

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola de Veterinária  
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Rafael Silva Gomes

**Pesquisa de lactonas do ácido resorcílico em urina bovina: detecção, quantificação e discriminação entre o uso de implantes ilegais de zeranol e ingestão de milho contaminado com *Fusarium* spp. toxinas**

Belo Horizonte  
2025

Rafael Silva Gomes

**Pesquisa de lactonas do ácido resorcílico em urina bovina: detecção, quantificação e discriminação entre o uso de implantes ilegais de zeranol e ingestão de milho contaminado com *Fusarium* spp. toxinas**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana de Vasconcelos Cançado

Coorientadores: Prof. Dr. Tadeu Chaves de Figueiredo e Dra. Vanessa Gonçalves dos Santos.

Belo Horizonte  
2025

G633p Gomes, Rafael Silva, 1978 -  
Pesquisa de lactonas do ácido resorcílico em urina bovina: detecção, quantificação e discriminação entre o uso de implantes ilegais de zeranól e ingestão de milho contaminado com *Fusarium* spp. toxinas/ Rafael Silva Gomes.-2025.  
69f: il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado  
Coorientadores: Tadeus Chaves Figueiredo  
Vanessa Gonçalves Santos

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.  
Inclui Bibliografia

1. Bovino - Teses - 2. Micotoxinas – I. Cançado, Silvana de Vasconcelos - II. Figueiredo, Tadeus Chaves – III. Santos, Vanessa Gonçalves – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.085

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

## FOLHA DE APROVAÇÃO

RAFAEL SILVA GOMES

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **DOUTOR** em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Tecnologia e Inspeção de produtos de origem animal**. Defesa da tese intitulada: "**Pesquisa de lactonas do ácido resorcílico em urina bovina: detecção, quantificação e discriminação entre o uso de implantes ilegais de zeranol e ingestão de milho contaminado com Fusarium spp. toxinas**"

Aprovado em 26 de março de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dra. Silvana de Vasconcelos Cancado - Orientadora

Dr. Marcelo Resende de Souza

Dra. Kelly Moura Keller

Dra. Andréa de Melo Garcia Oliveira

Dr. Guilherme Resende da Silva



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Vasconcelos Cancado, Professora do Magistério Superior**, em 26/03/2025, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Resende da Silva, Usuário Externo**, em 26/03/2025, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Moura Keller, Professora do Magistério Superior**, em 27/03/2025, às 05:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Melo Garcia de Oliveira, Usuária Externa**, em 27/03/2025, às 07:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Resende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 27/03/2025, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4071688** e o código CRC **B7B62ED9**.

---

## AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares, amigos e colaboradores que, de alguma forma, torceram ou colaboraram com este projeto.

À professora Silvana, pelo apoio, compreensão, amizade, exemplo, sobretudo por acreditar e confiar em mim.

Ao professor Tadeu, pela parceria e orientação.

Ao professor Lobão pela amizade e ensinamentos, sempre disponível a ajudar.

À professora Carla por todo apoio e participação.

À parceria com LFDA/Campinas, especialmente à Vanessa, ao Juliano e a Amanda, fundamentais no desenvolvimento desse trabalho.

Ao LFDA/Pedro Leopoldo pela grande colaboração, especialmente a Eliene, Mary e Rose.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela formação profissional.

Ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, pelo apoio e incentivo.

Sobretudo a Deus, fonte inesgotável de força, equilíbrio, serenidade e perseverança durante o longo caminho.

## RESUMO

As lactonas do ácido resorcílico (RALs) são a zearalenona (ZEA), o  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL), o  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL), o zeranól ( $\alpha$ -zearalanol,  $\alpha$ -ZAL) e o taleranol ( $\beta$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL), entre outras. Elas são metabólitos secundários de fungos que podem apresentar várias atividades biológicas. O zeranól, quando produzido sinteticamente, tem sido usado em bovinos como um promotor de crescimento estrogênico para melhorar a produção de carne, embora seja considerado ilegal em alguns países, entre estes o Brasil. A ZEA, produzida por fungos do gênero *Fusarium*, pode estar presente em grãos utilizados na alimentação animal e seu consumo faz com que as RALs, entre elas o zeranól, sejam excretados na urina. Para distinguir entre a contaminação natural de grãos e o uso ilegal do promotor estrogênico foi desenvolvida na União Europeia, uma equação matemática baseada em uma regressão linear com intervalo de predição de 99%. Com base nesses aspectos, os objetivos desse trabalho foram avaliar o comportamento, ao longo do tempo, das RALs na urina de bovinos que receberam alimentação contaminada com ZEA, implante de zeranól e a combinação de alimentação contaminada e implante. Para a pesquisa da presença e dos níveis de resíduos na urina dos animais foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Os resultados demonstraram a presença de todas as RALs na urina dos animais que receberam alimentação contaminada e que receberam a combinação de contaminação e implante, sendo que ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL somente foram detectadas e quantificadas enquanto a alimentação contaminada era oferecida. Para os animais que receberam o implante apenas zeranól e taleranol foram encontrados na urina. Foi concluído que a equação recomendada pela EU permitiu diferenciar a ingestão de alimentos naturalmente contaminados do abuso de zeranól, sendo, essa uma ferramenta importante para auxiliar na decisão de um resultado não conforme da presença de RALs na urina de bovinos.

**Palavras-chave:** LC/MS-MS; micotoxinas; promotor de crescimento; segurança alimentar; zeranól

## ABSTRACT

Resorcyclic acid lactones (RALs) include zearalenone (ZEA),  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL), zeranol ( $\alpha$ -zearalanol,  $\alpha$ -ZAL), and taleranol ( $\beta$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL), among others. They are secondary metabolites of fungi that may exhibit various biological activities. Zeranol, when produced synthetically, has been used in cattle as an estrogenic growth promoter to improve meat production, although it is considered illegal in some countries, including Brazil. ZEA, produced by fungi of the genus *Fusarium*, may be present in grains used in animal feed and its consumption causes RALs, including zeranol, to be excreted in the urine. To distinguish between natural contamination of grains and illegal use of estrogen promoters, a mathematical equation based on linear regression with a 99% prediction interval was developed in the European Union. Based on these aspects, the objectives of this study were to evaluate the behavior, over time, of RALs in the urine of cattle that received feed contaminated with ZEA, zeranol implant, and the combination of contaminated feed and implant. To investigate the presence and levels of residues in the urine of the animals, a high-performance liquid chromatography system coupled to sequential mass spectrometry (LC-MS/MS) was used. The results demonstrated the presence of all RALs in the urine of animals that received contaminated feed and that received the combination of contamination and implant, with ZEA,  $\alpha$ -ZEL, and  $\beta$ -ZEL only being detected and quantified while the contaminated feed was offered. For animals that received the implant, only zeranol and taleranol were found in the urine. It was concluded that the equation recommended by the EU allowed differentiating the ingestion of naturally contaminated foods from the abuse of zeranol, and this is an important tool to assist in the decision of a non-compliant result of the presence of RALs in cattle urine.

**Key words:** LC/MS-MS; mycotoxins; growth promoter; food safety; zeranol

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Estrutura química da ZEA.....	20
Figura 2	Representação dos metabólitos e principais enzimas envolvidas na biotransformação da ZEA.....	22
Figura 3	Metabolismo da ZEA no organismo (Circulação entero-hepática) .....	23
Figura 4	Estrutura química dos estrógenos naturais.....	25
Figura 5	Estrutura química do zeranol.....	27
Figura 6	Interconversão metabólica do zeranol e seus metabólitos (taleranol e ZAE). .....	27
Figura 7	Fluxograma do procedimento de extração do farelo de milho.....	37
Figura 8	Fluxograma do procedimento de extração da urina.....	39
Figura 9	Curvas de regressão da ZEA (A), $\alpha$ -ZEL (B), $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E), adicionados às amostras brancas de urina de bovinos.....	44
Figura 10	Cromatogramas dos analitos (padrões) ZEA (A), $\alpha$ -ZEL (B), $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E), recuperados no controle positivo 100% x LMT (CC 100) e do padrão interno Estradiol D4 (F).....	45
Figura 11	Cromatogramas da pesquisa de ZEA (A), $\alpha$ -ZEL (B), $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E) em amostra de urina de bovinos do grupo controle (dia zero).....	47
Figura 12	Concentrações de resíduos de ZEA, $\alpha$ -ZEL, $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol na urina de bovinos alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de $2.100 + 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ por dia durante 12 dias.....	49
Figura 13	Cromatogramas da pesquisa de ZEA (A), $\alpha$ -ZEL (B), $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E) em amostra de urina de bovinos alimentados com milho contaminado com ZEA (2º dia experimental).....	49
Figura 14	Concentrações de zeranol e taleranol na urina de bovinos que receberam implantes de zeranol usado como promotor de crescimento na concentração de $36.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de zeranol por um período de 110 dias e dieta livre de ZEA.....	52
Figura 15	Cromatogramas da pesquisa de zeranol (A) e taleranol (B) em amostra de urina de bovinos que receberam implante de zeranol e dieta livre de ZEA (14º dia experimental).....	53
Figura 16	Concentrações de ZEA, $\alpha$ -ZEL, $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol na urina de bovinos que receberam implante de zeranol na concentração de $36.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e foram alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de $2.100 + 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ do 1º ao 12º dia do experimento.....	55
Figura 17	Cromatogramas da pesquisa de ZEA (A), $\alpha$ -ZEL (B), $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E) em amostra de urina de bovinos que receberam implante de zeranol e dieta contaminada com ZEA (13º dia experimental).....	55
Figura 18	Cromatogramas da pesquisa de ZEA (A), $\alpha$ -ZEL (B), $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E) em amostra de urina de bovinos que receberam implante de zeranol e dieta contaminada com ZEA (30º dia experimental).....	57
Figura 19	Perfil de zeranol, taleranol, $\alpha$ -ZEL, $\beta$ -ZAL e ZEA determinados pela análise por LC-MS/MS das amostras de urina coletadas de bovinos alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de $2.100 + 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ por dia durante 12 dias.....	58

