIXED), empregando-se o programa SAS. As hipóteses testadas serão consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS/FMVZ).

São Paulo, 28 de abril de 2017

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor (a): MENDONÇA, Maitê Vidal

Título: Efeitos da associação de diferentes fontes de cobre e zinco na dieta de leitões desmamados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Eunice Barbosa Vidal, por ser meu maior orgulho e exemplo tanto profissional, quanto de mulher e de caráter. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À professora Simone, que me ensinou tudo sobre suinocultura, aspectos relacionados à Medicina Veterinária e também relacionados à vida. Muito obrigada pela dedicação, paciência, ensinamentos, companheirismo e cuidado com todos os detalhes da minha vida acadêmica. Sou e sempre serei muito honrada por ter sido orientada por você.

Ao professor André Furugen pela oportunidade e confiança desde o início, quando o procurei para ser aluna de Prática Profissionalizante. Muito obrigada pelos ensinamentos, conselhos, bom humor e exemplo de esforço e profissionalismo.

Ao meu irmão Giovani, por não ser apenas um irmão, mas sim meu melhor amigo, sempre presente com paciência, conselhos e bom humor. Você e nossa mãe são meus tesouros, amo muito vocês!

Ao Paulo de Tarso, por estar sempre presente em nossas vidas e por ser quem você é: uma pessoa iluminada.

Ao Ricardo, pela compreensão da minha ausência em vários momentos, apoio, confiança, companheirismo e amor.

Aos pós-graduandos do Núcleo de Pesquisa em Suínos pela ajuda essencial na execução desse projeto, pela amizade e bons momentos de convívio: Ana Paula, Bruno, Cristian, Denis, Diego, Flávia, Gisele, Mariana e Marina.

Aos meus amigos de infância que sempre me acompanham: Adriana, Beatriz, Cássio e Jeanne. Obrigada por fazerem parte da minha vida, mesmo distantes fisicamente, sempre presentes com boas vibrações e nas lembranças.

À Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal (VNP), pela oportunidade única de muito aprendizado.

À Trouw Nutrition pelo auxílio financeiro à pesquisa.

À concessão da bolsa de mestrado pelo CNPq (Processo: 137203/2016-0) e pela CAPES.

RESUMO

MENDONÇA, M. V. **Efeitos da associação de diferentes fontes de cobre e zinco na dieta de leitões desmamados.** [Effects of the association of different copper and zinc sources in the diet of weaned piglets]. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Inicialmente o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de diferentes fontes de cobre e zinco na dieta de leitões desmamados. Porém, houve a necessidade de utilizar as mesmas fontes e alterar apenas os níveis de inclusão desses minerais, o que justifica o título (que não pôde ser substituído posteriormente). Os leitões recém-desmamados apresentam reduzida digestibilidade de nutrientes pela falta de maturidade do sistema digestório frente à dieta sólida, levando à redução na absorção dos mesmos, e conseqüentemente diarreia e queda no desempenho. Uma das alternativas utilizadas após o desmame, principalmente com a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento, tem sido os microminerais, principalmente o zinco (Zn) e o cobre (Cu). Dentre as fontes, o óxido de zinco (ZnO) e o sulfato de cobre (CuSO₄) são as comumente utilizadas em níveis farmacológicos, 3000 mg/kg e 250 mg/kg, respectivamente devido ao baixo custo e por melhorar o desempenho, a consistência fecal e a manutenção da integridade intestinal. É possível que leitões suplementados com a associação de CuSO₄ e níveis reduzidos de ZnO na dieta apresentem desempenho, frequência de dias com diarreia e morfometria intestinal semelhantes aos leitões suplementados com maiores níveis, e que não ocorra interferência na absorção hepática de Cu e na concentração de Zn na tibia. Assim, o presente estudo avaliou a associação entre o CuSO₄ e o ZnO, em níveis reduzidos, sobre o desempenho, a morfometria intestinal, a frequência de dias com diarreia e a concentração desses minerais no fígado e na tibia de leitões na fase de creche. Utilizaram-se 80 leitões desmamados aos 21 dias de idade distribuídos em 2 tratamentos, de acordo com as fases: Pré-inicial (21 aos 35 dias): T1, 3000 mg/kg ZnO + CuSO₄; T2, 2500 mg/kg ZnO + CuSO₄; Inicial 1 (35 aos 49 dias): T1, 2500 mg/kg ZnO + CuSO₄; T2, CuSO₄; e na Inicial 2 (49 aos 63 dias): T1 e T2, 100 mg/kg ZnO + CuSO₄, sendo a inclusão de 180 mg/kg CuSO₄ em todas as fases. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, sendo a sala e o peso considerados como bloco. A frequência de dias com diarreia foi transformada pela função arco-seno e as características foram submetidas à análise de variância, empregando-se o software SAS (v. 9.3), o nível de significância considerado foi de 5%. Os leitões que receberam menor nível de ZnO apresentaram maior frequência de diarreia dos 35 aos 49 dias de idade (P < 0,05), contudo o

desempenho, a morfometria intestinal e a concentração de cobre no fígado foram semelhantes entre os tratamentos. Infere-se que esse resultado foi obtido pela atuação do Zn, Cu e aos cuidados paliativos como o fornecimento de soro via oral e antibioticoterapia terapêutica nos animais com fezes líquidas. Conclui-se que os leitões que receberam reduzida inclusão ZnO, níveis inferiores a 3000 mg/kg, associado a 180 mg/kg de CuSO₄ apresentaram maior frequência de dias com diarreia dos 35 aos 49 dias, sem prejuízos no desempenho e na morfometria intestinal, sendo possível a redução de custos e na poluição ambiental.

Palavras-chave: Incidência de diarreia. Óxido de zinco. Redução de níveis. Suínos. Sulfato de cobre.

ABSTRACT

MENDONÇA, M. V. **Effects of the association of different copper and zinc sources in the diet of weaned piglets.** [Efeitos da associação de diferentes fontes de cobre e zinco na dieta de leitões desmamados]. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Initially the present study aimed to evaluate the effects of different sources of copper and zinc in the diet of weaned piglets. However, it was necessary to use the same sources and only change the inclusion levels of these minerals, which justifies the title (which couldn't be replaced later). Newly weaned piglets show reduced nutrients digestibility, due to the lack of maturity of the digestive system to the solid diet, leading to a reduction in nutrient absorption and consequently, diarrhea and performance reduction. One of the alternatives used after weaning, especially with the reduction of the use of antibiotics as growth promoters, is the use of microminerals, mainly zinc (Zn) and copper (Cu). Among the sources, zinc oxide (ZnO) and copper sulfate (CuSO₄) are commonly used at pharmacological levels, 3000 mg/kg and 250 mg/kg, respectively, due to low cost and to improve performance, fecal consistency and maintenance of intestinal integrity. It is possible that piglets supplemented with the association of CuSO₄ and ZnO at reduced levels in the diet show performance, diarrhea frequency and intestinal morphology similar to piglets supplemented with higher levels and that there is no interference on Cu hepatic absorption and Zn concentration in tibia. Thus, the present study evaluated the association between CuSO₄ and ZnO at reduced levels on performance, intestinal morphology, frequency of days with diarrhea and concentration on the liver and tibia in piglets during the nursery phase. A total of 80 piglets were weaned at 21 days of age divided into 2 treatments according to the following phases: Pre-starter (21 to 35 days): T1, 3000 mg/kg ZnO + CuSO₄; T2, 2500 mg/kg ZnO + CuSO₄; Starter 1 (35 to 49 days): T1, 2500 mg/kg ZnO + CuSO₄; T2, CuSO₄; and in the Starter 2 (49 to 63 days): T1 and T2, 100 mg/kg ZnO + CuSO₄, with inclusion of 180 mg/kg of CuSO₄ in all phases. The experimental design was in randomized blocks, with room and weight considered as blocks. The diarrhea frequency was transformed by the sine function and the characteristics were submitted to analysis of variance using SAS software (v. 9.3). The level of significance was 5%. Piglets receiving lower levels of ZnO had greater diarrhea frequency from 35 to 49 days of age (P < 0.05), however performance, intestinal morphology and Cu concentration in the liver were similar between treatments. Infers that this result was obtained by Zn, Cu and palliative care, such as oral serum supply and therapeutic antibiotic therapy in animals with

liquid feces. It is conclude that the piglets that received reduced ZnO inclusion, levels below 3000 mg/kg, associated with 180 mg/kg of CuSO₄ showed higher frequency of days with diarrhea from 35 to 49 days, with no impairment in performance and intestinal morphology, enabling possible the reduction of costs and environmental pollution.

Keywords: Copper sulfate. Diarrhea incidence. Reduction of levels. Swine. Zinc oxide.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Alojamento dos leitões na sala de creche do Laboratório de Pesquisa em Suínos (FMVZ-USP)..... | 33 |
| Figura 2 – Esquema experimental das avaliações de desempenho e escore fecal..... | 36 |
| Figura 3 – Escore fecal dos leitões | 36 |
| Figura 4 – Amostras para avaliação da morfometria intestinal | 37 |
| Figura 5 – Mensuração da altura de vilosidade (vermelho) e profundidade de cripta (verde) do jejuno | 39 |
| Figura 6 – Metodologia utilizada para análise dos minerais na dieta..... | 40 |
| Figura 7 – Metodologia utilizada para análise laboratorial de cobre no fígado | 41 |
| Figura 8 – Metodologia utilizada para análise laboratorial dos minerais na tíbia..... | 41 |
| Figura 9 – Frequência de diarreia (%) dos leitões dos 21 aos 63 dias de idade | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Dietas fornecidas aos leitões durante o período experimental | 34 |
| Tabela 2 – Desempenho dos leitões dos 21 aos 63 dias | 44 |
| Tabela 3 – Morfometria intestinal do duodeno, jejuno e íleo dos leitões aos 63 dias de idade | 46 |
| Tabela 4 – Níveis dos minerais presentes nas amostras das dietas | 47 |
| Tabela 5 – Concentração de cobre no fígado, manganês e zinco na tíbia dos leitões aos 63 dias de idade..... | 48 |

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS | 19 |
| 2.2 FUNÇÕES DO COBRE E ZINCO EM LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS..... | 20 |
| 2.2.1 Cobre | 20 |
| 2.2.2 Zinco..... | 23 |
| 2.3 ASSOCIAÇÃO DE COBRE E ZINCO..... | 26 |
| 3. HIPÓTESES | 29 |
| 4. OBJETIVOS | 31 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 5.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS..... | 33 |
| 5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS NOS TRATAMENTOS E MANEJO ALIMENTAR..... | 34 |
| 5.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS LEITÕES..... | 35 |
| 5.4 FREQUÊNCIA DE DIAS COM DIARREIA..... | 36 |
| 5.5 MORFOMETRIA INTESTINAL | 37 |
| 5.6 CONCENTRAÇÃO DE COBRE E ZINCO | 39 |
| 5.6.1 Dieta..... | 39 |
| 5.6.2 Fígado e Tíbia | 40 |
| 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 42 |
| 6. RESULTADOS | 44 |
| 6.1 DESEMPENHO | 44 |
| 6.2 FREQUÊNCIA DE DIAS COM DIARREIA..... | 45 |
| 6.3 MORFOMETRIA INTESTINAL | 46 |
| 6.4 DISPONIBILIDADE DE COBRE E ZINCO..... | 47 |
| 6.4.1 Dietas | 47 |

| | |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.4.2 Concentração dos Minerais no Fígado e na Tíbia..... | 47 |
| 7. DISCUSSÃO | 50 |
| 7.1 DESEMPENHO | 50 |
| 7.2 FREQUÊNCIA DE DIAS COM DIARREIA | 52 |
| 7.3 MORFOMETRIA INTESTINAL..... | 53 |
| 7.4 CONCENTRAÇÃO DOS MINERAIS NA DIETA, FÍGADO E TÍBIA..... | 56 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 59 |
| 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 61 |
| REFERÊNCIAS | 63 |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O consumo mundial de carne suína aumentou intensamente nas últimas décadas, e, sob uma perspectiva global, nota-se um potencial futuro no consumo. No Brasil, o consumo da carne suína tem demonstrado crescimento alinhado à tendência mundial, já que houve aumento no consumo interno anual de 1040 mil toneladas para 2986 mil toneladas entre os anos de 1995 e 2015. Esse aumento de 113% em duas décadas foi responsável por posicionar o Brasil como o sexto maior consumidor de carne suína no mundo (ABCS, 2016).

Para atender essa crescente demanda é imprescindível que as criações de suínos obtenham melhoras nos índices reprodutivos e produtivos, o que se busca por meio do avanço do manejo, melhoramento genético, bem-estar animal, condições sanitárias e nutrição. Uma maneira de melhorar o desempenho produtivo da suinocultura é a redução do período de lactação, o que propiciou o aumento no número de partos por fêmea por ano e refletiu no aumento do número de leitões desmamados por ano (LIMA; MORÉS; SANCHES, 2009).

Independentemente da época em que é realizado, o desmame é estressante para os leitões, afetando-os tanto socialmente quanto fisiologicamente. O baixo consumo de ração e a mudança brusca do tipo de alimento, associados às condições gerais de estresse, levam ao desequilíbrio na microbiota do trato gastrointestinal e a proliferação de bactérias patogênicas com o aparecimento da diarreia.