---

---

Figura 20	Perfil de zeranól, taleranol, $\alpha$ -ZEL, $\beta$ -ZAL e ZEA determinados pela análise por LC-MS/MS das amostras coletadas de urina de bovinos que receberam implantes de zeranól na concentração de 36.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ por um período de 110 dias.....	59
Figura 21	Perfil de zeranól, taleranol, $\alpha$ -ZEL, $\beta$ -ZAL e ZEA determinados pela análise por LC-MS/MS das amostras de urina coletadas de bovinos que receberam implantes de zeranól na concentração de 36.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e foram alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de 2.100 + 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ do 1º ao 12º dia do experimento.....	59

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1	Valores de orientação estabelecidos para ZEA para produtos e matérias-primas para alimentação animal. ....	31
Tabela 2	Condições de fragmentação e tempo de retenção aproximado para hormônios.....	41
Tabela 3	Concentrações de resíduos de ZEA, $\alpha$ -ZEL, $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol na urina de bovinos alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de $2.100 \pm 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ por dia durante 12 dias.....	48
Tabela 4	Concentrações de ZEA, $\alpha$ -ZEL, $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol na urina de bovinos que receberam implante de zeranol na concentração de 36.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ por um período de 110 dias e dieta livre de ZEA.....	52
Tabela 5	Concentrações de ZEA, $\alpha$ -ZEL, $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol na urina de bovinos que receberam implante de zeranol na concentração de 36.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e foram alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de $2.100 \pm 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ por dia do 1º ao 12º dia do experimento	54

---

## LISTA DE ABREVIACOES

$\alpha$ -ZEL –  $\alpha$ -Zearalenol

$\alpha$ -ZAL –  $\alpha$ -Zearalanol

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

$\beta$ -ZEL –  $\beta$ -Zearalenol

$\beta$ -ZAL –  $\beta$ -Zearalanol

CC $\alpha$  – Limite de Decisão

CEUA – Comissão de tica no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal

CQ – Controle de Qualidade

d-SPE – Fase Sólida Dispersiva

DIL – Diluente

DON – Deoxinivalenol

DTIPOA – Departamento de Tecnologia e Inspeo de Produtos de Origem Animal

EMEA – Agência Europeia de Medicina

ESI – Electrospray

EV-UFMG – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

EU – União Europeia

EURL – Laboratório de Referência da União Europeia

FAO – Organizao das Nao Unidas para a Agricultura e Alimentao

FDA – *Food and Drug Administration*.

GAM – Modelo Aditivo Generalizado

GLM – Modelos Lineares Generalizados

HSD – 3 $\alpha$ -hidroxiesteroides-desidrogenase/3 $\beta$ -hidroxiesteroides-desidrogenase

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IN – Instruo Normativa

ID – Identificao do Animal

JECFA – *Joint Expert Committee on Food Additives*

LANAGRO/MG – Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais

LANAGRO/SP – Laboratório Nacional Agropecuário de São Paulo

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada  espectrometria de massas

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada  espectrometria de massas sequencial

LFDA – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária

LQ – Limite de Quantificação  
LTM – Limite para tomada de medida  
MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária  
MCTIC – Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
MRC – Material de Referência Certificado  
MRM – *Multiple Reaction Monitoring*  
m/z – Razão massa-carga  
ND – Não detectado  
OIE – Organização Mundial da Saúde Animal  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
ONU – Organização das Nações Unidas  
PI – Padrão Interno  
PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes  
Pool – Agrupamento de diversos padrões em uma solução padrão de trabalho  
PSA – *Primary Secondary Amine*  
QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*  
RCA – Laboratório de Resíduos e Contaminantes em Alimentos  
RDC – Resolução de Diretoria Colegiada  
RAL – Lactona do ácido resorcílico  
SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária  
SIF – Serviço de Inspeção Federal  
TAL – Taleranol  
UDFGT – Uridina-difosfato-glucuronil-transferase  
UV – Ultravioleta  
Veff – Graus de liberdade efetivos  
WHO – *World Health Organization*  
ZAE – Zearalanona  
ZEA – Zearalenona  
ZER – Zeranol

---

## SUMÁRIO

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1	O gênero <i>Fusarium</i> .....	18
3.2	<i>Fusarium</i> spp. toxinas.....	19
3.3	Zearalenona.....	19
3.3.1	Estrutura química.....	20
3.3.2	Aspectos epidemiológicos.....	20
3.3.3	Formas de contaminação.....	21
3.3.4	Biotransformação e excreção.....	21
3.3.4.1	Metabolismo em ruminantes.....	24
3.3.5	Mecanismo de ação.....	25
3.3.6	Sinais clínicos em bovinos.....	25
3.4	Zeranol.....	26
3.4.1	Estrutura química.....	26
3.4.2	Indicação de uso.....	27
3.4.3	Biotransformação e excreção.....	27
3.4.4	Toxicidade.....	28
3.4.5	Apresentações comerciais.....	28
3.5	Resíduos em produtos de origem animal.....	28
3.6	Regulamentação sobre a presença de micotoxinas em produtos de origem animal.....	29
3.6.1	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC).....	30
3.6.2	Legislação para matérias-primas alimentares.....	31
3.7	Métodos analíticos para a pesquisa de resíduos e contaminantes.....	31
3.7.1	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial com extração por <i>QuEChERS</i> .....	32
3.8	Determinação de lactonas do ácido resorcílico em urina de bovinos.....	34
3.9	Projeto “Zeranol Natural” .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1	Criação e alimentação dos animais.....	36
4.2	Tratamentos.....	36
4.3	Contaminação do milho.....	36
4.4	Aplicação dos implantes.....	37
4.5	Período experimental.....	38
4.6	Obtenção das amostras.....	38
4.7	Pesquisa de lactonas do ácido resorcílico.....	38
4.7.1	Análises laboratoriais.....	38
4.7.1.1	Produtos químicos e reagentes.....	39
4.7.1.2	Procedimento de extração.....	39
4.7.1.3	Instrumentação.....	40
4.7.1.4	Análise dos dados obtidos.....	41
4.8	Discriminação entre abuso de zeranol ou contaminação por <i>Fusarium</i> spp. toxinas pelo modelo estatístico.....	42
4.9	Delineamento experimental.....	42

---

---

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1	Curvas de calibração para pesquisa de lactonas do ácido resorcílico.....	43
5.2	Pesquisa de lactonas do ácido resorcílico em urina de bovinos.....	46
5.2.1	Grupo controle.....	46
5.2.2	Dieta contaminada com zearalenona.....	48
5.2.3	Implante de zeranol e dieta livre de zearalenona.....	51
5.2.4	Implante de zeranol e dieta contaminada com zearalenona.....	53
5.3	Discriminação entre abuso de zeranol ou contaminação por zearalenona.....	58
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2024, a produção de carne bovina no Brasil foi estimada em 11,1 milhões de toneladas (2º maior produtor mundial), o que representa um aumento de 24,1% em relação a 2023. Já as exportações totalizaram 2,89 milhões de toneladas, um aumento de cerca de 26% em comparação com o ano anterior. O volume exportado movimentou US\$ 12,8 bilhões, cerca de 22% a mais do que em 2023 (ABIEC, 2025).

Estes índices de produtividade estão diretamente ligados aos avanços tecnológicos no aprimoramento da genética, no manejo nutricional, no melhoramento das pastagens e no rigor com os aspectos sanitários, confirmando a eficiência do país como grande fornecedor de proteína animal ao mundo (EMBRAPA, 2023). Concomitantemente, o cenário mundial atual da produção de alimentos revela a preocupação dos consumidores quanto à qualidade e a segurança do alimento a ser consumido.

No Brasil, a criação de bovinos é majoritariamente a pasto e, alternativas como sistemas de confinamento podem incrementar os resultados (Barbero *et al.*, 2017). Um dos fatores que podem comprometer a qualidade dos grãos e silagens oferecidos aos animais em confinamento é atribuído principalmente à presença de fungos. Dentre estes, destacam os dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicilium*, que infectam e levam ao apodrecimento das plantas e mofamento dos grãos, resultando em perdas econômicas em razão da menor produtividade, qualidade e toxicidade (Berthiller *et al.*, 2007). Se as condições forem favoráveis, estes fungos podem produzir micotoxinas durante a fase de desenvolvimento das culturas no campo, mas também continuar essa produção após a colheita, durante armazenamento e após o processamento, implicando em risco para todos os setores envolvidos na produção de alimentos (Oldenburg *et al.*, 2017).

A Zearalenona (ZEA), é uma micotoxina produzida por espécies do gênero *Fusarium*, classificada como uma Lactona do Ácido Resorcílico (RAL) não esteroide. Ela é uma micotoxina que pode ser encontrada em grãos que contaminam as dietas de animais de produção como os bovinos, suínos e aves, produzida por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. cerealis*, que contaminam pastagens e grãos (Biscoto *et al.*, 2022). A sua formação nos grãos ocorre ainda na lavoura, mas também durante o processamento e armazenamento podendo contaminar rações, feno, silagem, gramíneas e forrageiras de pastoreio. Devido a sua semelhança química com o estrógeno, a ZEA e os seus metabólitos competem pelos mesmos receptores. Assim, quando ingerida, ainda que em pequena concentração, pode provocar distúrbios reprodutivos, especialmente em

fêmeas, como infertilidade, aborto, comportamento de cio persistente, imunossupressão, dentre outros, provocando prejuízos econômicos (Fink-Gremmels & Malekinejad, 2007).

Após a ingestão por ruminantes, a ZEA é metabolizada em estágios sucessivos. Inicialmente, ZEA é reduzida pelas enzimas  $3\alpha$  e  $3\beta$ -hidroxiesteroides desidrogenases que produzem  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) e  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL) respectivamente. O  $\alpha$ -ZEL por sua vez pode ser reduzido a  $\alpha$ -ZAL (zeranol), enquanto o  $\beta$ -ZEL pode ser reduzido a  $\beta$ -ZAL (taleranol) (EFSA, 2017, Raí *et al.*, 2019). Dessa maneira, zeranol e taleranol podem ocorrer naturalmente na urina e na bile de bovinos após o metabolismo da ZEA. *Fusarium* spp. produtores de ZEA também são capazes de formar os metabólitos  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL em pequenas quantidades, sendo esses, juntamente com ZEA, denominados *Fusarium* spp. toxinas (Zinedine *et al.*, 2007).

O zeranol é um agente anabólico semissintético, promotor de crescimento, usado legalmente em vários países. Devido à sua atividade estrogênica, o zeranol vem sendo comercializado em formulações sintéticas de uso veterinário. Entretanto, a restrição de vários países ao seu uso é devido ao perigo potencial para a saúde humana e a deficiência de metodologias analíticas suficientemente sensíveis para a detecção dos resíduos em carne para o consumo humano (Matraszek-Zuchowska *et al.*, 2013).

O uso de promotores do crescimento em bovinos é uma prática autorizada em vários países como Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia, que permitem o uso dos anabolizantes naturais (testosterona, progesterona e  $17\beta$  estradiol) e sintéticos (zeranol e acetato de trembolona) (FDA, 2025). No Brasil, a utilização desses hormônios em animais de produção é proibida desde 1961, e em 2011, essa condição foi mantida pela Instrução Normativa (IN) nº 55 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) que também proíbe a importação, a produção, a comercialização e o uso de substâncias naturais ou artificiais com atividade anabolizante, ou mesmo outras substâncias dotadas dessa atividade, mas desprovidas de caráter hormonal (BRASIL, 2011).

Devido à dificuldade para se distinguir a presença de zeranol proveniente de contaminação da alimentação animal resultante do metabolismo da ZEA ou proveniente da utilização do implante de anabolizante, a União Europeia (EU) financiou um programa intitulado “Zeranol Natural”, que objetivou estabelecer procedimentos para detecção do zeranol em amostras de urina de bovinos, equinos e suínos e avaliar os níveis dessa substância, dos metabólitos e da micotoxina, e assim, definir um critério para distinção entre contaminação e utilização do implante (Launay *et al.*, 2004).

Nesse contexto, considerando a proibição ao uso de substâncias anabolizantes no país e ainda que existem grandes variações na capacidade de metabolização dos diferentes metabólitos da ZEA e daqueles utilizados com função anabólica como o zeranol, demonstra-se a necessidade de mais estudos utilizando metodologias instrumentais validadas, a fim de evidenciar a relação entre a contaminação acidental e o uso intencional.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Os objetivos deste estudo foram determinar o comportamento dos metabólitos da ZEA após fornecer milho contaminado com *Fusarium* spp. toxinas e/ou zeranol (uso de implante) ao longo do tempo, na urina bovina e também aplicar a equação recomendada pelo Laboratório de Referência da União Europeia para Promotores de Crescimento (EURL) para discriminar entre a contaminação natural da dieta e o uso ilegal do promotor de crescimento.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Estabelecer, em detalhes, o perfil metabólico da ZEA e dos seus metabólitos:  $\alpha$ -ZEL, seu isômero  $\beta$ -ZEL,  $\alpha$ -ZAL (zeranol) e seu isômero  $\beta$ -ZAL (taleranol) na urina de bovinos tratados com milho contaminado com ZEA e que receberam implantes de zeranol de três maneiras: alimentação contaminada com ZEA; implante de zeranol; e a combinação de alimentação contaminada com ZEA mais implante de zeranol.
- Avaliar o período de depleção dessas substâncias na urina de bovinos.
- Estudar se o modelo matemático proposto pelo EURL para avaliar o uso ilegal de zeranol pode ser usado para decidir sobre a contaminação natural com a micotoxina ZEA ou o uso ilegal de zeranol como promotor de crescimento.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

A dinâmica dos sistemas produtivos de grãos no Brasil torna favorável a ocorrência de fungos nas culturas semeadas em sucessão. Essa contaminação pode variar de acordo com a qualidade das sementes plantadas, condições ambientais, tais como temperatura, umidade relativa do ar e atividade de água do substrato, colheita precoce ou tardia, grãos processados com umidade alta, armazenamento inadequado e métodos de processamento na unidade de beneficiamento. Dessa forma, fungos filamentosos podem estar associados aos grãos causando deterioração e com potencial para produção de micotoxinas, comprometendo a qualidade desta matéria-prima (CAST, 2003).

#### 3.1. O gênero *Fusarium*

*Fusarium* é um gênero fitopatogênico diverso e cosmopolita de fungos filamentosos do filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales*, família *Nectriaceae*. Os seus membros representam um dos mais importantes grupos de patógenos que afetam a agricultura mundial. Eles apresentam uma alta diversidade morfológica, fisiológica e ecológica, ocorrendo na maioria dos nichos ecossistêmicos, amplamente distribuídos no solo, constituindo membros relativamente abundantes da microbiota do solo das regiões temperadas e subtropicais onde persistem na forma de micélio ou como clamidósporos (esporos dormentes). Sua abrangência inclui de saprofitismo, produção de micotoxinas em cereais, e patógenos facultativos de uma ampla gama de culturas, e podem, por esta via, entrar na cadeia alimentar e afetar a saúde de pessoas e animais (Barreto, 2018).

O gênero *Fusarium* possui cerca de vinte espécies e nele contem espécies potencialmente produtoras de diversas micotoxinas (Biscoto, 2022). A importância desse gênero foi retratada por Dean *et al.*, (2012), e *F. graminearum* e *F. oxysporum* são associados entre os dez mais importantes patógenos, científica e economicamente.

Apesar do fato de várias espécies de *Fusarium* spp. poderem estar implicadas em doenças de plantas, algumas merecem atenção especial pelo potencial de contaminação dos grãos, como *F. graminearum* (cuja forma sexuada é *Gibberella zeae*), *F. avenaceum* (cuja forma sexuada é *G. avenacea*), *F. culmorum*, *F. verticillioides* (anteriormente classificado como *F. moniliforme*), *F. roseus*, *F. tricinctum* e *F. nivale*. Estes fungos, quando em condições favoráveis, podem estar presentes em grãos como milho, soja,

amendoim, além de algodão, sorgo, trigo, centeio, aveia, arroz, cevada, contaminando estes alimentos e produzindo toxinas (Uhlig *et al.*, 2007).

### **3.2. *Fusarium* spp. toxinas**

O gênero *Fusarium* tem uma faixa de temperatura ótima para o seu desenvolvimento situada entre 20 a 25 °C. Contudo, suas toxinas são produzidas em temperaturas baixas, isto significa que o *Fusarium* spp. produz as micotoxinas sob o efeito de choque térmico, principalmente com alternância das temperaturas diurna e noturna (Neme & Mohammed, 2017). As principais *Fusarium* spp. toxinas que afetam os grãos de milho e sorgo são as fumonisinas, a ZEA, os tricotecenos (que são o maior grupo de micotoxinas conhecidos), o ácido fusárico e a moniliformina (Mallmann & Dilkin, 2007; Marin *et al.*, 2013).

Diversos tipos de *Fusarium* spp. toxinas podem estar presentes em um ingrediente particular ou em rações comerciais. Em geral, combinações de toxinas deste gênero resultam em efeitos aditivos; interações de sinergismo e/ou potencialização e representam grande preocupação para a saúde e produtividade dos animais domésticos (Alexander *et al.*, 2011).

Segundo Marin *et al.* (2010), na produção das micotoxinas, destacam-se *F. verticillioides* (*F. moniliforme*), espécie que pode contaminar os grãos de milho em pré e pós-colheita, produzindo fumonisinas sob condições abióticas; e *F. graminearum*, contaminante de milho e trigo, produzindo a ZEA.