Uma das alternativas para contornar os baixos índices zootécnicos após o desmame, principalmente com a redução do uso de antibióticos como promotores de crescimento, tem sido o uso de microminerais (PLUSKE et al., 2002). Dentre os microminerais, o cobre (Cu) e o zinco (Zn) possuem inúmeras funções biológicas, e, quando utilizados em níveis farmacológicos entre 150 a 250 mg Cu/kg e 2500 a 3000 mg Zn/kg ração, os mesmos possuem ação antimicrobiana, reduzindo principalmente a incidência de diarreias pós-desmame, ocasionada pela baixa digestibilidade de dietas, associada às alterações no pH intestinal e ao desequilíbrio no sistema imunológico (BERTOL; BRITO, 1995).

O zinco é utilizado em doses farmacológicas desde o início dos anos 90 (LIMA, 2017), e desde a década de 50 pesquisas já demonstravam a eficiência do sulfato de cobre como promotor do crescimento em níveis farmacológicos (GATTÁS; BARBOSA, 2004).

De acordo com Debski (2016) a associação de cobre e zinco pode resultar em efeitos aditivos no desempenho dos leitões, mas nem sempre esses efeitos são observados nos estudos. E, o uso prolongado desses minerais em níveis elevados na dieta, promove pressão seletiva sobre bactérias resistentes a antimicrobianos.

Níveis elevados de óxido de zinco podem causar redução da biodisponibilidade de outros nutrientes (LEESON; SUMMERS, 1997) assim como levar à poluição ambiental pelo excesso dos mesmos nas fezes (CONDÉ et al., 2014) e também, podem acarretar no desenvolvimento de resistência antimicrobiana (LIMA, 2017) e reduzir a expressão de genes que modificam a resposta imune dos leitões (SARGEANT et al., 2010).

Nesse contexto, cabe destacar a proposta elaborada pelo Comitê dos Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP) de banir o uso farmacológico do óxido de zinco em leitões desmamados na União Europeia nos próximos anos (WILCOCK et al., 2017).

Assim, há necessidade de se investigar os efeitos de menores níveis de inclusão de óxido de zinco na dieta e os seus reflexos no desenvolvimento dos leitões recém-desmamados.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta sessão encontram-se abordados em tópicos os temas que foram base para as hipóteses deste estudo.

2.1 LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS

Após o desmame, os leitões sofrem mudanças intestinais fisiológicas, microbiológicas e imunológicas, caracterizando o período pós-desmame com alta incidência de diarreia e queda do desempenho, devido a fatores estressantes ambientais, nutricionais e psicológicos (HEO et al., 2013).

Dentre os fatores estressantes, tem-se a interrupção abrupta da interação social com a mãe e a leitegada (HEO et al., 2013), mudança de espaço físico, mistura de lotes (LALLES et al., 2004), substituição do leite da porca, que possui fatores intrínsecos, tais como a imunoglobulina A, o fator de crescimento epidermal, as poliaminas e a glutamina, o consumo das dietas (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997), o tipo de processamento do alimento e a forma física da ração e a imaturidade imunológica (LI et al., 1990).

As alterações do ponto de vista social, ambiental e nutricional decorrentes do desmame resultam em um período crítico de baixa ingestão de alimento, conhecido como anorexia pós-desmame, que ocasionam uma queda transitória na secreção de enzimas digestivas, seguido pela recuperação (MARION et al., 2003), durante o qual a digestibilidade e absorção de alimentos encontra-se diminuída. Associado a esse processo, o estresse provocado pelo desmame leva ao desequilíbrio da microbiota intestinal, podendo predispor ao crescimento exacerbado de bactérias oportunistas que podem produzir enterotoxinas ou se instalarem nos enterócitos presentes nas vilosidades intestinais, prejudicando ainda mais a digestão e a absorção dos nutrientes, levando a hipertonicidade na luz intestinal, a retenção de água e, conseqüentemente à diarreia (LALLES et al., 2004).

Segundo Nabuurs et al. (1993), a altura das vilosidades atinge um patamar mais baixo entre 3 e 4 dias após o desmame, se restabelecendo entre 11 a 14 dias. Os efeitos da anorexia pós-desmame sobre a secreção de enzimas digestivas e a morfometria do epitélio intestinal são multifatoriais, e incluem privação de substratos luminiais para o crescimento das células da mucosa epitelial, e redução da expressão de fatores de crescimento para os órgãos digestivos, tais como o peptídeo semelhante ao glucagon 2, o fator semelhante a insulina I

(IGF-I) (VENTE-SPREEUWENBERG; BEYNEN, 2003) e a colecistoquinina (MONTAGNE et al., 2007). Assim, a digestibilidade e a absorção de nutrientes encontram-se diminuídas nessa primeira fase após o desmame. Por conseguinte, todas essas alterações a que leitões são submetidos ao desmame, aliadas à falta de maturidade do sistema digestório destes animais frente à nova dieta sólida, causam diminuição na ingestão e absorção dos alimentos, e inevitavelmente, queda no desempenho (LALLES et al., 2004).

Ressalta-se ainda que as alterações adversas da morfologia intestinal incluem redução da altura e aumento da largura das vilosidades, aumento da profundidade de cripta e redução da capacidade de absorção e da atividade das enzimas digestivas da borda em escova. Com isso, a infecção bacteriana geralmente acompanha a fase do desmame dos leitões limitando o crescimento (McCRACKEN et al.; 1999; MA et al., 2015).

Com relação à infecção bacteriana, ocorre aumento da adesão de bactérias patogênicas à camada mucosa, devido à falta de imunidade ativa e os danos na integridade intestinal, ocasionando a síndrome da diarreia pós-desmame e queda no desempenho. Dentre as bactérias, a *Escherichia coli*, além de ser habitante natural do trato gastrointestinal, também é usualmente associada às diarreias pós-desmame, sendo a cepa *E. coli* enteropatogênica a mais frequente (ARANTES et al., 2005). Esta bactéria determina sério impacto à suinocultura por se envolver no desenvolvimento das diarreias pós-desmame associadas à má absorção de nutrientes (SILVA et al., 2015).

Portanto, intervenções dietéticas, como a inclusão de microminerais, que minimizem os prejuízos causados pela síndrome diarreica e queda do desempenho na fase do desmame se tornam essenciais no sistema de produção de suínos.

2.2 FUNÇÕES DO COBRE E ZINCO EM LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS

2.2.1 Cobre

Os minerais constituem parte importante do organismo animal, representando de 2,8 a 3,2% do peso vivo dos suínos (BERTECHINI, 2004) e são elementos inorgânicos necessários para manutenção, crescimento e reprodução dos suínos (LIU et al., 2018). A suplementação mineral aumentou nos últimos anos, por diversos motivos, dentre eles o melhoramento genético que tornou os animais mais exigentes nutricionalmente devido ao ganho de peso acelerado e ao maior tamanho de leitegada, redução no uso de farinhas de origem animal em

decorrência de problemas sanitários e as utilizações de rações à base de ingredientes vegetais, pobre em minerais (REGINA; BERTECHINI, 2010).

É difícil determinar as exigências de minerais e muitas estimativas levam em consideração o nível mínimo exigido para suprir um sintoma de deficiência e não necessariamente com o intuito de promover a produtividade ou aumentar a imunidade (CLOSE, 2003). Contudo os níveis dietéticos de cobre normalmente são suficientes para atender a exigência nutricional dos leitões, sendo descritos na literatura valores de 4 a 6 mg/kg (NRC, 1998), 5 a 6 mg/kg (NRC, 2012) e 6,80 a 12,98 mg/kg (ROSTAGNO et al., 2017).

O cobre em níveis nutricionais é importante por atuar na reprodução, no crescimento, no desenvolvimento ósseo e de tecidos conectivos, na pigmentação dos pelos, lã e plumas nas diferentes espécies animais, na formação do sangue e na formação de uma série de enzimas cúpricas (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; GATTÁS; BARBOSA, 2004). Nos animais monogástricos, em geral, o cobre é pouco absorvido, em torno de 15 – 30% do ingerido nos animais jovens e 5 – 10% nos animais adultos, sendo no duodeno o principal sitio de absorção (MCDOWEL, 1992). A absorção de cobre ocorre primariamente no duodeno e na porção anterior do jejuno, e pode ser armazenado em pequenas concentrações nos diferentes tecidos como os rins, o coração e o cérebro, sendo o principal órgão armazenador o fígado, na forma de metaloproteína (REGINA; BERTECHINI, 2010), tornando o órgão um indicador altamente sensível para determinar a biodisponibilidade de cobre entre as várias fontes do mineral (AMMERMAN; BAKER; LEWIS, 1995).

Na alimentação animal, o cobre pode ser encontrado na forma inorgânica como carbonato de cobre, óxido de cobre, sulfato de cobre, sulfato de cobre penta hidratado (REGINA; BERTECHINI, 2010), cloreto de cobre tribásico (SHELTON et al., 2011), sendo o sulfato de cobre penta hidratado o mais utilizado no Brasil, por ser considerado padrão e com maior disponibilidade (GATTÁS; BARBOSA, 2004).

Há mais de 40 anos, este elemento vem sendo estudado como promotor do crescimento, principalmente em leitões recém-desmamados, pois quando incluído em níveis farmacológicos, de 125 a 250 mg/kg, estimula o crescimento (DEBSKI, 2016), sendo descrito por Edmonds e Baker (1986) que o excesso de cobre, 650 mg/kg, resulta em prejuízo no ganho de peso e na conversão alimentar. O cobre pode causar toxicidade quando adicionado à dieta por extensos períodos e em níveis maiores que 250 mg/kg, no qual o acúmulo excessivo de cobre no fígado e outros órgãos vitais ocasionam icterícia e níveis reduzidos de hemoglobina (NRC, 2012). A dose mais utilizada em estudos com cobre é a de 250 mg/kg, já

que nessa dosagem o cobre parece modificar a composição da população bacteriana no trato gastrointestinal (DEBSKI, 2016).

O mecanismo de ação pelo qual os efeitos benéficos da suplementação do cobre em níveis farmacológicos ocorrem ainda é incerto (NRC, 2012; MA et al., 2015). Uma possível explicação seria o efeito antimicrobiano, com redução na carga microbiana e nos respectivos metabólitos produzidos no intestino, permitindo deste modo o maior aproveitamento dos nutrientes (JENSEN, 2016). E, também, atuação como agente antibacteriano ao modificar quantitativamente algumas populações bacterianas gram positivas no intestino (ZHAO et al., 2014). Outros autores afirmam que a ação poderia estar relacionada ao efeito sistêmico, no qual a injeção intravenosa de cobre estimula o crescimento dos leitões desmamados possivelmente ao causar impacto na população de bactérias no lúmen semelhante à suplementação dietética (ZHOU et al., 1994; ZHAO et al., 2014). Estudos desenvolvidos por Li et al. (2008) demonstraram que o cobre parece estimular o apetite, promovendo aumento na concentração de neuropeptídeo Y (NPY) e na expressão de RNA mensageiro de NPY em nível hipotalâmico em suínos suplementados com 125 e 250 mg/kg em comparação a 10 mg/kg de sulfato de cobre na dieta, e, conseqüentemente, eleva o desempenho dos animais. Em concordância, Zhu et al. (2011) obtiveram aumento da ingestão de ração ao suplementarem a dieta de leitões desmamados por 21 dias com 250 mg/kg de sulfato de cobre, devido ao aumento dos níveis de expressão de RNAm de NPY no hipotálamo.

Outro efeito da adição do cobre é a melhora da consistência fecal dos leitões desmamados, que pode ser mediado por um efeito na atividade enzimática e na digestibilidade dos nutrientes (LUO; DOVE, 1996). Em estudo de Bikker, Jongbloed e Baal (2016), leitões suplementados com 160 mg/kg de sulfato de cobre durante o período de creche obtiveram melhora do desempenho e da consistência fecal. A ocorrência de fezes menos pastosas é um efeito relevante por possibilitar a redução do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento ou de uso terapêutico (BIKKER; JONGBLOED; BAAL, 2016).

De acordo com Ma et al. (2015), o uso de cobre em níveis elevados pode inibir coliformes e possíveis agentes patogênicos (HØJBERG et al., 2005), pode contribuir na melhoria da saúde intestinal ao aumentar a altura das vilosidades e reduzir a profundidade da cripta, e conseqüentemente a proporção vilosidade : cripta no duodeno e no jejuno (ZHAO et al., 2007). Podendo, dessa maneira, especular que o cobre atua como agente antibacteriano, mas também modifica a morfologia intestinal para melhorar a saúde intestinal.

2.2.2 Zinco

A exigência nutricional de zinco para leitões na fase de creche segundo o NRC (1998; 2012) é de 80 a 100 mg/kg, e de acordo com Rostagno et al. (2017) é de 61,6 a 117,4 mg/kg. O zinco é um nutriente essencial que desempenha inúmeras funções em várias atividades enzimáticas, no metabolismo de lipídios e glicose (LI et al., 2016). O zinco também está envolvido no metabolismo das proteínas, dos carboidratos, dos nucleotídeos e da vitamina A, sendo necessário na calcificação dos ossos e no desenvolvimento do sistema imunológico (YAGÜE, 2009) e também na produção e secreção de hormônios de crescimento, insulina e hormônios sexuais (LI et al., 2016). E, ainda, o zinco participa da regulação do apetite que pode envolver a expressão gênica, sendo observado em leitões deficientes em zinco o aumento na expressão gênica de colecistoquinina no intestino, levando a redução no consumo (FURLAN; POZZA, 2014) e aumento na secreção de grelina gástrica, responsável por estimular o apetite (ZHANG; GUO, 2008). E também, o zinco atua sinergicamente com o mineral manganês na mineralização óssea (PACHECO, 2012; CARDONA, 2014).