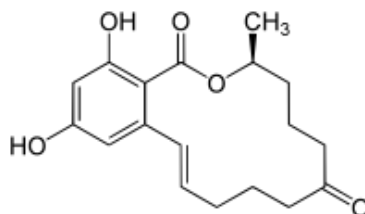
### **3.3. Zearalenona**

A micotoxina ZEA é um metabólito fúngico xenoestrogênico não esteroide, quimicamente classificada como lactona macrocíclica, derivada do ácido resorcílico, que pode ser encontrada em diferentes cereais e recursos forrageiros utilizados na alimentação animal como rações e volumosos produzidas a partir de grãos contaminados (Altomare *et al.*, 2021).

### 3.3.1. Estrutura química

A nomenclatura química da ZEA é o 6-(10-hidróxi-6-oxo-trans-1-undecenil)-b-ácido resorcíclico lactona, e a sua estrutura química encontra-se representada na Figura 1. Trata-se de um sólido cristalino incolor com ponto de fusão de 164-165°C, o que indica ser muito resistente a condições normais de processamento de ração e dificilmente destruída. ZEA é ligeiramente solúvel em água sendo mais solúvel em acetona, éter, benzeno, álcoois e álcalis aquosos. A sua degradação só foi observada em temperaturas extremamente altas ou em um ambiente alcalino, o que a torna termoestável durante o armazenamento, moagem, processamento e distribuição (Neme & Mohammed, 2017).

**Figura 1.** Estrutura química da ZEA



Fonte: Pitt *et al.* (2012)

### 3.3.2. Aspectos epidemiológicos

A ZEA é produzida principalmente por espécies do gênero *Fusarium* como *F. graminearum* e *F. culmorum*, em maior quantidade, mas também por *F. sporotrichioides*, *F. crookwellense*, e *F. cerealis*. A denominação zearalenona provém do fungo “*Gibberella zeae*” (forma sexuada do *F. graminearum*), produtor dessa micotoxina. As espécies de *Fusarium* spp. produtoras de ZEA podem ser encontradas em regiões de climas temperados e o seu crescimento é influenciado diretamente por condições ambientais, determinadas pela variação entre umidade, temperatura, oxigênio e pH (Malekinejad *et al.*, 2006).

A produção da ZEA é favorecida em temperaturas ambientais na faixa de 10°C (10 ± 5°C) sendo de 5 a 8 °C a faixa de temperatura ideal de sua produção, faixa esta não muito encontrada na maioria das regiões produtoras de grãos no Brasil, com exceção da região sul. A faixa de umidade relativa ideal para a produção de ZEA deve ser superior a 25%. Essa toxina é normalmente encontrada em baixas concentrações no campo, mas o

*Fusarium* spp. aumenta a sua produção sob condições de armazenamento entre 30 a 40%. Oscilações térmicas favorecem o crescimento fúngico em temperaturas mais altas, enquanto metabolismo para produção da toxina é desencadeado em temperaturas mais baixas. Dessa forma, a ocorrência de contaminação por ZEA torna-se mais comum em estações de alta umidade, acompanhadas de temperaturas amenas, especialmente em culturas de inverno (Grupta, 2007; Neme & Mohammed, 2017; Custódio, 2018).

Segundo Zinedine *et al.*, (2007), os fungos que produzem a ZEA também são capazes de formar  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL, porém, em doses inferiores quando comparadas à biotransformação que ocorre no organismo animal. Segundo Berthiller *et al.* (2013), as plantas também podem alterar a estrutura química das micotoxinas como parte de sua defesa contra xenobióticos e são capazes de formar  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL a partir da ZEA.

### **3.3.3. Formas de contaminação**

Os principais cereais susceptíveis a ZEA são milho, trigo, cevada, arroz, sorgo e centeio dentre outros. A contaminação dos alimentos por esta micotoxina é causada de forma direta nos grãos, ou pela transição da micotoxina e seus metabólitos em tecidos animais, leite e ovos após a ingestão de ração contaminada. Assim, o risco de exposição à ZEA está intimamente relacionado aos níveis de contaminação dos alimentos e à proporção de grãos na dieta (Zinedine *et al.*, 2006).

A presença de ZEA na ração é inevitável e, por ser um metabólico tóxico contaminante natural dos alimentos, a ingestão pelos animais torna-se preocupante. Sem um controle efetivo da integridade dos alimentos (ração, forragem e volumosos) o problema pode se estender por longos períodos (Maia *et al.*, 2021).

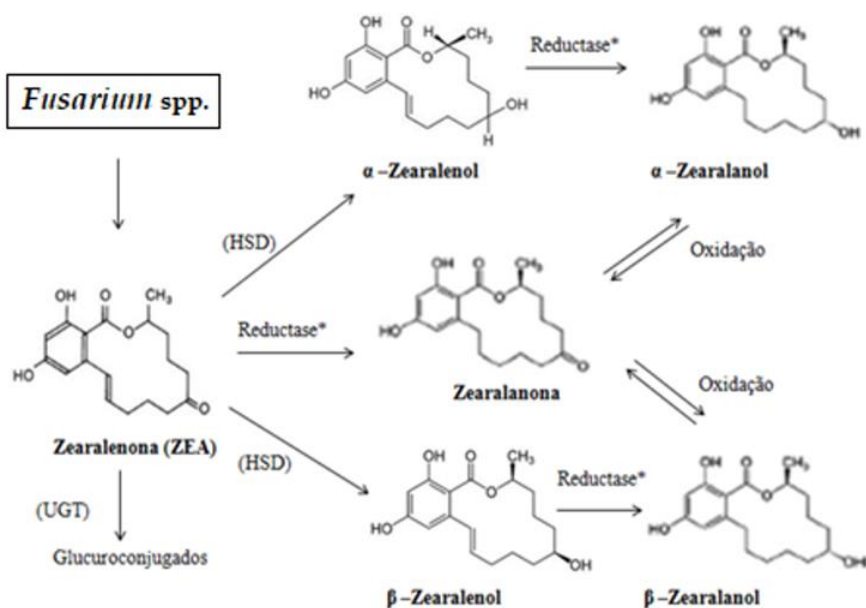
### **3.3.4. Biotransformação e excreção**

O metabolismo da ZEA resulta em cinco metabólitos:  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zearanol, zearalanona (ZAE) e taleranol, sendo que, em alguns casos, os seus metabólitos têm toxicidade mais acentuada (Kinani *et al.*, 2008). Assim, a extensão do seu metabolismo varia de acordo com as espécies, já que diferentes espécies animais reagem de modo diferente aos seus efeitos tóxicos, o que está relacionado com a biotransformação hepática desta micotoxina, mas também pela capacidade de conjugação com outras substâncias (Fink-Gremmels, 2008).

De maneira geral, após ser ingerida, a ZEA é rapidamente absorvida e metabolizada e os seus metabólitos já podem ser detectados no sangue cerca de 30 minutos após a ingestão. A absorção da ZEA ocorre na mucosa do intestino delgado (porção duodenal) e chega ao fígado, o principal local do seu metabolismo. Essa biotransformação pode ocorrer em duas fases: na Fase 1, ou fase não sintética, ocorre a hidroxilação e na Fase 2, ou fase sintética, ocorre a conjugação (Malekinejad *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2010).

A hidroxilação da ZEA ocorre no fígado e é catalisada pelas enzimas reductoras  $3\alpha$  e  $3\beta$ -hidroxiesteroides-desidrogenases (HSD). O mecanismo de ação de ambas na biotransformação da ZEA em animais ainda não é totalmente elucidado; porém, sabe-se que  $3\alpha$  e  $3\beta$ -HSDs estão presentes em vários órgãos e são responsáveis pelo metabolismo dos hormônios esteroides. Assim, em exposição prolongada no organismo, a ZEA compete com os hormônios esteroides por servir de substrato a essas enzimas. Nesta fase de hidroxilação, a ZEA é transformada pela  $3\alpha$  e  $3\beta$ -HSDs em dois metabólitos primários:  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL, respectivamente. Em seguida, ambos os metabólitos são novamente reduzidos a zeranol e taleranol, respectivamente. Estes últimos metabólitos podem ser convertidos a ZAE; porém, a ZEA também pode ser diretamente reduzida a ZAE. Esta rota foi demonstrada por muitos autores em várias espécies, como nos ratos, suínos e aves (Malekinejad *et al.*, 2006; Silveira, 2017). A biotransformação da ZEA é representada esquematicamente na Figura 2.