Existem muitos fatores que podem influenciar a absorção de zinco, podendo ser considerados ativadores ou inibidores deste processo. Entre os ativadores da absorção estão o ácido picolínico, secretado pelo pâncreas, a vitamina B6 que aumenta a secreção de ácido picolínico, o citrato e aminoácidos como glicina, histidina, lisina e metionina. No grupo dos inibidores da absorção estão os ácidos: oxálico e fítico, os taninos, a fibra, o selênio, o ferro, o cobre e o cálcio em quantidades elevadas. A eficiência do processo de absorção está entre 15 a 40%. Portanto, o zinco é pouco absorvido, sendo excretado em grande proporção pelas fezes (KIEFER, 2005). Os níveis de zinco nos ossos e as taxas de absorção pelo fígado mostram-se como critérios confiáveis para estimar a biodisponibilidade relativa do zinco de acordo com o que foi adicionado na dieta (AMMERMAN; BAKER; LEWIS, 1995).

A toxicidade do zinco depende da fonte, nível da dieta, duração da alimentação e dos níveis de outros minerais na dieta. O nível alimentar máximo tolerável para suínos foi estabelecido em 1000 mg/kg, com exceção do óxido de zinco, que pode ser incluído em níveis mais elevados durante várias semanas (NRC, 2012). O zinco pode ser encontrado nas formas de óxido de zinco, carbonato de zinco, sulfato de zinco, sulfato de zinco penta-hidratado (REGINA; BERTECHINI, 2010) e cloreto de zinco tetrahidratado (ZHANG; GUO, 2007).

O uso do zinco na forma inorgânica de óxido de zinco é comum em sistemas de criação de suínos como melhorador de desempenho, devido ao baixo custo e por ser eficiente no controle da diarreia pós desmame (MUNIZ et al., 2010).

Altas concentrações de óxido de zinco reduzem a incidência de diarreia, melhora o desempenho dos leitões e também desenvolve melhor capacidade de resistência a doenças (BORAH; PAUL, 2018). Segundo os autores, o uso do zinco na dieta aumenta o desempenho dos animais ao ativar os vários sistemas enzimáticos essenciais para a divisão e proliferação celular.

De acordo com Carlson, Hill e Link (1999), à medida que se eleva a concentração de zinco na dieta, aumenta a quantidade de zinco ligado à metalotioneína intestinal, proteína envolvida na homeostase desse mineral e nas alterações fisiológicas do trato gastrointestinal, podendo resultar em aumento da absorção dos nutrientes e alteração da morfologia do intestino, podendo dessa forma, ser um possível mecanismo de ação responsável pelo aumento do desempenho dos leitões desmamados suplementados com doses farmacológicas de zinco.

O mecanismo de ação do zinco contra a diarreia ainda não é bem compreendido. É provável que a adição do zinco em níveis farmacológicos afete não só a morfologia intestinal, mas também os mecanismos de defesa do hospedeiro (DEBSKY, 2016). Também foi verificado efeito na diminuição da diarreia associado à redução da permeabilidade intestinal (ZHANG, GUO, 2009) e inibição e/ou redução da atividade da *E. coli* ao interagir com íons de zinco (ARANTES et al., 2005).

E, é possível que a absorção de zinco no intestino possa ocorrer por difusão passiva, e, indiretamente, eleve a função de barreira intestinal como mecanismo de proteção do epitélio. Além disso, a metalotioneína induzida pelo acúmulo de zinco no tecido intestinal também pode proteger o tecido do dano oxidativo (CHAI et al., 2014) e a suplementação com óxido de zinco pode estabilizar a flora intestinal e manter a alta diversidade de coliformes, ocasionando competição ativa para colonizar os receptores de cepas diarreicas (KATOULI et al., 1999).

De acordo com Debski (2016), apenas altas doses farmacológicas (2000-3000 mg/kg) de óxido de zinco são eficientes para o tratamento da diarreia, demonstrado por Chai et al. (2014) ao suplementar a dieta com 2500 mg/kg de óxido de zinco e obter melhora na consistência fecal e maiores pesos corporais nos leitões em comparação aos níveis médio e baixo de zinco, 1500 e 50 mg/kg respectivamente.

O óxido de zinco pode ser adicionado em substituição aos antibióticos utilizados como promotores de crescimento em leitões desmamados. Porém, a inclusão de altas doses de óxido de zinco na dieta de suínos causa aumento da excreção de zinco nos dejetos, ocasionando preocupante ameaça ao meio ambiente (HEO et al., 2013). Além de levar à poluição ambiental pelo excesso de minerais eliminados nas fezes (CONDÉ et al., 2014), também

deve-se destacar que os níveis elevados de minerais podem causar competição entre si e causar redução da biodisponibilidade de outros nutrientes na dieta e no animal (LEESON; SUMMERS, 1997).

O zinco tende a se acumular no solo e pode causar grave poluição ambiental, especialmente em áreas de criações intensivas de suínos, já que se trata de um metal pesado. A preocupação ambiental se relaciona com os lençóis freáticos, drenagem e escoamento para águas superficiais, e por fim, acúmulo na camada superficial do solo em concentrações potencialmente tóxicas para os organismos habitantes (DEBSKI, 2016). Segundo Milani (2016), 60 a 80% da quantidade óxido de zinco ingerida é excretada. Então quanto maior a quantidade de zinco consumida, maior a excreção de zinco nos dejetos suínos.

Soma-se a isso outro fator agravante que é a possibilidade de aumento da resistência de alguns microrganismos quando expostos por períodos prolongados a doses farmacológicas de zinco. Isso ocorre devido aos minerais proporcionarem pressão seletiva sobre bactérias resistentes a antimicrobianos, como é o caso do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (SLIFIERZ; FRIENDSHIP; WEESE, 2014; DEBSKI, 2016). Quanto ao MRSA, embora raramente seja um patógeno clinicamente relevante em suínos, sua transmissão para seres humanos pode representar riscos para a saúde (CASEY et al., 2013) por ser causador de infecções cutâneas e de tecidos moles, pneumonia e bacteremia (SLIFIERZ; FRIENDSHIP; WEESE, 2014). E ainda, destaca-se a importância por dar enfoque à preocupação com genes metalo-resistentes em bactérias gram-negativas, que é o caso da *E. coli*, demonstrando a necessidade de mais pesquisas no futuro próximo (MAVROMICHALIS, 2011).

Como relatado anteriormente, um dos agentes patogênicos mais importantes em leitões desmamados é a *E. coli*, que se caracteriza pelas cepas multirresistentes aos antimicrobianos. Em estudo de Bednorz et al. (2013), foi observado maior diversidade de clones de *E. coli* em animais suplementados com zinco em comparação ao controle, comprovando o risco do uso de altos níveis de óxido de zinco. Lima (2017), verificou que a exposição a 2500 mg/kg de óxido de zinco por quatro semanas aumentou a resistência de alguns microrganismos, inclusive a *E. coli* multirresistente em leitões (BEDNORZ et al., 2013).

Os fatores acima descritos motivaram a legislação europeia a atender apenas às exigências nutricionais dos animais, limitando a adição de óxido de zinco em apenas 150 mg de Zn/kg de ração (MILANI, 2016). E, atualmente, com a crescente preocupação foi elaborada a proposta pelo Comitê dos Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP) de banir o uso farmacológico do óxido de zinco em leitões desmamados na União Europeia nos

próximos anos (WILCOCK et al., 2017). Nesse contexto, destaca-se a necessidade de medidas imediatas de inclusão do óxido de zinco em níveis inferiores aos comumente praticados.

2.3 ASSOCIAÇÃO DE COBRE E ZINCO

O óxido de zinco permanece como uma fonte mineral importante por possuir melhor valor econômico e eficiência, sendo válido buscar como possível alternativa a inclusão de menores níveis de óxido de zinco na dieta de leitões recém-desmamados.

É possível que a associação de menores níveis de óxido de zinco com o sulfato de cobre seja uma boa alternativa, já que ambos atuam como promotores de crescimento devido às suas atividades antimicrobianas semelhantes às dos antibióticos, na medida em que a microbiota intestinal é alterada para reduzir a perda de nutrientes da fermentação e suprimir os agentes patogênicos intestinais (YAZDANKHAH; RUDI; BERNHOFT, 2014).

Ressalta-se que a distribuição do cobre no fígado é susceptível as mudanças na quantidade de zinco nos suínos (BREMNER, 1976), já que o zinco dietético estimula a produção de metalotioneína, e essa proteína por sua vez, tem maior afinidade pelo cobre. Uma vez que a metalotioneína está conjugada ao cobre, o mineral não é liberado na corrente sanguínea e é eliminado nas fezes, reduzindo as reservas de cobre no organismo (SILVA, 2015).

Diante disso, os resultados da associação de zinco e cobre são contraditórios, Smith et al. (1997) mostraram que animais suplementados com 3000 mg/kg de óxido de zinco apresentaram as maiores taxas de ganho de peso, mas não foi observado efeito aditivo com a suplementação de 250 mg/kg de sulfato de cobre. Resultados semelhantes foram observados por Hill et al. (2000) ao suplementarem com 3000 mg/kg de óxido de zinco durante 28 dias, obtiveram melhora no ganho de peso, no consumo de ração e na eficiência alimentar. E a adição de 250 mg/kg de sulfato de cobre também estimulou o crescimento, entretanto, a combinação dos dois minerais não resultou em resposta sinérgica no crescimento.

Em contrapartida, Namkung et al. (2006) observaram que a adição de 3000 mg/kg de óxido de zinco associado a 250 mg/kg de sulfato de cobre à dieta melhorou o desempenho durante as duas primeiras semanas após o desmame. Também Pérez et al. (2011) demonstraram que nos 4 experimentos realizados, houve efeito aditivo no desempenho dos leitões desmamados ao associarem cobre e zinco (3000 mg/kg de óxido de zinco associado tanto ao sulfato de cobre quanto ao complexo cobre-aminoácidos em 100, 250 ou 315 mg/kg).

Os autores discutem que os efeitos aditivos do zinco e do cobre ocorrem por meio da soma de seus efeitos como promotores de crescimento: atuação de ambos no intestino ao disponibilizar mais nutrientes para o organismo, modo de ação sistêmico do cobre, aumento da estabilidade intestinal e redução de bactérias patogênicas.

Por outro lado, Højberg et al. (2005) não obtiveram efeito significativos ao avaliarem os efeitos da inclusão de diferentes níveis de óxido de zinco e sulfato de cobre, provavelmente devido a necessidade de avaliar os efeitos dos minerais no desempenho com número amostral maior (8 leitões por tratamento). Hedemann et al. (2006) ao associarem esses minerais na dieta de leitões recém-desmamados não observaram efeito no ganho de peso com níveis de óxido de zinco - 100 e 2500 mg/kg - e 175 mg/kg de sulfato de cobre, provavelmente devido ao fato de usar gaiola metabólica, os animais não tiveram socialização e também houve reduzida exposição à infecção, o que possivelmente pode ter reduzido as repostas aos níveis destes minerais.

HIPÓTESES

3. HIPÓTESES

Diante do exposto e baseado nos resultados advindos da literatura foram sugeridas as seguintes hipóteses:

- a) os leitões suplementados com a associação do sulfato de cobre e menores níveis de óxido de zinco apresentam desempenho, frequência de dias com diarreia e morfometria intestinal semelhantes aos leitões suplementados com níveis praticados comercialmente dos 21 aos 63 dias de idade;
- b) os níveis de zinco associados ao sulfato de cobre não interferem na absorção de cobre hepático e na concentração de zinco e manganês na tibia de leitões aos 63 dias de idade em comparação aos animais que foram alimentados com óxido de zinco em níveis superiores.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Com base na literatura apresentada e nas hipóteses estabelecidas, o presente estudo buscou alcançar os seguintes objetivos:

- a) averiguar se a associação do sulfato de cobre, com menores níveis de óxido de zinco na dieta, mantém semelhante o desempenho de leitões dos 21 aos 63 dias de idade;
- b) avaliar se a frequência de dias com diarreia é semelhante nos leitões que receberam sulfato de cobre associado ao menor nível de óxido de zinco na dieta em comparação aos que receberam níveis elevados, dos 21 aos 63 dias de idade;
- c) determinar se os leitões que receberam a associação do sulfato de cobre com menores níveis de óxido de zinco na dieta apresentam integridade intestinal semelhante aos animais que foram alimentados com óxido de zinco em níveis superiores, na avaliação da morfometria intestinal;
- d) verificar se o fornecimento do sulfato de cobre associado com menores níveis de óxido de zinco na dieta reduz a concentração de cobre no fígado, de zinco e manganês na tíbia de leitões aos 63 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta sessão estão descritas as metodologias empregadas para a execução do presente trabalho, e que por sua vez, contribuíram para o alcance do objetivo e posicionamento diante das hipóteses, previamente apresentadas.

5.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), pertencentes à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Campus Pirassununga. Os leitões foram alojados na unidade de creche constituída de 2 salas idênticas com 16 gaiolas de alvenaria suspensas com piso parcialmente ripado, metragem de 1,40 m²/5 leitões, composto de comedouro semiautomático e bebedouro tipo chupeta.

O aquecimento das salas durante as primeiras semanas de alojamento foi realizado por meio de lâmpadas infravermelhas (Figura 1) visando garantir o conforto térmico dos leitões. Durante todo o período experimental a temperatura máxima, mínima e ambiente das salas foram registradas com auxílio de termo higrômetro digital (Incoterm®).

Figura 1 – Alojamento dos leitões na sala de creche do Laboratório de Pesquisa em Suínos (FMVZ-USP)



Fonte: MENDONÇA, M. V. (2017).