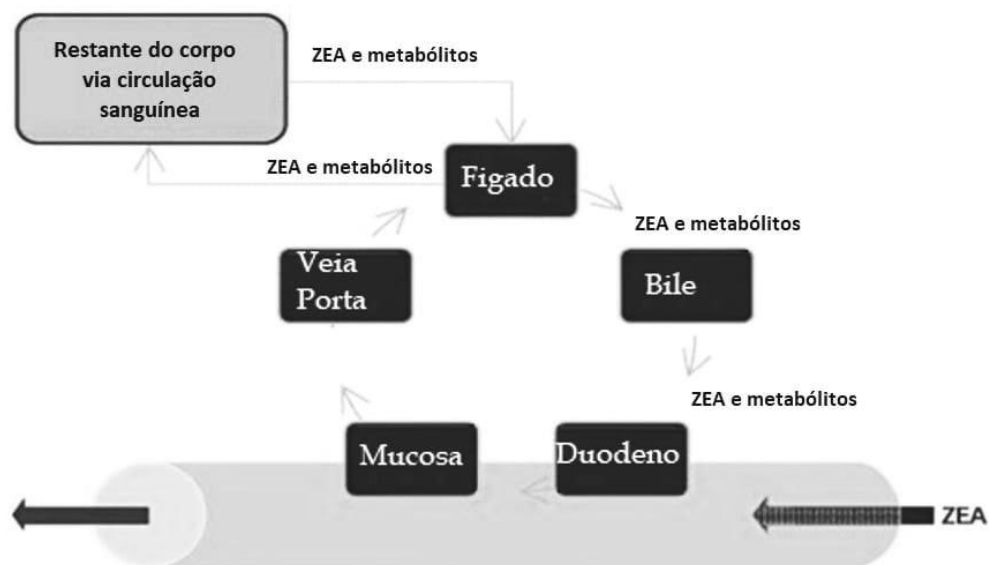
**Figura 2.** Representação dos metabólitos e principais enzimas envolvidas na biotransformação da ZEA



Fonte: Adaptado de Marin *et al.*, (2010)

Na conjugação (também chamada de glucuronidação), a ZEA e seus metabólitos são conjugados com ácido sulfônico ou ácido glicurônico, inativando-os, e em seguida catalizados pela enzima Uridina-difosfato-glucuronil-transferase (UDFGT), tornando ZEA e seus metabólitos mais solúveis. Depois da conjugação eles são eliminados na bile, urina e fezes. Uma porção pode retornar ao intestino delgado (duodeno) pela bile, e uma vez que os compostos conjugados de ZEA percorrem o intestino delgado, parte é excretada nas fezes e outra fração é reabsorvida pelas células da mucosa intestinal e entra novamente no pela através da circulação sistêmica via veia porta, formando um ciclo conhecido com circulação entero-hepática (Figura 3). A quantidade da enzima UDFGT no organismo de cada espécie animal é variável, assim como, conseqüentemente, também será variável a capacidade de conjugação e eliminação de toxinas por cada espécie (Fink-Gremmels & Malekinejad, 2007).

**Figura 3.** Metabolismo da ZEA no organismo (Circulação entero-hepática)



**Fonte:** Malekinejad *et al.*, (2006)

De forma geral, os metabólitos da ZEA podem ser excretados pela da urina e fezes como compostos livres ou conjugados; porém, os metabólitos conjugados são mais polares e, portanto, mais prontamente excretados pela urina e pela bile. Dessa foram, o perfil metabólico na urina e nas fezes é significativamente diferente entre as espécies (Fink-Gremmels, 2008; Minervini & Dell'Aquila, 2008).

### 3.3.4.1. Metabolismo em ruminantes

De forma geral os ruminantes são considerados mais resistentes aos efeitos adversos das micotoxinas quando comparados a outros animais. Essa condição ocorre porque a microbiota ruminal atua como uma primeira linha de defesa contra as toxinas proporcionando uma capacidade de biotransformar as micotoxinas em outros compostos, considerados menos tóxicos. Contudo, nem todas as micotoxinas são inativadas no rúmen, além disso, alguns microrganismos ruminais sofrem efeitos severos da ação antibiótica das micotoxinas. O impacto de cada tipo de micotoxina nos ruminantes também depende de outros fatores, como idade, raça, sexo, quantidade e tipo de micotoxina ingerida, além do estado imunológico do animal. No caso da ZEA essa capacidade não resulta em detoxificação pelo fato da sua metabolização ocorrer no fígado e intestino dos bovinos (Fink-Gremmels, 2008; Zain, 2011).

A partir da ingestão da ZEA, os ruminantes iniciam a biotransformação no rúmen, seguida pela absorção no intestino delgado (duodeno) e metabolização no fígado, onde ocorre a redução do grupo cetona na posição C-8 formando os 5 compostos:  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranol, taleranol e ZAE. Em seguida, prossegue o metabolismo destes compostos através da circulação entero-hepática, e excreção através da urina e fezes. Assim como a ZEA, a estrutura química dos seus cinco metabólitos também é semelhante ao estrógeno endógeno, portanto, ligam-se aos receptores de estradiol na ausência ou na baixa presença de estrogênio, resultando em alterações morfológicas e biológicas nos órgãos reprodutivos (Silveira, 2017).

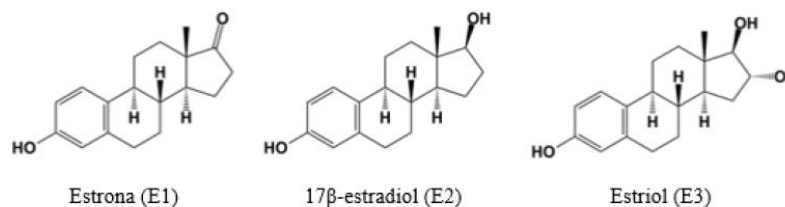
As duas principais moléculas resultantes desse processo metabólico (zeranol e taleranol) podem ser 60 e 0,2 vezes mais estrogênicas, respectivamente. Embora a maior parte da ZEA permaneça inalterada no rumem, a maior parcela do que é degradado nesse ambiente se converte em  $\alpha$ -ZEL e a estrogenicidade aumenta. Assim, se o alimento estiver contaminado a passagem pelo rúmen faz com que a ZEA continue sendo ou se torne ainda mais estrogênica, portanto, mais nociva. Entretanto, nos bovinos, ao final de todo o processo de biotransformação hepático, a ZEA é predominantemente convertida em  $\beta$ -ZEL, mais que  $\alpha$ -ZEL. Por esse motivo, apesar da nocividade, ruminantes apresentam maior resistência aos efeitos deletérios da ZEA quando comparados a outros animais de produção, que tem o  $\alpha$ -ZEL como principal metabólito da biotransformação da ZEA (Fink-Gremmels & Malekinejad, 2007; Kinani *et al.*, 2008).

Em ruminantes, o  $\alpha$ -ZEL, metabólico hidroxilado da ZEA, também pode ser convertido em zeranol por meio da hidrogenação no rúmen. Este último metabólito é um hormônio estrogênico, sendo considerado como um disruptor endócrino (substância química que pode interferir no sistema hormonal) (Silveira, 2017).

### 3.3.5. Mecanismo de ação

A ação de ZEA, e dos seus metabólitos é sistêmica. Devido a sua estrutura e de seus metabólitos serem flexíveis e semelhante aos estrógenos naturais (17 $\beta$ -estradiol, estriol e estrona) (Figura 4), eles se ligam competitivamente nos receptores estrogênicos (RE). Existem dois subtipos de receptores estrogênicos: RE- $\alpha$  e RE- $\beta$ , aos quais a ZEA, o  $\alpha$ -ZEL e o  $\beta$ -ZEL possuem diferentes graus de afinidade. O metabólito  $\alpha$ -ZEL é o que possui maior afinidade aos RE e sua afinidade chega a ser 10-20 vezes superior possuindo maior potencial estrogênico quando comparado a ZEA e 100 vezes superior que a afinidade entre RE e  $\beta$ -ZEL (Upadhaya *et al.*, 2010; Marczuk *et al.*, 2012).

**Figura 4.** Estrutura química dos estrógenos naturais



**Fonte:** Adaptado de Reis Filho *et al.* (2005)

Após a ligação de ZEA e seus metabólitos aos sítios de receptores do estrógeno, inicia-se a estimulação estrogênica ocorrendo um transtorno endócrino que tem como órgãos alvo o útero, tecido mamário, hipotálamo, hipófise e ovários provocando efeitos hiperestrogênicos (Pitt *et al.*, 2013).

### 3.3.6. Sinais clínicos em bovinos

Como consequência da estimulação estrogênica provocada pela exposição a ZEA e seus metabólitos, a sintomatologia clínica em bovinos varia de acordo com a categoria e o estado produtivo, afetando principalmente as fêmeas bovinas jovens podendo ocorrer

comportamento típico de cio, mesmo se a fêmea não estiver em estro, como por exemplo, em vacas prenhes. Já a exposição contínua dos animais à ZEA leva a alterações patológicas no sistema reprodutivo, causando diminuição dos índices de fertilidade em fêmeas e machos (Danicke *et al.*, 2005; Bretas, 2018).

Outros sinais clínicos observados são o aparecimento de cistos foliculares, aumento prematuro do úbere e falso cio, tornando muito mais difícil viabilizar a gestação das fêmeas durante o verdadeiro cio. O resultado é percebido pelo aumento do intervalo entre partos, causando importantes perdas econômicas, uma vez que, quanto mais tempo as matrizes demoram a emprenhar, maiores são as chances de ser descartadas do rebanho (Silvia *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2016).

As fêmeas bovinas também podem apresentar secreção vaginal, vulvovaginite, edema de glândula mamária, vulva e útero, além de prolapso uterino, vaginal e de reto. A ovulação, implantação e a gestação podem ser acometidas com a morte embrionária e aborto, bem como redução na produção de leite (D’Mello, 1999; Gallo *et al.*, 2015).

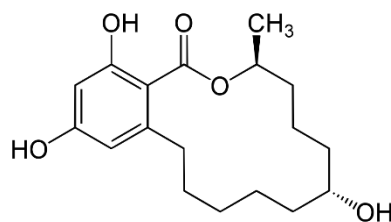
O consumo prolongado de dietas contaminadas com micotoxinas pode causar intoxicação subaguda ou crônica em bovinos e as consequências diretas da intoxicação causam redução do consumo de matéria seca, baixa conversão alimentar, redução no ganho de peso, ocorrência de doenças, problemas reprodutivos e perdas econômicas (Vedovatto *et al.*, 2020).

### **3.4. Zeranól**

O zeranol é um hormônio estrogênio não esteroide, semi-sintético, utilizado como promotor de crescimento (agente anabólico) que pode ser produzido em escala industrial em laboratórios farmacêuticos a partir do metabolismo da micotoxina ZEA purificada. Por outro lado, zeranol também pode ocorrer na ração animal pela contaminação acidental por fungos do gênero *Fusarium* spp. e produção de ZEA (Malekinejad *et al.*, 2006).

#### **3.4.1. Estrutura química**

O zeranol é classificado como uma lactona do ácido resorcílico obtido da ZEA produzida pelo fungo *Gibberella zeae*, em escala comercial (Malekinejad *et al.*, 2006; Fink-Gremmels & Malekinejad, 2007). A estrutura química do zeranol é o ácido 2,4-di-hidroxi-6-(6 $\alpha$ ,10-di-hidroxiundecil) benzóico  $\mu$ -lactona (Figura 5).

**Figura 5.** Estrutura química do zeranol

Fonte: Pitt *et al.* (2012)

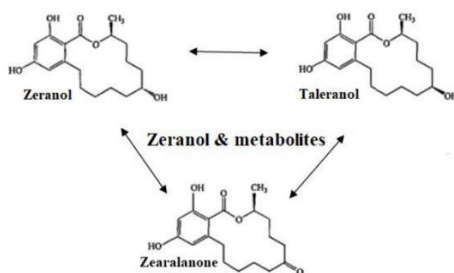
### 3.4.2. Indicação de uso

O zeranol tem atividade estrogênica e anabólica e vem sendo comercializada em formulações sintéticas de uso veterinário sendo utilizada livremente por muitos países dentro de uma prática produtiva. Como agente anabólico, ela melhora a eficiência metabólica e conseqüente aumento do ganho de peso vivo, do peso da carcaça e do percentual de carne em determinadas espécies, incluindo bovinos (Makinde *et al.*, 2020; Ropejko & Twaruzek, 2021; Arrizabalaga-Larrañaga, 2023).

### 3.4.3. Biotransformação e excreção

Quando utilizado na forma de implantes subcutâneos, o zeranol é absorvido lentamente pela corrente sanguínea e, no organismo do animal, as maiores concentrações de resíduos de anabolizantes são encontradas no local de administração, na bile, nas fezes e na urina, enquanto concentrações medianas podem ser encontradas no fígado e nos rins e as menores concentrações nos músculos e gordura (Salvat *et al.*, 2015).

O metabolismo do zeranol indica a interconversão com dois dos seus metabólitos: o taleranol e a ZAE, pela possibilidade de reações químicas reversíveis e contínuas, conforme indicado na Figura 6 (Kleinova *et al.*, 2002).

**Figura 6.** Interconversão metabólica do zeranol e seus metabólitos (taleranol e ZAE)

Fonte: Adaptado de Kennedy *et al.*, (1998)

#### **3.4.4. Toxicidade**

Devido à sua atividade estrogênica, o uso do zeranol como melhorador de desempenho, pode causar distúrbios metabólicos e reprodutivos em ruminantes e, conseqüentemente, em humanos, pelo consumo de alimentos de origem animal contaminados. Por esse motivo, vários países têm restrição ao seu uso devido ao perigo potencial para a saúde (Duarte *et al.*, 2002).

#### **3.4.5. Apresentações comerciais**

Os implantes de zeranol são normalmente feitos de um pó que é comprimido em um pequeno *pellet*, o qual é implantado sob a pele, na parte de trás da orelha do animal. Cada tipo ou marca de implante tem um aplicador específico, conhecido como pistola de implante, que é usado para administrar adequadamente o medicamento.

### **3.5. Resíduos em produtos de origem animal**

A preocupação com o consumo de alimentos com potencial risco a saúde humana leva toda a cadeia produtiva a ter uma atenção maior na etapa de produção animal. A contaminação por ZEA ou o uso abusivo de zeranol podem deixar resíduos nos produtos de origem animal e a presença desses nos alimentos tem potencial para ocasionar diferentes reações adversas na saúde humana, dentre elas a ocorrência de quadros clínicos envolvendo o sistema endócrino e reprodutivo. Tais conhecimentos tornam-se bastante relevantes no que diz respeito à saúde pública e às relações internacionais de comércio (Zhang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2015).

No caso do zeranol, devido a sua proibição em muitos países, a sua presença pode gerar grandes impactos em toda a cadeia produtiva animal envolvida, desde impactos econômicos, como embargos para mercados e penalizações para os produtores, além dos impactos na saúde pública, como os possíveis danos à saúde humana quando são alimentados com carne ou leite contendo resíduos desta substância (Kootstra *et al.*, 2007).

### **3.6. Regulamentação sobre a presença de micotoxinas em produtos de origem animal**

A avaliação da qualidade dos produtos agrícolas no que se refere à contaminação com micotoxinas é de grande importância para a saúde pública pelo risco que representa o consumo dos alimentos contaminados. Para proteger a saúde humana e animal dos efeitos tóxicos das micotoxinas e defender interesses econômicos, muitos países estabelecem níveis máximos permitidos para esses contaminantes, que são os Limites para Tomada de Medida (LTM) para cada micotoxina. O LTM é baseado em pesquisas científicas sobre os efeitos dessa toxina para a saúde humana e animal e é estabelecido em regulamentações e parâmetros considerados seguros para a ingestão dos alimentos. Dessa forma, a quantidade de uma determinada micotoxina que uma espécie pode ser exposta sem representar um risco significativo para a sua saúde é que define seu LTM (Sartori, 2015; EFSA, 2018).

No caso das micotoxinas, o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de métodos analíticos rápidos e precisos para a sua determinação em alimentos devem ser constantes, a fim de adequá-los às exigências das análises de rotina, e principalmente para atender aos LTM. O avanço do conhecimento sobre os efeitos negativos das micotoxinas e também a implantação de métodos analíticos cada dia mais sensíveis, faz com que os valores de LTM sejam cada vez mais baixos, visando assegurar alimentos com níveis menores de contaminantes (Moretti *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2018).

Os LTM para micotoxinas são determinados por órgãos regulatórios, como o *Codex Alimentarius*, o Comitê de Produtos Alimentares da Agência Europeia de Medicina (EMA) e também pelo *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), conselho científico da Organização Mundial de Saúde (WHO), e da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), ambos ligados à Organização das Nações Unidas (ONU). Todos esses órgãos são responsáveis em avaliar, internacionalmente o risco e, dessa forma, o monitoramento de resíduos é obrigatório em animais produtores de alimentos (Diretiva do Conselho, 1996; Brasil, 2011, WHO, 2002).

No Brasil, cabe a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde (MS), estipular os LTM para micotoxinas em alimentos diversos. No caso de não estarem estabelecidos, a ANVISA utiliza os constantes nas Diretivas da União Europeia, os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, ou ainda, os adotados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Cabe

também ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), pelo do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), monitorar a presença e a violação desses níveis de LTM para resíduos e contaminantes.

### **3.6.1. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC)**

O PNCRC Animal é uma ferramenta de gerenciamento de risco que tem o objetivo de promover segurança química dos alimentos de origem animal produzidos no Brasil. A principal base legal do programa é a IN nº 42, de 20 de dezembro de 1999 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) (BRASIL, 1999).

No âmbito do PNCRC são elaborados planos anuais de coleta de amostras para análises de ovos, leite e mel encaminhados para processamento e animais encaminhados para abate em estabelecimentos sob inspeção federal. Os testes incluem ampla gama de drogas veterinárias autorizadas (para as quais é testado o atendimento dos limites aplicáveis) e proibidas (incluindo hormônios), agrotóxicos, contaminantes inorgânicos, micotoxinas e dioxinas (BRASIL, 2023).

As amostras são coletadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) de lotes de animais e produtos de uma única origem, o que permite a rastreabilidade da propriedade rural de procedência. As análises são realizadas em laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, composta pelos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) e laboratórios públicos/privados credenciados pelo MAPA. Em caso de violação são instaurados subprogramas de investigação que inclui a fiscalização da propriedade rural de origem do lote amostrado para identificação das causas da violação, aplicação de eventuais sanções administrativas e controle do risco de novas violações (BRASIL, 2023).

Devido à dificuldade para se distinguir a presença de zeranol proveniente da contaminação da ração animal com a presença da ZEA proveniente da utilização do implante de anabolizante, o PNCRC inclui a pesquisa comparativa de ZEA e de quatro dos seus metabólitos:  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol dentro do escopo de pesquisa para anabolizantes (BRASIL, 2023).