5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS NOS TRATAMENTOS E MANEJO ALIMENTAR

Os 80 leitões recém-desmamados aos 21 dias de idade foram blocados pelo peso, e distribuídos em 2 tratamentos, sendo 8 repetições por tratamento com 5 leitões cada. Os tratamentos consistiram na inclusão de 180 mg/kg de sulfato de cobre em todas as fases. As dietas experimentais foram isoproteicas e isoenergéticas e seguiram as recomendações de Rostagno et al. (2017), de acordo com as diferentes fases: Pré-inicial: T1, 3000 mg/kg ZnO + CuSO₄; T2, 2500 mg/kg ZnO + CuSO₄; Inicial 1: T1, 2500 mg/kg ZnO + CuSO₄; T2, CuSO₄ (sem inclusão de ZnO); e na Inicial 2: T1 e T2, 100 mg/kg ZnO + CuSO₄ (Tabela 1).

Durante a creche foram fornecidas as seguintes rações: Pré-Inicial dos 21 aos 35 dias de idade; Inicial 1 dos 36 aos 49 dias de idade e Inicial 2 dos 50 aos 63 dias de idade. A formulação dessas dietas foi semelhante para todos os tratamentos (Tabela 1) e fornecida *ad libitum*.

Tabela 1 – Dietas fornecidas aos leitões durante o período experimental (Continua)

| Ingredientes | Pré-inicial | | Inicial 1 | | Inicial 2 | |
|----------------------------------------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 |
| Milho | 375,53 | 376,16 | 446,16 | 449,28 | 639,16 | 639,16 |
| Farelo de soja | 120,00 | 120,00 | 200 | 200 | 320 | 320 |
| Concentrado ¹ | 500,00 | 500,00 | 350 | 350 | - | - |
| Núcleo ² | - | - | - | - | 40 | 40 |
| Óxido de zinco ³ | 3,75 | 3,12 | 3,12 | - | 0,12 | 0,12 |
| Sulfato de cobre pentahidratado ⁴ | 0,72 | 0,72 | 0,72 | 0,72 | 0,72 | 0,72 |
| Total | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Níveis nutricionais calculados | | | | | | |
| Energia metabolizável (Kcal/kg) | 3450 | 3450 | 3380 | 3380 | 3200 | 3200 |
| Energia digestível (Kcal/kg) | 3610 | 3610 | 3560 | 3560 | 3360 | 3360 |
| Proteína bruta (%) | 20,3 | 20,3 | 21 | 21 | 20 | 20 |
| Extrato etéreo (%) | 3,30 | 3,30 | 3,2 | 3,2 | 3,0 | 3,0 |
| Cinzas (%) | 5,06 | 5,06 | 4,5 | 4,5 | 6,2 | 6,2 |
| Cálcio (%) | 1,05 | 1,05 | 0,78 | 0,78 | 0,82 | 0,82 |
| Fósforo (%) | 1,08 | 1,08 | 0,87 | 0,87 | 0,65 | 0,65 |

Tabela 1 – Dietas fornecidas aos leitões durante o período experimental (Conclusão)

| | | | | | | |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| Fósforo disponível (%) | 0,90 | 0,90 | 0,68 | 0,68 | 0,43 | 0,43 |
| Sódio (%) | 0,33 | 0,33 | 0,24 | 0,24 | 0,22 | 0,22 |
| Cobre (mg/kg) | 180 | 180 | 180 | 180 | 180 | 180 |
| Zinco (mg/kg) | 3000 | 2500 | 2500 | - | 100 | 100 |
| Lisina (%) | 1,6 | 1,6 | 1,5 | 1,5 | 1,15 | 1,15 |
| Metionina (%) | 0,53 | 0,53 | 0,48 | 0,48 | 0,378 | 0,378 |
| Metionina + Cisteína (%) | 0,89 | 0,89 | 0,85 | 0,85 | 0,7 | 0,7 |
| Treonina (%) | 1,07 | 1,07 | 1 | 1 | 0,79 | 0,79 |
| Triptofano (%) | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,27 | 0,27 |
| Lactose (%) | 12,5 | 12,5 | 8,8 | 8,8 | - | - |

Fonte: MENDONÇA, M. V. (2018).

¹ Concentrado BRSUI Flex® (níveis por quilo de produto): umidade (130000mg/kg), proteína bruta (190000mg/kg), extrato etéreo (23000mg/kg), fibra bruta (16100mg/kg), matéria mineral (99600mg/kg); cálcio (13340mg/kg), fósforo (8200mg/kg), flúor (82mg/kg), sódio (6700mg/kg), metionina (6000mg/kg), lisina (20000mg/kg), treonina (13100mg/kg), carnitina (230mg/kg), nucleotídeos (212,4mg/kg), colina (1100 mg/kg), cobalto (1mg/kg), ferro (200mg/kg), iodo (2,5mg/kg), manganês (87,5mg/kg), selênio (1125mg/kg), vitamina A (9375mg/kg), vitamina D3 (168,75g/kg), vitamina E (125,8125mg/kg), vitamina K3 (7,5mg/kg), vitamina B1 (6,25mg/kg), vitamina B2 (15mg/kg), vitamina B6 (7,5 mg/kg), vitamina B12 (75mg/kg), niacina (87,5mg/kg), ácido pantotênico (50mg/kg), ácido fólico (7,5mg/kg), biotina (0,875mg/kg), ácido cítrico (4416,305mg/kg), formiato de cálcio (1599mg/kg), propionato de cálcio (157,85mg/kg), ácido fórmico (785,509mg/kg), ácido fosfórico (428,145mg/kg), butirato de sódio (1250mg/kg), endo-1,4-beta xilanose ($6,227 \times 10^{-18}$ mg/kg), 6-fitase ($4,151 \times 10^{-18}$ mg/kg), halquinol (300mg/kg).

² Núcleo BRSUI Nucleus Initial® (níveis por quilo de produto): cálcio (155000mg/kg), fósforo (36000mg/kg), flúor (360mg/kg), sódio (48000mg/kg), metionina (980mg/kg), lisina (15500mg/kg), treonina (985mg/kg), colina (800mg/kg), cobalto (10mg/kg), ferro (2000mg/kg), iodo (25mg/kg), manganês (875mg/kg), selênio (11,250mg/kg), vitamina A (75000mg/kg), vitamina D3 (1250mg/kg), vitamina E (418,75mg/kg), vitamina K3 (55mg/kg), vitamina B1 (50mg/kg), vitamina B2 (112,500mg/kg), vitamina B6 (62,500mg/kg), vitamina B12 (625mg/kg), niacina (750mg/kg), ácido pantotênico (450mg/kg), ácido fólico (62,500mg/kg), biotina (6,250mg/kg), B.H.T (2500mg/kg), 6-fitase ($4,151 \times 10^{-17}$), endo-1,4- beta xilanase ($4,670 \times 10^{-14}$ mg/kg), colistina (1000mg/kg).

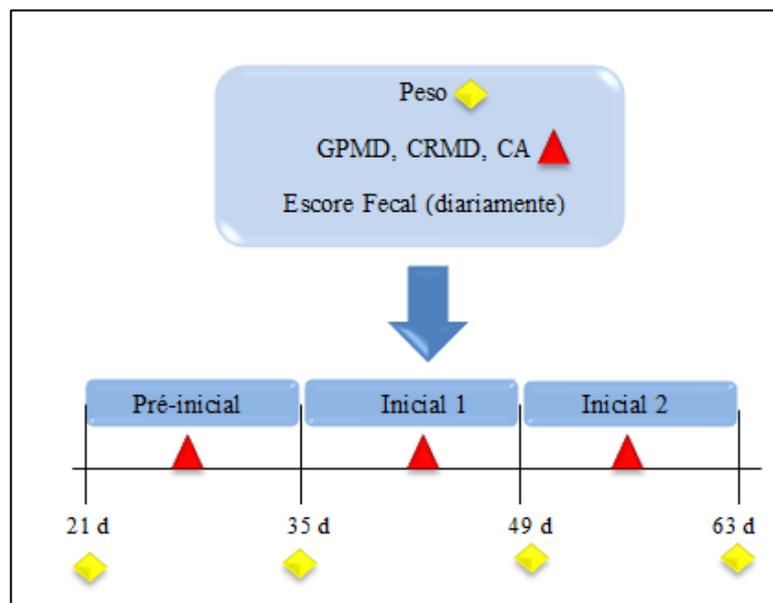
³ Óxido de zinco SUL® (80% de Zinco).

⁴ Sulfato de cobre pentahidratado Microsal® (25% de Cobre).

5.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS LEITÕES

Averiguou-se o peso aos 21, 35, 49 e 63 dias de idade, bem como o ganho de peso médio diário (GPMD), o consumo de ração médio diário (CRMD) e a conversão alimentar (CA) nos períodos compreendidos entre as trocas das dietas, conforme o fluxograma apresentado na figura 2.

Figura 2 – Esquema experimental das avaliações de desempenho e escore fecal



Fonte: MENDONÇA, M. V. (2018).

5.4 FREQUÊNCIA DE DIAS COM DIARREIA

O escore fecal foi observado diariamente dos 21 aos 63 dias de idade e classificado em: 1 = fezes sólidas - *normal*; 2 = fezes menos consistentes que normal - *pastosa* e 3 = fezes líquidas - *diarreia severa* (Figura 3). A classificação levou em consideração quando dois ou mais animais da mesma baia apresentavam o maior escore. Posteriormente, esse escore foi transformado em frequência de dias com diarreia, considerando diarreia a somatória dos escores 2 e 3. As frequências foram transformadas em arco seno, de acordo com Banzatto e Kronka (1989).

Figura 3 – Escore fecal dos leitões



Fonte: MENDONÇA, M. V. (2017).

1= fezes normais. 2 = fezes pastosas. 3 = fezes líquidas (círculo vermelho).

5.5 MORFOMETRIA INTESTINAL

Aos 63 dias de idade, 8 animais de cada tratamento foram insensibilizados por meio de eletronarcose com choque elétrico de alta voltagem e baixa amperagem, seguido por sangria de no mínimo três minutos para a coleta do intestino no abatedouro escola da Universidade de São Paulo em Pirassununga-SP. Foram colhidas amostras de aproximadamente três centímetros de comprimento do duodeno, jejuno e íleo. A porção do duodeno foi coletada aproximadamente a cinco centímetros do piloro, a porção do jejuno foi coletada a cerca de 20 centímetros de distância da prega duodenocólica e o íleo foi coletado a 5 centímetros da junção ileocecal. As amostras foram seccionadas, lavadas delicadamente com água corrente, na sequência foram imediatamente estendidas e mergulhadas em solução de formaldeído a 10%, conforme a figura 4. Após 24 horas os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool etílico a 70° GL, processo que inicia a fixação das amostras (FERRIN, 2015).

Figura 4 – Amostras para avaliação da morfometria intestinal



Fonte: MENDONÇA, M. V. (2017).

A) Secção da porção intestinal. B) Amostra estendida para posterior lavagem (figura C). D) Amostras de duodeno, jejuno e íleo armazenadas em formaldeído a 10%.

Após a fixação, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina, sendo mergulhados sequencialmente nas seguintes soluções: álcool etílico a 70° GL, álcool etílico a 90° GL, álcool absoluto I, álcool absoluto II, xilol I, xilol II, parafina I e parafina II, permanecendo uma hora em cada uma destas soluções. Após a inclusão, os blocos foram resfriados por 24 horas em freezer a -20° C e então o corte foi realizado com cinco micrometros de espessura com auxílio de micrótomo. Os cortes foram acomodados em lâminas para microscopia e encaminhadas a estufa onde permaneceram a aproximadamente 60° C por duas horas para a remoção do excesso de parafina.

Para a coloração os cortes foram desparafinados e desidratados, permanecendo por 10 minutos em xilol I e em seguida mais 10 minutos em xilol II e então foram mergulhados em álcool etílico 95° GL, álcool etílico 70° GL e água permanecendo por três minutos em cada uma destas soluções, nesta ordem. A coloração dos cortes foi realizada na sequência, para tanto, estes foram mergulhados em hematoxilina por dois minutos e em seguida em eosina por 45 segundos, após este processo foram lavados em água corrente por dez minutos para remoção do excesso dos pigmentos.

Para a montagem das lâminas, os cortes já corados foram desidratados, sendo mergulhados nesta ordem por aproximadamente dez segundos em álcool etílico 95° GL, álcool absoluto I, álcool absoluto II, solução álcool etílico absoluto e xilol na proporção 1:1, xilol diafanizador e então os mesmos foram mergulhados em xilol montável. As lâminas e seus respectivos cortes foram retirados do xilol montável, realizou-se a secagem do excesso de xilol do verso das lâminas e então as lamínulas foram colocadas sobre os cortes (PEKAS, 1986).

Os cortes foram examinados sob microscopia de luz, com o auxílio de um microscópio Nikon modelo Eclipse Ni-U 80i[®] (Nikon Instruments Inc., Melville, NY), acoplado a câmara Nikon DigitalSight DS R11[®] (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) e para documentação das imagens e mensuração dos parâmetros analisados foi utilizado o *software* NIS Elements AR 4 13.01[®] (Nikon Instruments Inc., Melville, NY). As análises foram realizadas sob um aumento de 100x (Figura 5).

Figura 5 – Mensuração da altura de vilosidade (vermelho) e profundidade de cripta (verde) do jejuno



Fonte: MENDONÇA, M. V. (2018).