Em um histórico de resultados do programa de monitoramento do PNCRC/Animal dos últimos cinco anos (2019 a 2023) não houve violações para a presença de zeranol em nenhuma amostra de espécie ou matriz analisada; porém o programa de monitoramento

detectou nessas análises violações abusivas para o zeranól em amostras de urina de bovinos em anos anteriores como em 2016 (uma amostra dentre 262), 2017 (duas amostras dentre 602) e 2018 (duas amostras dentre 612) (BRASIL, 2023).

### 3.6.2. Legislação para matérias-primas alimentares

O Brasil não possui regulamentação para micotoxinas em alimentação animal, e por isso a legislação da EU é muito utilizada como parâmetro, por ser bastante completa (Biscoto, 2022). O Regulamento 319/2016 de 29 de julho de 2016 da Comissão Europeia estabeleceu valores de orientação para DON, fumonisinas B1 e B2, ocratoxina A, T-2 toxina e ZEA nos produtos destinados a alimentação animal. A Tabela 1 apresenta os valores de orientação estabelecidos para a micotoxina ZEA em produtos e matérias-primas para alimentação animal (EU, 2016).

**Tabela 1.** Valores de orientação estabelecidos para ZEA para produtos e matérias-primas para alimentação animal

<b>Produtos e matérias-primas para alimentação animal</b>	<b>Valor de orientação em <math>\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}</math> de alimento para animais (teor de umidade de 12 %)</b>
Cereais e produtos à base de cereais com exceção dos subprodutos do milho	2000
Subprodutos do milho	3000
Alimentos compostos para leitões, marrãs (porcas jovens), cães e gatos jovens para reprodução	100
Alimentos compostos para cães e gatos adultos (exceto reprodução)	200
Alimentos compostos para marrãs e suínos de engorda	250
Alimentos compostos para vacas leiteiras, ovelhas (incluindo borregos) e cabras (incluindo cabritos)	500

**Fonte:** Regulamento nº1319 (EU, 2016)

### 3.7. Métodos analíticos para a pesquisa de resíduos e contaminantes

Nos últimos anos, foi observado o desenvolvimento de novos métodos analíticos, visando à determinação de resíduos de drogas e contaminantes em alimentos. Estes avanços tiveram como objetivo a substituição dos métodos tradicionais de análise de resíduos que apresentavam como característica a morosidade de suas diversas etapas e o

emprego de grandes volumes de solvente, além do alto custo. No tocante às micotoxinas, vários métodos de análise foram usados para aumentar a sensibilidade e a precisão da detecção destes contaminantes em alimentos (Keskin & Eyupoglu, 2023).

Para a pesquisa e estudo da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes em produtos de origem animal, em conformidade com a legislação vigente, é imprescindível a disponibilidade de métodos rápidos, confiáveis e sensíveis. Para serem eficientes, esses métodos devem apresentar alta seletividade e especificidade, além de serem executados por laboratórios com adequada capacidade técnica e analítica (Silveira, 2017).

As metodologias analíticas utilizadas para a determinação de substâncias tóxicas em alimentos devem ser capazes de quantificar os analitos em concentrações muito baixas, assim como identificá-los de maneira inequívoca. A presença de resíduos e contaminantes pode ser detectada por diversos métodos analíticos, dentre os quais se destacam os ensaios físico-químicos que utilizam técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (Paschoal *et al.*, 2008).

### **3.7.1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial com extração por *QuEChERS***

A técnica de cromatografia líquida oferece maior seletividade e sensibilidade além de baixo tempo de análise, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. Essa técnica possibilita análises de múltiplos resíduos em um mesmo método, em pequenas concentrações ( $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ ), permitindo a confirmação inequívoca da identidade molecular do analito, além de possuir a opção de uso de padrões internos (Krska *et al.*, 2008).

A cromatografia líquida pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (Chiaradia *et al.*, 2008).

A possibilidade da análise sequencial, também conhecida como Cromatografia Líquida associada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS), que, ao invés de empregar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão  $m/z$  gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas (EM1 e

EM2), no qual um deles tem a finalidade de isolar o íon de interesse, e o outro é usado para estabelecer uma relação entre o íon isolado e outros íons gerados a partir da sua decomposição induzida. Este procedimento favorece ainda mais a elucidação estrutural da molécula, uma vez que aumenta a detectabilidade do analito e reduz a interferência espectral de outros compostos presentes na matriz, já que os íons fragmentados formados são característicos para cada composto (Ardrey, 2003; El-Aneed *et al.*, 2009).

A LC-MS/MS possibilita a obtenção de informações estruturais acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características do tempo de retenção dos compostos analisados, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas molares ou gerarem diferentes espectros de massas, tornando-se, assim, a técnica de escolha para análise de resíduos de medicamentos e contaminantes em alimentos (Lima, 2016; Pastore, 2018).

O método de extração e preparo de amostras denominado *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), proposto por Anastassiades *et al.* (2003), possibilita a extração e isolamento da matriz de interesse em poucas etapas, com quantidade mínima de solvente, empregando métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. Esse método surgiu para superar limitações existentes nos métodos multirresíduo de extração de agrotóxicos em alimentos (método de *Mills* e de *Luke*), os quais empregavam grandes quantidades de amostra e solvente e elevado número de etapas, que acarretavam em análise de elevado custo com grandes probabilidades de erros (Zanella *et al.*, 2015). O intuito inicial era que o método *QuEChERS* fosse um procedimento dinâmico com simplicidade experimental, capaz de ser empregado em qualquer laboratório sem sacrificar o resultado analítico (Anastassiades *et al.*, 2003).

Combinando três etapas sequenciais, extração com acetonitrila, partição por *salting out* e o *clean-up* por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), o *QuEChERS* fornece uma amostra limpa para a análise cromatográfica. A primeira etapa faz uso de acetonitrila para extração das espécies de interesse, seguida de uma etapa de partição líquido-líquido pela adição dos sais  $MgSO_4$  e  $NaCl$ . Após centrifugação, a remoção da água residual e a limpeza da amostra são realizadas simultaneamente empregando uma etapa d-SPE, na qual uma fase sorvente (PSA, *Primary Secondary Amine*, que se trata de uma sílica modificada com grupos amino primários e secundários) combinada com  $MgSO_4$  é empregada (Anastassiades *et al.*, 2003; Prestes *et al.*, 2009).

### 3.8. Determinação de lactonas do ácido resorcílico em urina de bovinos

As concentrações dos resíduos de ZEA, zeranol e seus metabólitos no organismo variam consideravelmente de tecido para tecido. Geralmente, observam-se níveis mais elevados em tecidos de estocagem ou em órgãos que metabolizam e excretam estas substâncias como fígado e rins. Baseado nesta teoria, o MAPA tem recomendado que as análises para controle de qualidade de carnes sejam realizadas, além do músculo, também em fígado, rim e urina dos animais de produção, sendo esta última considerada a matriz de escolha para monitoramento oficial (Silveira, 2017; Rocha, 2020).

Para a quantificação desses analitos, atualmente o desenvolvimento de metodologias analíticas tendem a utilizar a LC/MS-MS e a aplicação de preparo de amostras fundamentada na metodologia *QuEChERS* com extração em fase sólida. Esta metodologia quando oficial e validada permite oferecer uma frequência analítica mais elevada e bom desempenho a um custo de análise mais reduzido. O equipamento tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Matraszek-Zuchowska *et al.*, 2013; Di Nardo *et al.*, 2017; Hossain & Maragos, 2018).

### 3.9. Projeto “Zeranol Natural”

Devido à dificuldade para se distinguir a presença de zeranol proveniente de contaminação da ração animal com a presença da ZEA ou proveniente da utilização do implante de anabolizante, a EU, através do EURL financiou um programa intitulado “Zeranol Natural”, que objetivou estabelecer procedimentos para detecção do zeranol em amostras de urina de bovinos, equinos e suínos e avaliar os níveis dessa substância, dos metabólitos e da micotoxina, e assim, criar um critério para distinção entre os dois tipos de contaminação (Silveira, 2017).

Dentro deste programa foi realizado um estudo epidemiológico baseado em uma equação de regressão linear com um intervalo de predição de 99%. Um total de 8.008 amostras de urina foram rastreadas para a presença de zeranol e 174 amostras positivas foram analisadas por LC-MS/MS confirmatória. Destas, 170 foram classificadas como contaminadas por *Fusarium* spp. toxinas e o uso de zeranol como promotor de crescimento foi detectado em apenas quatro amostras. Com base nesse estudo foi criada

uma ferramenta matemática (modelo log-log) para decidir se a contaminação detectada é natural (pela presença da micotoxina ZEA) ou ilegal (abuso pelo uso do implante de zeranol) (Launay *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de métodos de triagem e métodos confirmatórios eram insuficientes para distinguir entre abuso de zeranol ou contaminação ambiental com ZEA. Portanto, o projeto “Zeranol Natural” não objetivou apenas desenvolver testes de triagem e métodos confirmatórios, mas também tentou comparar níveis de *Fusarium* spp. toxinas com níveis de zeranol e taleranol e determinar critérios para distinguir entre abuso de zeranol e contaminação ambiental por ZEA, além de melhorar reagentes e procedimentos para a implementação da política comunitária relativa à proibição do uso de zeranol como agente anabólico em alimentos animais (Dickson *et al.*, 2009).