Foram efetuadas dez medidas de altura de vilosidade (AV) e dez medidas de profundidade de cripta (PC) para cada seguimento coletado, o que possibilitou a obtenção da relação (AV:PC). Para as medições utilizou-se somente vilosidades íntegras que foram medidas em sequência, procurou-se medir a profundidade de cripta próximas a estas vilosidades. A medida de altura de vilosidade foi tomada a partir da região basal, que coincide com a porção superior das criptas percorrendo a vilosidade longitudinalmente até o ápice. As criptas foram mensuradas da base até a região de transição cripta-vilosidade.

5.6 CONCENTRAÇÃO DE COBRE E ZINCO

5.6.1 Dieta

Amostras das matérias primas e dietas experimentais fornecidas aos animais durante as fases pré-inicial, inicial 1 e inicial 2 foram analisadas para determinar a concentração dos minerais cobre, manganês e zinco presentes na dieta por meio de solução mineral via úmida (ZHENG et al., 2018) e espectrometria de emissão óptica (ICP-OES) (MÉTODOS...,2013). As amostras foram descongeladas e pesadas em ± 1 grama de acordo com o tratamento e fase

em tubos de ensaio. Posteriormente foi feita adição de 5 ml de ácido nítrico e 3 ml de ácido perclórico para a digestão (Figura 6). E então, os tubos foram aquecidos de 50° a 210° C e as amostras transferidas para balões volumétricos de 25 ml (MÉTODOS...,2013).

Figura 6 – Metodologia utilizada para análise dos minerais na dieta



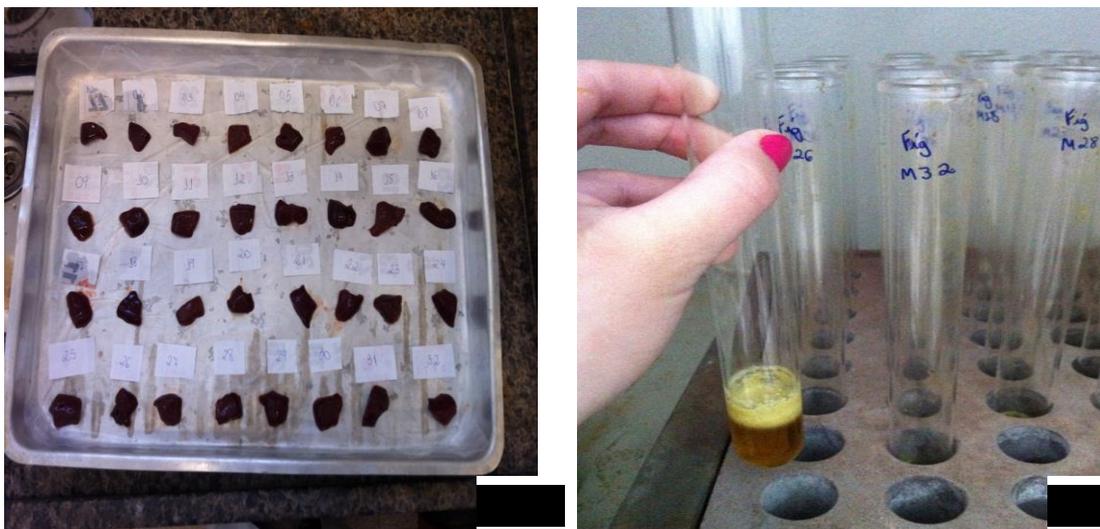
Fonte: MENDONÇA, M. V. (2017).

A) Separação da amostra para análise. B) Amostra de ração com a adição de 3 ml de ácido perclórico para solução mineral via úmida.

5.6.2 Fígado e Tíbia

Após o abate dos animais, também foram colhidas amostras de fígado e tíbia. As amostras de lobo hepático lateral direito e tíbia direita foram identificadas, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas no freezer -80°C. As análises de fígado avaliaram a concentração de cobre por meio de solução mineral via úmida. As amostras foram descongeladas e seccionadas em pequenas porções identificadas (Figura 7, A). Os fragmentos de fígado foram pesados em tubos de ensaio (± 2 g) e em seguida foi feita adição de 5 ml de ácido nítrico e 3 ml de ácido perclórico para a digestão (ZHENG et al., 2018). Posteriormente, os tubos foram aquecidos de 50° a 210° C (Figura 7, B) e as amostras transferidas para balões volumétricos de 25 ml para análise do cobre por espectrometria de emissão óptica (ICP-OES) (MÉTODOS...,2013).

Figura 7 – Metodologia utilizada para análise laboratorial de cobre no fígado



Fonte: MENDONÇA, M. V. (2017).

A) Fígado seccionado em pequenas porções para posterior pesagem e digestão via úmida. B) Amostras de fígado em aquecimento de 50° a 210° C.

Já a análise da tibia avaliou concentração dos minerais zinco e manganês por meio da solução mineral via seca, no qual as amostras foram descongeladas para pesagem dos fragmentos ósseos. As amostras foram colocadas na mufla a 550° durante 4 horas para secagem. Logo após, adicionou-se 20 ml de ácido clorídrico (HCl 1:1) durante 20 minutos, conforme a figura 8, então as misturas foram despejadas em balões volumétricos de 50 ml por meio de funil com papel filtro. Por fim, as amostras foram homogeneizadas e as análises dos minerais zinco e manganês foram determinadas por espectrometria de emissão óptica (ICP-OES) (MÉTODOS...,2013).

Figura 8 – Metodologia utilizada para análise laboratorial dos minerais na tibia



Fonte: MENDONÇA, M. V. (2017).

A) Fragmentos de tibia descongelados. B) Amostras de tibia na mufla. C) Após retirada da mufla. D) Adição de 20 ml de ácido clorídrico por 20 minutos.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados com prévia verificação da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. O delineamento foi em blocos casualizados, sendo a sala e o peso considerados como bloco. Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC MIXED), empregando-se o programa SAS (v. 9.3). As frequências foram transformadas em arco seno, de acordo com Banzatto e Kronka (1989). Os efeitos de tratamento e de dias foram analisados pelo PDIFF e o nível de significância considerado foi de 5%. Todos os valores foram expressos em média \pm desvio-padrão.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

Nesta sessão estão descritas os resultados encontrados no presente trabalho.

6.1 DESEMPENHO

O desempenho (peso, GPMD, CRMD e CA) dos leitões não foi influenciado pelos tratamentos nos dias avaliados ($P > 0,05$), assim como também não houve efeito de tratamento ($P > 0,05$) em nenhuma das características analisadas. Ao longo dos dias, os leitões independentemente do tratamento apresentaram aumento nas características de desempenho ($P < 0,05$, Tabela 2).

Ao desconsiderarmos os animais medicados com antimicrobianos durante o período experimental, não foi observado diferença significativa no desempenho entre os animais dos tratamentos 1 e 2.

Tabela 2 – Desempenho dos leitões dos 21 aos 63 dias (Continua)

| Item | Tratamento | | Médias ¹ | Probabilidades | | |
|-------------------|------------|------------|-------------------------|----------------|--------|-----------------|
| | T1 | T2 | | Tratamento | Dias | Tratamento*Dias |
| Peso (kg) | | | | | | |
| Dia 21 | 5,69±1,10 | 5,69±1,09 | 5,68±1,03 ^d | | | |
| Dia 35 | 8,29±1,43 | 8,50±1,67 | 8,36±1,52 ^c | 0,7678 | <,0001 | 0,9554 |
| Dia 49 | 14,67±1,81 | 14,81±2,39 | 14,70±2,19 ^b | | | |
| Dia 63 | 23,09±2,79 | 23,34±3,15 | 23,19±2,86 ^a | | | |
| | | | | | | |
| GPMD (g/d) | | | | | | |
| 21-35 | 0,19±0,03 | 0,20±0,06 | 0,19±0,05 ^c | 0,5475 | <,0001 | 0,8104 |
| 35-49 | 0,47±0,05 | 0,47±0,07 | 0,47±0,07 ^b | | | |
| 49-63 | 0,57±0,05 | 0,59±0,06 | 0,58±0,05 ^a | | | |
| 21-63 | 0,38±0,04 | 0,39±0,06 | 0,39±0,05 | | | |
| CRMD (g/d) | | | | | | |
| 21-35 | 0,26±0,04 | 0,28±0,08 | 0,27±0,07 ^c | 0,8529 | <,0001 | 0,8014 |
| 35-49 | 0,72±0,09 | 0,70±0,12 | 0,72±0,11 ^b | | | |
| 49-63 | 1,07±0,07 | 1,08±0,14 | 1,08±0,11 ^a | | | |
| 21-63 | 0,81±0,05 | 0,80±0,08 | 0,82±0,07 | | | |

Tabela 2 – Desempenho dos leitões dos 21 aos 63 dias (Conclusão)

| CA | | | | | | |
|-------|-----------|-----------|------------------------|--------|--------|--------|
| 21-35 | 1,40±0,14 | 1,40±0,13 | 1,41±0,13 ^c | | | |
| 35-49 | 1,53±0,10 | 1,51±0,15 | 1,53±0,14 ^b | 0,6704 | <,0001 | 0,9501 |
| 49-63 | 1,91±0,12 | 1,83±0,16 | 1,87±0,14 ^a | | | |
| 21-63 | 0,56±0,09 | 0,43±0,19 | 0,47±0,17 | | | |

Fonte: MENDONÇA, M. V. (2018).

¹ Médias dos dias.

^{abcd} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (PDIFF, P < 0,05).

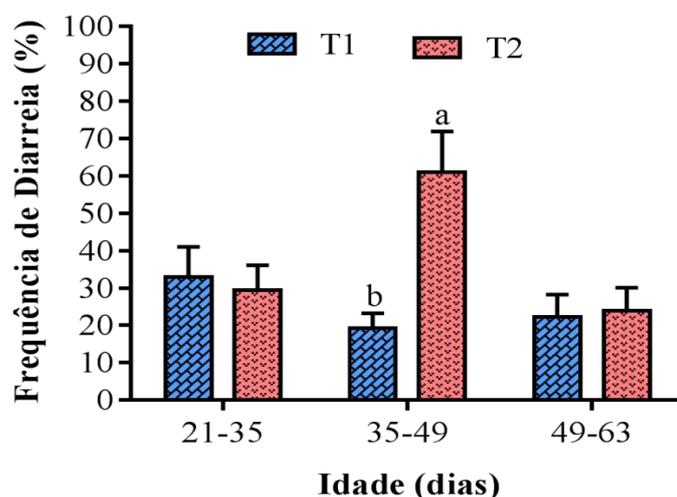
Pré-inicial = T1: 3000 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄;
Inicial 1 = T1: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 180 mg/kg CuSO₄; *Inicial 2* = T1 e T2: 100 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄.

6.2 FREQUÊNCIA DE DIAS COM DIARREIA

Os leitões que não receberam zinco na dieta apresentaram maior frequência de diarreia dos 35 aos 49 dias de idade (P < 0,05), sendo observado no período anterior maior frequência de fezes normais. No período subsequente, houve a recuperação dos animais não sendo detectadas diferenças (Figura 9).

Ao desconsiderarmos os animais medicados com antimicrobiano durante o período experimental, foi observada incidência de diarreia de 42,50% nos animais do tratamento 1 e de 87,50% nos animais do tratamento 2.

Figura 9 – Frequência de diarreia (%) dos leitões dos 21 aos 63 dias de idade



Fonte: MENDONÇA, M. V. (2018).

^{ab} Letras minúsculas diferentes no mesmo período diferem entre si (PDIFF, $P < 0,05$).

Pré-inicial = T1: 3000 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; *Inicial 1* = T1: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 180 mg/kg CuSO₄; *Inicial 2* = T1 e T2: 100 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄.

6.3 MORFOMETRIA INTESTINAL

As características de morfometria intestinal (altura das vilosidades, profundidade das criptas e na relação altura das vilosidades: profundidade das criptas), nos segmentos duodeno, jejuno e íleo, não foram influenciadas pelos minerais que os leitões receberam na dieta ($P > 0,05$, Tabela 3).

Tabela 3 – Morfometria intestinal do duodeno, jejuno e íleo dos leitões aos 63 dias de idade

| Item | Tratamento | | Probabilidade |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|
| | T1 | T2 | |
| Duodeno (µm) | | | |
| PC | 485,40±25,96 | 442,92±79,93 | 0,7025 |
| AV | 356,68±137,71 | 402,57±63,75 | 0,6637 |
| AV:PC | 0,74±0,33 | 0,91±0,11 | 0,4425 |
| Jejuno (µm) | | | |
| PC | 347,86±15,90 | 416,33±139,86 | 0,5457 |
| AV | 338,35±94,87 | 394,93±105,93 | 0,5285 |
| AV:PC | 0,97±0,27 | 1,01±0,33 | 0,7202 |
| Íleo (µm) | | | |
| PC | 267,41±39,56 | 299,67±67,89 | 0,4143 |
| AV | 286,95±77,98 | 351,44±57,42 | 0,2591 |
| AV:PC | 1,10±0,34 | 1,19±0,19 | 0,5564 |

Fonte: MENDONÇA, M. V. (2018).

PC = profundidade da cripta; AV = altura da vilosidade, AV:PC = relação altura da vilosidade:profundidade da cripta.

Pré-inicial = T1: 3000 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄;
Inicial 1 = T1: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 180 mg/kg CuSO₄; *Inicial 2* = T1 e T2: 100 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄.

6.4 DISPONIBILIDADE DE COBRE E ZINCO

Os minerais cobre e zinco fornecidos aos leitões foram analisados nas amostras das dietas, nas fezes, na tibia e no fígado.

6.4.1 Dietas

Os níveis dos minerais cobre e zinco obtidos nas análises das amostras da dieta fornecida aos leitões foram semelhantes aos níveis de inclusão utilizados (Tabela 4).

Tabela 4 – Níveis dos minerais presentes nas amostras das dietas

| Níveis (mg/kg) | Pré-inicial | | Inicial 1 | | Inicial 2 | |
|----------------|-------------|--------|-----------|-------|-----------|--------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 |
| Cobre | 161,14 | 170,36 | 147,97 | 155,5 | 180,68 | 171,80 |
| Zinco | 2682,75 | 2298,5 | 2183 | 47,36 | 168,17 | 170,13 |

Fonte: MENDONÇA, M. V. (2018).

Pré-inicial = T1: 3000 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄;
Inicial 1 = T1: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 180 mg/kg CuSO₄; *Inicial 2* = T1 e T2: 100 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄.

6.4.2 Concentração dos Minerais no Fígado e na Tibia

Aos 63 dias de idade verificou-se no fígado dos leitões concentrações semelhantes do mineral cobre ($P > 0,05$), conforme demonstrado na tabela 5.

Na mensuração do mineral manganês na tibia aos 63 dias de idade verificou-se concentrações semelhantes entre os tratamentos ($P > 0,05$). Contudo, na mensuração de zinco na tibia aos 63 dias houve efeito significativo de tratamento ($P = 0,0007$, Tabela 5), indicando maior concentração de zinco no tratamento 1.

Tabela 5 – Concentração de cobre no fígado, manganês e zinco na tíbia dos leitões aos 63 dias de idade

| Item (mg/kg) | Tratamento | | Probabilidade |
|---------------|--------------|-------------|---------------|
| | T1 | T2 | |
| Fígado | | | |
| Cobre | 29,36±6,26 | 28,16±17,03 | 0,9744 |
| Tíbia | | | |
| Manganês | 4,43±2,21 | 4,34±2,65 | 0,9887 |
| Zinco | 107,20±27,60 | 58,18±16,30 | 0,0007 |

Fonte: MENDONÇA, M. V. (2018).

Pré-inicial = T1: 3000 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄;
Inicial 1 = T1: 2500 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄; T2: 180 mg/kg CuSO₄; *Inicial 2* = T1 e T2: 100 mg/kg ZnO + 180 mg/kg CuSO₄.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Nesta sessão encontram-se abordados os resultados obtidos no presente estudo e a discussão dos mesmos de acordo com a literatura.

7.1 DESEMPENHO

No presente estudo, o desempenho (peso, ganho de peso médio diário, consumo de ração médio diário e conversão alimentar) dos leitões foi semelhante entre os tratamentos, sendo verificado aumento nessas características com o avançar da idade, demonstrando desenvolvimento considerado normal para os leitões. Além disso, foi observado maior frequência de dias com diarreia para os animais do tratamento sem inclusão de óxido de zinco dos 35 aos 49 dias, entretanto, mesmo com essa maior frequência, os animais foram capazes de manter o desempenho e a morfometria intestinal semelhante aos animais que receberam níveis elevados de óxido de zinco na dieta.

A adição do zinco e do cobre em níveis farmacológicos na dieta de leitões desmamados é responsável por melhorar o desempenho, uma vez que disponibilizam mais nutrientes para o hospedeiro (HILL et al., 2000; PÉREZ et al., 2011; SHELTON et al., 2011), estimulam o apetite por meio do aumento da secreção de grelina gástrica causado pelo zinco (ZHANG; GUO, 2008) e do aumento da concentração do neuropeptídeo Y estimulado pelo cobre (LI et al., 2008), além de ambos atuarem no controle da diarreia ocasionada por micro-organismos oportunistas, principalmente após o desmame, sendo uma ferramenta eficiente e econômica comumente aplicada na produção de suínos (HILL et al., 2000).

Resultados contrários aos obtidos no presente estudo foram relatados por Namkung et al. (2006), no qual o desempenho dos leitões foi melhorado nas duas primeiras semanas após o desmame com a adição de 3000 mg/kg de óxido de zinco associado a 250 mg/kg de sulfato de cobre na dieta. Pérez et al. (2011) também verificaram melhora no desempenho dos leitões ao associarem óxido de zinco (3000 mg/kg) e cobre independente da fonte (sulfato de cobre ou complexo cobre-aminoácidos, em 100, 250 ou 315 mg/kg). Estes autores citam que esses minerais podem exercer efeito aditivo, sendo observado no intestino maior disponibilidade de nutrientes para o organismo, devido ao aumento da estabilidade intestinal e a redução de bactérias patogênicas.

Resultados similares ao presente estudo foram descritos por Højberg et al. (2005) e Hedemann et al. (2006), no qual os leitões desmamados não apresentaram melhora no desempenho quando suplementados com níveis de óxido de zinco (100 ou 2500 mg/kg) associado ao sulfato de cobre (0 ou 175 mg/kg). Hill et al. (2000) ao suplementarem a dieta com a associação de 3000 mg/kg óxido de zinco e 250 mg/kg de sulfato de cobre verificaram melhora no ganho de peso, no consumo de ração e na conversão alimentar ($P < 0,05$) dos leitões desmamados que receberam somente 3000 mg/kg de óxido de zinco durante 28 dias, sendo relatado resultados intermediários para o sulfato de cobre. Do mesmo modo, o óxido de zinco proporcionou maior GPMD, CRMD e peso médio aos 42 dias ao ser incluído em 3000 mg/kg na dieta, possivelmente devido ao efeito inibitório do zinco sobre a *E. coli* (BERTOL; BRITO, 1995).

No presente estudo, apesar dos resultados da conversão alimentar não terem sido estatisticamente diferentes, foi possível observar que dos 35 aos 49 dias de idade os leitões do tratamento 2 foram mais eficientes no aproveitamento do alimento em 1,3% em comparação aos animais do tratamento 1. E no período dos 49 aos 63 dias, os leitões do tratamento 2 foram 4,4% mais eficientes no aproveitamento da dieta que os animais do tratamento 1. Demonstrando dessa forma que provavelmente os leitões aproveitaram os nutrientes da dieta ingerida mesmo após apresentarem período de intensa diarreia na fase inicial 1 (35 aos 49 dias).

Níveis crescentes de óxido de zinco (2250 e 3000 mg/kg) promoveram aumento linear no consumo de ração e no ganho de peso dos leitões dos 21 aos 35 dias de idade (VITÓRIA, 2011), demonstrando que a inclusão de zinco em níveis menores já proporciona desempenho adequado aos animais. No nosso estudo, a adição de 2500 mg/kg de óxido de zinco resultou em desempenho semelhante aos animais suplementados com 3000 mg/kg em todos os períodos avaliados, demonstrando a possibilidade de redução nos níveis de inclusão.

Shelton et al. (2011) relataram que o desempenho foi melhor ($P > 0,05$) quando o óxido de zinco foi fornecido na primeira semana pós-desmame (0 a 14 dias) e o sulfato de cobre mais tardiamente (14 a 42 dias pós-desmame) em comparação a ambos fornecidos durante todo o período. Poucas pesquisas foram realizadas relacionadas a transição da suplementação na fase inicial 1 de zinco para o fornecimento de cobre na fase final de creche (inicial 2). Vale ressaltar que neste estudo o cobre foi mantido durante todo o período experimental, mas o zinco na fase inicial 1, dos 35 aos 49 dias, foi retirado e na fase subsequente foi fornecido em nível nutricional (100 mg/kg), sendo os resultados similares aos obtidos por Shelton et al. (2011).

Além disso, o sulfato de cobre tem maior eficácia quando adicionado nos níveis entre 200 e 250 mg/kg (CROMWELL, 2001; SHELTON et al., 2011). No presente estudo foi observado que a suplementação de 180 mg/kg de sulfato de cobre ao longo do período experimental foi capaz de manter o desempenho similar, sendo o mesmo relatado por Zhu et al. (2011), em que a utilização de 175 mg/kg de sulfato de cobre na dieta de leitões desmamados aos 28 dias, foi eficiente no ganho de peso diário e na conversão alimentar, sendo possível suplementar a dieta com esses níveis de sulfato de cobre.

Deste modo, é possível sugerir redução dos níveis de inclusão de óxido de zinco e a inclusão de 180 mg/kg de sulfato de cobre na dieta de leitões desmamados possibilitando a redução da poluição ambiental e de resistência antimicrobiana, problemas citados no estudo de Debski (2016). E ainda, através dos resultados apresentados, é possível sugerir mais estudos com a suplementação da dieta dos leitões desmamados com óxido de zinco na primeira semana e de sulfato de cobre nas últimas duas semanas, já que essa mudança dos regimes minerais pode reduzir o custo da dieta e reduzir a excreção de zinco e cobre nos dejetos (SHELTON et al., 2011).

7.2 FREQUÊNCIA DE DIAS COM DIARREIA

Na avaliação da frequência de dias com diarreia, dos 35 aos 49 dias, os animais do tratamento sem inclusão de óxido de zinco apresentaram 61% dos dias com diarreia em comparação a 19% nos animais suplementados com 2500 mg/kg de óxido de zinco e 180 mg/kg de sulfato de cobre. Não houve mortalidade no período estudado, pois os animais com fezes líquidas (diarreia) foram hidratados e os eletrólitos repostos por meio de soro via oral, além de terem sido medicados. No período subsequente, houve a recuperação dos animais não sendo detectadas diferenças.

Zhang e Guo (2007) verificaram redução dos escores fecais e da consistência fecal ($P < 0,01$) a medida que elevaram os níveis de suplementação de zinco acima de 1500 mg/kg, independente da fonte (óxido de zinco e cloreto de zinco tetrabásico) para leitões desmamados aos 27 dias, confirmando que níveis elevados de zinco dietético reduzem a incidência e a gravidade da diarreia e melhoram a consistência fecal após o desmame. Segundo os autores, o óxido de zinco elevado reduz a incidência de diarreia ao estabilizar a microbiota intestinal e manter a alta diversidade de coliformes fecais pós-desmame, ocasionando competição ativa para colonizar os receptores de cepas diarreicas (KATOULI et al., 1999), e, conseqüentemente, melhora o desempenho dos animais.

Segundo Ou et al. (2007), a suplementação com altos níveis de zinco (3000 mg/kg) reduz quantitativamente os mastócitos do epitélio intestinal, e assim, ocorre redução na liberação de histamina, ocasionando queda no seu efeito indutor da secreção de água e cloro pelo epitélio intestinal, diminuindo a incidência de diarreia. Tanto a combinação de 3000 mg/kg de óxido de zinco com 250 mg/kg de sulfato de cobre na dieta, quanto a avaliação individual desses minerais resultaram em fezes mais consistentes em leitões desmamados aos 22 dias de idade (HILL et al., 2000). E os animais que consumiram dietas com maiores níveis de óxido de zinco obtiveram melhores resultados na consistência das fezes e no ganho de peso (VITÓRIA, 2011).

Entretanto, apesar da importância do elevado nível de óxido de zinco e do seu efeito na frequência de dias com diarreia, no presente estudo o tratamento sem a adição do óxido de zinco e com maior frequência de diarreia (35 aos 49 dias), não interferiu no desempenho dos animais, provavelmente houve recuperação dos animais na fase subsequente dos 49 aos 63 dias devido à atuação do mineral cobre.

A adição de cobre também reduz a incidência de diarreia ao reduzir as populações bacterianas gram positivas no intestino (ZHAO et al., 2014). Segundo Højberg et al. (2005), 175 mg/kg de sulfato de cobre até o 14º dia pós-desmame foi responsável por reduzir o número de coliformes, suprimir patógenos específicos e induzir a resistência do animal à invasão e adesão de patógenos. A ocorrência de fezes menos pastosas é um efeito relevante por possibilitar a redução do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento ou de uso terapêutico (BIKKER; JONGBLOED; BAAL, 2016).

Além disso, pode-se sugerir também que a associação dos minerais zinco e cobre dos 21 aos 35 dias foi eficaz em manter o desempenho desses animais nos períodos subsequentes devido a um efeito transportador ou efeito de armazenamento (SMITH et al., 1997). Já que ambos (cobre e zinco) podem ter atuação antimicrobiana na microbiota intestinal, reduzir o número de coliformes (NAMKUNG et al., 2006), melhorar a saúde intestinal, e consequentemente, favorecer a integridade intestinal, que pode afetar a digestão e absorção de nutrientes em suínos desmamados, e consequentemente, o desempenho dos animais.

7.3 MORFOMETRIA INTESTINAL

Segundo Hampson (1986), após o desmame ocorrem mudanças estruturais no intestino delgado que aparentemente envolvem uma transição repentina na produção celular. As vilosidades diminuem, células ficam menos absorventes e a maturidade relativa dessas células

também diminui devido às taxas de produção aparentemente mais rápidas, assim, essas mudanças refletem em atividades enzimáticas reduzidas na borda em escova. Os resultados dessas mudanças repentinas são uma redução temporária na capacidade das vilosidades para absorver e digerir os nutrientes, e, a ocorrência de atrofia das vilosidades e hiperplasia de cripta no intestino de leitões após o desmame (LI et al., 2001).

No presente estudo, independente do tratamento que os leitões receberam durante o período experimental, aos 63 dias os animais apresentaram valores similares para altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação entre altura e profundidade nos fragmentos de duodeno, jejuno e íleo. Como os leitões foram eutanasiados aos 63 dias idade, possíveis alterações nessa característica poderiam ter sido detectadas se tivessem sido coletadas amostras aos 49 dias, logo após a fase em que se verificou a maior frequência de dias com diarreia, mas para não reduzir o número de leitões por tratamento, foi escolhido realizar ao término do estudo.

Pelo fato de não ter sido observada diferenças entre os tratamentos, acredita-se que possa ter ocorrido uma recuperação do epitélio intestinal no período subsequente, ou seja, dos 50 aos 63 dias, como relatado por Nabuurs et al. (1993) e Vente-Spreewenberg e Beynen (2003). Ou ainda, que os minerais fornecidos em períodos anteriores à eutanásia podem ter favorecido essa recuperação (T1 quanto o T2 da fase pré-inicial, 3000 e 2500 mg/kg, respectivamente com óxido de zinco e 180 mg/kg de sulfato de cobre).

A adição do óxido de zinco pode resultar em melhor digestão e absorção de nutrientes com potencial melhora do desempenho ao promover processos de reparação tecidual no intestino delgado e estimular a síntese de enzimas digestivas (HEDEMANN; JENSEN; POULSEN, 2006), porém, nesse estudo não houve efeito da suplementação de zinco na altura das vilosidades. Um dos pontos abordados para este resultado foi de que provavelmente tenha ocorrido um aumento da altura das vilosidades a partir do 5º dia pós-desmame. Em estudo de Hampson (1986) para avaliar a sequência de alterações da mucosa intestinal de leitões desmamados, verificou-se reduções entre 20 e 35% na altura da vilosidade após 24 horas pós-desmame. Essa redução na altura das vilosidades continuou até cerca de cinco dias pós-desmame, e nos dias seguintes, houve recuperação gradual do intestino delgado devido a um equilíbrio nas taxas de produção e perda celular. Assim, os autores justificam haver a possibilidade de que a análise da integridade intestinal tenha ocorrido depois que as condições intestinais se estabilizaram (HEDEMANN; JENSEN; POULSEN, 2006).

Contudo, o óxido de zinco também pode atuar elevando a função da barreira intestinal como mecanismo de proteção do epitélio e que a metalotioneína induzida pelo zinco proteja o

tecido de dano oxidativo (CHAI et al., 2014). Assim, o efeito positivo da suplementação dietética de óxido de zinco pode estar relacionado ao melhor desenvolvimento morfológico e funcional da mucosa intestinal.

Nos resultados encontrados por Li et al. (2001), foi demonstrado que leitões suplementados com 3000 mg/kg de óxido de zinco apresentaram maior espessura de mucosa e maior altura de vilosidade do que os animais do grupo controle (sem adição de óxido de zinco). Os autores relataram que as alterações morfológicas no epitélio do intestino delgado dos animais suplementados com óxido de zinco foram responsáveis por tornarem os animais mais preparados para o período de creche, já que o alto nível de óxido de zinco dietético foi importante para a morfologia da mucosa intestinal.

O cobre por sua vez, atua colaborando no desenvolvimento da morfologia intestinal, pela ação antimicrobiana e redução do número de coliformes, conseqüentemente, afeta a digestão e absorção de nutrientes nos leitões desmamados (NAMKUNG et al., 2006) e melhora a saúde intestinal e o desempenho dos leitões.

Em estudo de Zhao et al. (2007), a adição de 200 mg/kg de complexo cobre-proteína durante período experimental de 35 dias, diminuiu a profundidade da cripta e elevou ($P < 0,05$) a relação altura da vilosidade : profundidade de cripta (AV:PC) no duodeno e jejuno, sendo sugerido que o estímulo do crescimento com elevado níveis de cobre dietético pode, em parte, estar relacionada ao seu impacto no intestino, já que o aumento da AV:PC equivale a uma área de maior absorção e com menos células epiteliais recrutadas para a renovação celular, favorecendo a absorção de nutrientes para o aumento do desempenho.

Além disso, o sulfato de cobre tem maior eficácia quando adicionado nos níveis entre 200 e 250 mg/kg (CROMWELL, 2001; SHELTON et al., 2011). A adição de 250 mg/kg de sulfato de cobre pode alterar a taxa de renovação celular e ocasionar redução na quantidade de energia necessária para manter o trato gastrointestinal, resultando em elevada quantidade de energia disponível para o ganho de peso corporal (RADECKI et al., 1992).

Apesar dos resultados do presente estudo não terem sido significativos, foi possível observar aumento de 18,7% na relação AV:PC no duodeno nos animais do tratamento 2 em comparação aos do tratamento 1. Também houve aumento da AV:PC nas porções do jejuno e íleo em 4% e 7,5%, respectivamente, nos leitões do tratamento 2, provavelmente devido à atuação do zinco e cobre.

7.4 CONCENTRAÇÃO DOS MINERAIS NA DIETA, FÍGADO E TÍBIA

Os valores das concentrações dos minerais zinco e cobre encontrados na dieta ocorreram dentro do esperado, pois foram próximos aos níveis de inclusão utilizados.

Em relação à concentração dos minerais nos tecidos, segundo Miles e Henry (2000), “biodisponibilidade” se refere ao grau em que um nutriente ingerido de uma determinada fonte é absorvido de maneira que fique “disponível” à nível tecidual e não somente nível dietético. Alguns órgãos são “alvos” para avaliação da biodisponibilidade das concentrações de microminerais, dentre eles o fígado é utilizado tradicionalmente para mensuração da biodisponibilidade de cobre (PASTORELLI et al., 2014).

A concentração do mineral cobre no fígado dos leitões aos 63 dias de idade foi semelhante entre os tratamentos, já que os níveis utilizados foram os mesmos entre os tratamentos. Os valores de cobre hepático numericamente semelhantes entre os tratamentos, indicam que a absorção do mineral foi semelhante na inclusão de 180 mg/kg de sulfato de cobre. Acredita-se que não houve interferência do mineral zinco na absorção hepática de cobre, já que mesmo com a adição de diferentes níveis de óxido de zinco nos tratamentos, não houve diferença entre os tratamentos para a concentração de cobre no fígado.

O principal efeito da adição de zinco em excesso na dieta é a indução da deficiência de cobre no organismo. Isso ocorre porque o zinco em níveis farmacológicos proporciona aumento da síntese proteica de metalotioneína, responsável por aumentar a capacidade de armazenamento de zinco no fígado e intestino. As metalotioneínas das células intestinais e hepáticas são responsáveis pela manutenção da homeostase do zinco por elevarem a capacidade dos enterócitos de armazenar esse mineral, e assim, reduzirem o acúmulo de zinco no plasma. Contudo, as metalotioneínas possuem alta afinidade de ligação ao cobre e com o aumento da síntese de metalotioneína em resposta à sobrecarga dietética de zinco, haverá também maior armazenamento de cobre nos enterócitos, disponibilizando menos cobre para o organismo, podendo ocasionar deficiência do mesmo (GAUDRÉ, 2016).

Quanto a deposição de minerais na tíbia como resposta a suplementação na dieta, ressalta-se que é um parâmetro bastante utilizado (PACHECO, 2012). Os ossos representam o principal local de armazenamento do zinco no corpo, e é importante verificar as reservas ósseas de zinco, pois se espera que com o aumento da concentração de zinco, ocorra aumento do desempenho reprodutivo e da função imunológica (WEDEKIND et al., 1994). De acordo

com Miles e Henry (2000), dentre os tecidos examinados para biodisponibilidade do zinco, os ossos são os mais sensíveis ao zinco dietético.

Zhang e Guo (2007) verificaram maiores concentrações de zinco no metacarpo nos animais que receberam inclusão de altos níveis de zinco na dieta, e também houve respostas lineares ($P < 0,001$) nas concentrações de zinco, devido à suplementação dietética com óxido de zinco. A concentração de zinco ósseo também aumentou linearmente ($P < 0,01$) em estudo realizado com leitões na fase crescimento ao adicionarem 0, 5, 10, 20, 40 e 80 mg/kg de zinco na forma de $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (sulfato de zinco monohidratado) (WEDEKIND et al., 1994). No presente estudo foi verificado efeito significativo de tratamento, indicando maior concentração de zinco no tratamento em que houve maior suplementação desse mineral em todo o período experimental (5600 mg/kg no tratamento 1) em comparação aos 2600 mg/kg incluídos nas dietas do tratamento 2 no período experimental, sendo os resultados similares aos obtidos pelos autores citados acima.

No presente estudo, além da avaliação da concentração de zinco na tíbia, também foi realizada a mensuração do mineral manganês, devido à participação na mineralização óssea (PACHECO, 2012; CARDONA, 2014), além da tíbia ser o tecido com maior sensibilidade de deposição de manganês em função dos níveis ingeridos (REGINA; BERTECHINI, 2010). Não foram encontrados efeitos significativos de tratamento na tíbia para o manganês. O manganês exerce efeito sinérgico na concentração de zinco nos ossos, sendo relatado que houve maior retenção de zinco no osso de frangos de corte ($P < 0,05$) quando houve a inclusão de Mn na dieta (ZHU; YUN; ZHU, 1997 apud SUNDER et al., 2006).

Em estudo de Wong-Valle et al. (1989), a análise de Mn no osso foi um método adequado para estimar a biodisponibilidade relativa de fontes de Mn em ovinos, concordando com resultados obtidos na pesquisa com frangos de corte, em que a tíbia mostrou-se um parâmetro adequado e bastante utilizado para avaliação da deposição de minerais em resposta a suplementação dietética (PACHECO, 2012).

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

- a) os leitões suplementados com a associação do sulfato de cobre e menores níveis de óxido de zinco apresentaram desempenho, frequência de dias com diarreia (exceto dos 35 aos 49 dias) e morfometria intestinal semelhantes aos leitões suplementados com níveis praticados comercialmente dos 21 aos 63 dias de idade;
- b) os níveis de zinco associados ao sulfato de cobre não interferem na absorção de cobre hepático e na concentração de zinco e manganês na tibia dos leitões aos 63 dias de idade em comparação aos animais que foram alimentados com óxido de zinco em níveis superiores

CONSIDERAÇÕES FINAIS

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados e discussão, pode-se considerar que:

De maneira geral, é possível sugerir a inclusão do óxido de zinco em níveis inferiores a 3000 mg/kg associado a inclusão do sulfato de cobre em 180 mg/kg.

Quanto a possibilidade de adicionar o óxido de zinco nos primeiros 14 dias pós-desmame e o sulfato de cobre durante os 28 dias finais do período de creche, necessita de mais estudos. Embora os resultados obtidos para o desempenho e a morfometria intestinal tenham demonstrado semelhanças entre os tratamentos podendo resultar em redução dos custos da dieta, poluição ambiental e resistência aos antimicrobianos.

E apenas a modificação no manejo nutricional com a inclusão desses minerais não vai solucionar todos os problemas encontrados na creche em sistemas intensivos de produção de suínos, mas o controle de outros fatores associados como a amplitude térmica, a umidade e ventilação; na aplicação do manejo sanitário com medidas de biossegurança, vazios sanitários, vacinações, entre outros; no fornecimento do bem-estar animal e nos cuidados veterinários como a hidratação dos animais e uso de antibióticos em níveis terapêuticos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABCS - Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Mapeamento da Suinocultura Brasileira**. Brasília, 2016, 376p. Disponível em: <http://www.abcs.org.br/attachments/-01_Mapeamento_COMPLETO_bloq.pdf>. Acesso em: 02 set. 2017.
- AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A. J. **Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, mineral and vitamin**. San Diego: Academic Press. 1995, 441 p.
- ARANTES, V. M. et al. Níveis de zinco na dieta de leitões recém-desmamados: Desempenho, incidência de diarreia, isolamento de *E.coli* e análise econômica. **Bol. Ind. Anim.** v. 62, n. 3, p. 189-201, 2005.
- BANZATTO, A. D.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 1989, 249 p.
- BEDNORZ C. et al. The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. (Abstract). **Int. J. Med. Microbiol.** v. 303, p. 396-403, 2013.
- BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Editora UFLA/FAEPE. p. 450, 2004.
- BERTOL, T. M.; BRITO, B. G. Efeito do óxido de zinco x sulfato de cobre com ou sem restrição alimentar, sobre o desempenho e ocorrência de diarreia em leitões. **R. Bras. Zootec.** v. 24, n. 2, p. 279-288, 1995.
- BIKKER, P.; JONGBLOED, A. W.; BAAL, J. VAN. Dose-dependent effects of copper supplementation of nursery diets on growth performance and fecal consistency in weaned pigs. **J. Anim. Sci.** v. 94, p.181-186, 2016.
- BORAH, S.; PAUL, D. The six different roles of zinc in pigs. **Pig Progress**, 16 mar. 2018. Disponível em: <http://www.pigprogress.net/Health/Articles/2018/3/The-six-different-roles-of-zinc-in-pigs-260982E/?cmpid=NLC|pigprogress_focus|2018-03-16|The_six_different_roles_of_zinc_in_pigs>. Acesso em: 16 mar. 2018.
- BREMNER, I. The relationship between the zinc status of pigs and the occurrence of copper - and Zn -binding proteins in liver. **Br. J. Nutr.** v. 35, p. 245-252, 1976.
- CARDONA, R. D. **Exploring the Zn deficiency hypothesis to explain the beneficial effect of therapeutic ZnO in weaning pigs**. 2014. 158 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Facultat de Veterinària de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 2014.
- CARLSON, M. S.; HILL, G. M.; LINK, J. E. Early- and traditionally weaned nursery pigs benefit from phase-feeding pharmacological concentrations of zinc oxide: effect on metallothionein and mineral concentrations. **J. Anim. Sci.** v. 77, p.1199–1207, 1999.

- CASEY, J. A. et al. High-density livestock operations, crop field application of manure, and risk of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, Pennsylvania, USA. **JAMA Intern Med.** 173(21). p. 1980–1990, 2013.
- CHAI, W. et al. High-dose dietary zinc oxide mitigates infection with transmissible gastroenteritis virus in piglets. **BMC Vet. Res.** v. 10, n. 75, 2014.
- CLOSE, W.H. Trace mineral nutrition of pigs revisited: meeting production and environmental objectives. **Rec. Adv. Anim. Nutr.** In Aust., University of New England, NSW 14, p. 133-142. 2003.
- CONDÉ, M. S. et al. Minerais quelatados na nutrição de suínos. **Rev. Eletrônica Nutritime.** v. 11, n. 4, p. 3547-3565, 2014.
- CROMWELL, G. L. Antimicrobial and promicrobial agents. In **Swine Nutrition.** A. J. Lewis and L. L. Southern, ed. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 421-426, 2001.
- DEBSKI, B. Supplementation of pigs diet with zinc and copper as alternative to conventional antimicrobials. **Pol J Vet Sci.** v.19, n. 4, 917–924, 2016.
- EDMONDS, M. S.; BAKER, D. H. Toxic effects of supplemental copper and roxarsone when fed alone or in combination to young pigs. **J. Anim. Sci.** v. 63, p. 533-537, 1986.
- FERRIN, M. O. **Efeito da dieta líquida sobre o desempenho de leitões neonatos e seus reflexos na matriz suína.** 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
- FURLAN, A.C.; POZZA, P.C. Exigências de minerais para suínos. In: SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.F.; COSTA, F.G.P. et al. **Nutrição de não ruminantes.** 1 ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 405-423, 2014.
- GATTÁS, G.; BARBOSA, F. F. Cobre na nutrição de aves e suínos. **Rev. Eletrônica Nutritime.** v.1, n. 3, p. 117-133, 2004.
- GAUDRÉ, D. Nutritional zinc requirements in growing–finishing pigs: Are there options for reducing mineral-form dietary zinc?. *Revue R&D de la filière porcine française*, v. 3, n. 1, p. 9-18, 2016.
- HAMPSON, D. J. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. **Res. Vet. Sci.** v. 40, p. 32–40, 1986.
- 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. **J. Anim. Sci.** v. 84, p. 3310–3320, 2006.
- HEO; J. M. et al. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. **J Anim Physiol Anim Nutr.** v. 97, p. 207–237, 2013.

- HILL, G. M. et al. Growth promotion effects and plasma changes from feeding high dietary concentrations of zinc and copper to weanling pigs (regional study). **J. Anim. Sci.** v. 78, p. 1010–1016, 2000.
- HØJBERG, O. et al. Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 2267–2277, 2005.
- JENSEN, B. B. Extensive literature search on the “effects of copper intake levels in the gut microbiota profile of target animals, in particular piglets”. **EFSA Supporting Publications.** v. 13, n. 5, p.1024, 2016.
- KATOULI, M. et al. The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. **J Appl Environ Microbiol.** v.87, p.564-573, 1999.
- KIEFER, C. Minerais quelatados na nutrição de aves e suínos. **Rev. Eletrônica Nutritime.** v. 2, n. 3, p. 206 –220, 2005.
- LALLES, J.P. et al. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Anim. Res.** v. 53, p. 301-316, 2004.
- LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Commercial poultry nutrition.** 2 ed. Guelph, Ontario: University Books. p. 57-58, 1997.
- LI, D. F. et al. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. **J. Anim Sci.** v. 68, n. 6, p. 1790-1799, 1990.
- LI, B. T. et al. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. **Can. J. Anim. Sci.** v. 81, p. 511-516, 2001.
- LI, J. et al. Effect of high dietary copper on weight gain and neuropeptide Y level in the hypothalamus of pigs. **J Trace Elem Med Biol.** v. 22, p. 33–38, 2008.
- LI, M. Z. et al. Nanosize of zinc oxide and the effects on zinc digestibility, growth performances, immune response and serum parameters of weanling piglets. **Anim. Sci. J.** v. 87, p. 1379–1385, 2016.
- LIMA, G. J. M. M. de; MORÉS, N.; SANCHES, R. L. As diarreias nutricionais na suinocultura. **Acta Sci. Vet.** v. 37 (Supl 1), p. 17-30, 2009.
- LIMA, G. J. M. M. Estratégias (incluindo nutricionais) no auxílio da redução do uso de antimicrobianos. In: XVIII Congresso da Abraves. **Anais...** Concórdia, SC : Embrapa Suínos e Aves, 2017.
- LIU, Y. et al. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. **Anim Nutr.** p. 1-13, 2018.

- LUO, X. G.; DOVE, C. R.. Effect of dietary copper and fat on nutrient utilization, digestive enzyme activities, and tissue mineral levels in weanling pigs. **J. Anim. Sci.** v. 74, p.1888–1896, 1996.
- MA, Y. L., et al. Multitrial analysis of the effects of copper level and source on performance in nursery pigs. **J. Anim. Sci.** v. 93, p.606-614, 2015.
- MARION, J. et al. Weaning and feed intake alter pancreatic enzyme activities and corresponding mRNA levels in 7-d-old piglets. **J. Nutr.** v. 133, n. 2, p. 362-368, 2003.
- MAVROMICHALIS, I. The search for alternatives to zinc oxide. **Pig Progress**, v. 27, n. 2, p. 2-4, 2011.
- McCRACKEN, B. A. M. E. et al. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. **Journal of Nutrition.** v.129, p.613–619, 1999.
- McDOWEL, L. R. Copper and molybdenum – minerals in animal and human nutrition. **Academy Press Inc.** San Diego – Califórnia. p. 178-204, 1992.
- MÉTODOS ANALÍTICOS, In: CAPUTI, B. et al. **Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal.** ed. 4. São Paulo: Sindirações. v. 1, 2013. (várias paginações).
- MILANI, N. C. **Utilização de zinco, na forma de óxido de zinco nanoparticulado, em dietas para leitões recém-desmamados.** 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- MILES, R.D., HENRY, P.R. Relative trace mineral bioavailability. **Ciênc. Anim. Bras.** n. 1, p.73-93, 2000.
- MONTAGNE, L. et al. Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. **Br. J. Nutr.** v. 97, n. 1, p. 45-57, 2007.
- MUNIZ, M. H. B. et al. Fontes orgânicas e inorgânicas de zinco e cobre como melhoradores de desempenho em leitões desmamados. **R. Bras. Zootec.** v. 39, n.9, p. 1999-2005, 2010.
- NABUURS, M. J. A. et al. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. **Res. Vet. Sci.** v. 55, p. 78–84, 1993.
- NAMKUNG et al. Effect of pharmacological intakes of zinc and copper on growth performance, circulating cytokines and gut microbiota of newly weaned piglets challenged with coliform lipopolysaccharides. **Can. J. Anim. Sci.** v 86, p. 511–522, 2006.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of swine.** 10. ed. Washington, D. C.: National Academy. p. 189, 1998.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of swine.** 11. ed. Washington, D. C.: National Academy. p. 400, 2012.

- OU, D. et al. Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the small intestine of weanling pigs. (Abstract). **J. Nutr. Biochem.** v. 18, p. 820–826, 2007.
- PACHECO, B. H. C. **Níveis dietéticos de zinco e manganês sobre o desempenho, disponibilidade e mineralização óssea de frangos de corte.** 2012. 85 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.
- PASTORELLI, G. et al. Two different forms and levels of CuSO₄ in piglet feeding: liver, plasma and faeces copper status. **J. Anim. Feed Sci.** v. 23, p. 52-57, 2014.
- PEKAS, J. C. Morphometry of the intestine of the pig. I. A method for complete circumsection analysis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 31, p. 79–89, 1986.
- PÉREZ, V. G. et al. Additivity of effects from dietary copper and zinc on growth performance and fecal microbiota of pigs after weaning. **J. Anim. Sci.** v. 89, p. 414-425, 2011.
- 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. **Livest. Prod. Sci.** v. 51, p. 215-236, 1997.
- PLUSKE, J. R. et al. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. **Nutr. Res. Rev.** v. 15, p. 333-371, 2002.
- RADECKI, S. V. Effect of Dietary Copper on Intestinal Mucosa Enzyme Activity, Morphology, and Turnover Rates in Weanling Pigs. **J. Anim. Sci.** v. 70, p. 1424-1431, 1992.
- REGINA, R.; BERTECHINI, A. G. **Minerais. Nutrição animal, principais ingredientes e manejo de aves e suínos.** São Paulo: Fundação Cargill. p. 173-206, 2010.
- ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2017, 488p.
- SARGEANT, H. R. et al. Dietary zinc oxide affects the expression of genes associated with inflammation: Transcriptome analysis in piglets challenged with ETEC K88. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 137, p. 120-129, 2010.
- SAS: STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS:** software v. 9.3. Cary: SAS Institute, 2010.
- SHELTON, N. W. et al. Effects of copper sulfate, tri-basic copper chloride, and zinc oxide on weaning pig performance. **J. Anim. Sci.** v. 89, p. 2440-2451, 2011.
- SILVA, W. R. da. **Teores de cobre e seus principais antagonistas em ovinos e caprinos criados nos municípios de Juazeiro e Casa Nova – Bahia.** 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Campus de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2015.

SILVA, C. V. O. et al. Escherichia coli na suinocultura. Aspectos clínicos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.9, n.2, p. 288-293, 2015.

SLIFIERZ, M. J.; FRIENDSHIP, R.; WEESE, J. S. Zinc Oxide Therapy Increases Prevalence and Persistence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Pigs: A Randomized Controlled Trial. **Zoonoses Public Health**. v.62, p.301–308, 2014.

SMITH, J. W. Effects of the interrelationship between zinc oxide and copper sulfate on growth performance of early-weaned pigs. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 1861–1866, 1997.

SUNDER, G. S. et al. Effect of supplemental manganese on mineral uptake by tissues and immune response in broiler chickens. **J Poult Sci.** v. 43, p. 371-377, 2006.

VENTE-SPREEUWENBERG, M. A. M.; BEYNEN, A. C. Diet-mediated modulation of small intestinal integrity in weaned piglets. In: PLUSKE, J.R.; LE DIVIDICH, J.; VERSTEGEN, M.W.A. **Weaning the Pig: Concepts and Consequences**. Wageningen: Wageningen Academic Publisher, p.145–199, 2003.

VITÓRIA, A. P. da. **Níveis de zinco em dietas de leitões desmamados**. 2011. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, 2011.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 3.ed. New York: CABI Publishing. p. 614, 1999.

WEDEKIND, K. J. et al. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn-soybean meal diets. **J. Anim. Sci.** v. 72, p. 2681-2689, 1994.

WILCOCK, P. et al. Zinc oxide ban: An alternative plan?. **Pig Progress**, 2017. Disponível em: <http://www.pigprogress.net/Nutrition/Articles/2017/2/Zinc-oxide-ban-An-alternative-plan-94377E/?cmpid=NLC|pigprogress_focus|2017-02-5|Zinc_oxide_ban:_An_alternative_plan?_>. Acesso em: 13 jun. 2017.

WONG-VALLE, J. et al. Estimation of the relative bioavailability of manganese sources for sheep. **J. Anim. Sci.** v. 67, p. 2409-2414, 1989.

YAGÜE, A. P. Normatização do uso de minerais na alimentação suína. **Suínos & Cia.** n. 32, p. 11-18, 2009.

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. **Microb. Ecol. Health Dis.** v. 25, p. 1-7, 2014.

ZHANG, B.; GUO, Y. Beneficial effects of tetrabasic zinc chloride for weaning piglets and the bioavailability of zinc in tetrabasic form relative to ZnO. **Anim. Feed Sci. Technol.** v 135, p. 75-85, 2007.

_____. The growth-promoting effect of tetrabasic zinc chloride is associated with elevated concentration of growth hormone and ghrelin. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** v 21, p. 1473-1478, 2008.

_____. Influence of tetrabasic zinc chloride and copper sulphate on growth performance and some physiological parameters in the digestive tract of weanling piglets. **J. of Anim. Sci. and Feed Sci.** v 18, p. 465-477, 2009.

ZHAO, J. et al. Growth performance and intestinal morphology responses in early weaned pigs to supplementation of antibiotic-free diets with an organic copper complex and spray-dried plasma protein in sanitary and nonsanitary environments. **J. Anim. Sci.** v. 85, p. 1302-1310, 2007.

ZHAO, J.; ALLEE, G.; GERLEMANN, G.; MA, L.; GRACIA, M. I.; PARKER, D.; VAZQUEZ-ANON, M.; HARRELL, R. J. Effects of a Chelated Copper as Growth Promoter on Performance and Carcass Traits in Pigs. **Asian Australas. J. Anim. Sci.** v. 27, n. 7, p. 965-973, 2014.

ZHENG, P. et al. The differences between copper sulfate and tribasic copper chloride on growth performance, redox status, deposition in tissues of pigs, and excretion in feces. **Asian-Australas J Anim Sci**, v. 31, n. 6, p. 873-880, 2018.

ZHOU, W. et al. Stimulation of growth by intravenous injection of copper in weanling pigs. **J. Anim. Sci.** v. 72, p. 2395-2403, 1994.

ZHU, Y., YUN, W.; ZHU, W. Principal components of analysis of Ca, P, vitamin D₃, Mn and Zn levels in diets for broilers. **Chin. J. of Anim. Sci.**, v. 33, p. 10-15, 1997. .

ZHU D. et al. Effect of high dietary copper on the expression of hypothalamic appetite regulators in weanling pigs. **J. Anim.Feed Sci.** v.20, p. 60–70, 2011.