Porém, alguns autores afirmam que seja prudente que se confirme o uso do zeranol somente quando é possível a confirmação da ausência da micotoxina na ração. Assim, a constatação de zeranol em um animal pode, por si só, ser prova insuficiente de que tenha ocorrido abuso de zeranol, sendo necessário, portanto, distinguir entre o abuso do zeranol ou contaminação acidental pela micotoxina ZEA proveniente de *Fusarium* spp., através de critérios quantitativos já estabelecidos (Launay *et al.*, 2004; Kinani *et al.*, 2008).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG). A pesquisa de ZEA no farelo de milho foi realizada no Laboratório de Resíduos e Contaminantes em Alimentos (RCA) do LFDA/MG, em Pedro Leopoldo (MG). A criação dos bovinos e coleta das amostras foi realizada em uma unidade experimental especialmente montada, localizada no município de Montes Claros (MG), Minas Gerais. As análises do perfil metabólico da ZEA ( $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol) e do zeranol (zeranol e taleranol) na urina dos bovinos foram realizadas no RCA do LFDA/SP do MAPA, em Campinas (SP).

O estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo da autorização 258/2018).

#### 4.1. Criação e alimentação dos animais

Foram utilizados 24 bovinos, sendo 12 fêmeas e 12 machos (não castrados), todos com características fenotípicas semelhantes (mestiços do grupamento racial dos zebuínos – *Bos indicus*); mesma faixa etária (média de 18 meses) e peso (180 kg as fêmeas e 200 kg os machos), todos criados em condições ambientais semelhantes. Os animais foram sorteados e alojados em baias individuais de acordo com os tratamentos.

A dieta experimental dos animais foi composta de 500 g de farelo de milho e 15 a 20 kg de silagem de milho por dia. Água e sal mineral sem suplementação proteica foram oferecidos à vontade durante todo o período de criação. Todos os alimentos utilizados (farelo e silagem de milho) foram analisados por LC-MS/MS, metodologia validada pela EU (Decisão da Comissão 2023/2782/UE, 2023), quanto à presença de ZEA e seus metabólitos, antes de serem oferecidos aos animais e estes contaminantes não foram detectados.

#### 4.2. Tratamentos

O experimento contou com três tratamentos, cada um com oito animais sendo quatro fêmeas e quatro machos. Os tratamentos foram definidos de acordo com o hormônio e a micotoxina oferecidos aos animais, da seguinte forma:

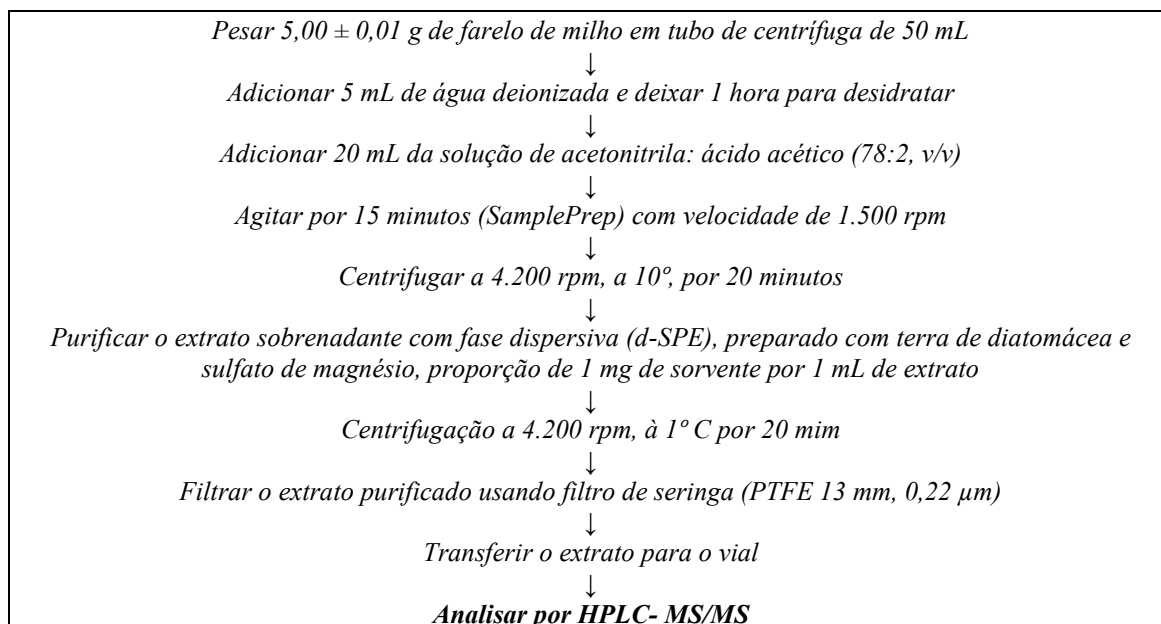
- A) bovinos que receberam dieta contaminada com ZEA;
- B) bovinos que receberam implante de zeranol e dieta livre de ZEA;
- C) bovinos que receberam implante de zeranol e dieta contaminada com ZEA.

#### 4.3. Contaminação do milho

Todo o farelo de milho utilizado no experimento foi previamente submetido a pesquisa de ZEA e seus metabólitos, e confirmada a ausência destes. Em seguida, parte do farelo de milho foi contaminada intencionalmente com ZEA e nova análise pela mesma metodologia foi feita para determinar a quantidade de toxina adicionada. Foram quantificados  $4.200 \pm 400 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e, dessa forma, os animais receberam cerca de  $2.100 \pm 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de ZEA por dia. A ingestão dessa quantidade de ZEA por dia não causa toxicidade nos animais (Salvat *et al.*, 2015).

A metodologia analítica oficial utilizada na pesquisa de ZEA no farelo de milho foi desenvolvida e validada no RCA do LFDA/MG (Pedro Leopoldo), de acordo com os procedimentos descritos no Manual da Garantia da Qualidade Analítica do Laboratório (BRASIL, 2011) e com o Regulamento 808/2021/CE. Foi utilizado um sistema de LC-MS/MS (marca Agilent, modelo 1290 - Santa Clara, USA) acoplado à um espectrômetro de massas sequencial (marca ABSciex, modelo QTRAP 6500 - Toronto, Canada), equipado com fonte de ionização por ESI. Foi usada uma coluna cromatográfica de fase reversa, modelo XR-ODSII com dimensões de 100 x 2,0 mm x 2,2  $\mu$ m (Shim-pack, Shimadzu, Japão). O fluxograma de extração das amostras encontra-se representado na Figura 7.

**Figura 7.** Fluxograma do procedimento de extração do farelo de milho



#### 4.4. Aplicação dos implantes

No primeiro dia do período experimental os implantes da marca *Ralgro*<sup>®</sup> (*Merck, Rahway, NJ, EUA*) foram aplicados entre a pele e a cartilagem na parte de dorsal da orelha direita e abaixo da linha média, de acordo com as orientações do fabricante. Três implantes de zeranol em formato de pellets de 12.000  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> cada um foram colocados em cada animal, totalizando 36.000  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> por animal, dosagem indicada pelo fabricante. A concentração de zeranol de cada implante, relatada pelo fabricante, foi pesquisada e confirmada por LC-MS/MS.

#### **4.5. Período experimental**

Os períodos experimentais de cada tratamento foram estabelecidos de acordo com o tempo de consumo da ZEA e de exposição ao implante zeranol, da seguinte forma:

- tratamentos A: totalizando 15 dias, sendo 12 dias de avaliação com o farelo de milho contaminado, seguidos por mais três dias de avaliação do período de depleção com alimentação não contaminada.
- tratamentos B: totalizando 110 dias, sendo 90 dias de liberação do implante, de acordo com o fabricante, seguidos por mais 20 dias para avaliação da depleção do hormônio.
- tratamentos C: totalizando 30 dias, sendo 12 dias de alimentação com milho contaminado seguidos por mais 18 dias para a avaliação do implante, porém, sem dieta contaminada.

Previamente ao início do experimento foi respeitado o período de 15 dias necessários para ambientação dos animais de todos os tratamentos às dietas individuais e ao manejo experimental.

#### **4.6. Obtenção das amostras**

No dia zero de todos os tratamentos, a urina de todos os animais foi coletada sendo estas amostras consideradas como grupo controle para cada tratamento. No primeiro dia do experimento iniciou-se a alimentação contaminada com milho (tratamentos A e C) e os animais receberam o implante de zeranol (tratamentos B e C). Posteriormente, as coletas foram realizadas nos dias 2, 3, 4, 8, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 85, 90, 95, 100 e 110. As amostras de urina foram coletadas individualmente, acondicionadas em tubos tipo *Falcon* de 50 mL (em torno de 30 mL de urina), e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e enviadas ao laboratório.

#### **4.7. Pesquisa de lactonas do ácido resorcíclico**

##### **4.7.1. Análises laboratoriais**

As análises do perfil metabólico da micotoxina ZEA do anabolizante zeranol em urina de bovinos foram avaliadas usando um método de extração *QuEChERS* e análise

instrumental em um sistema LC-MS/MS. A metodologia analítica oficial utilizada foi desenvolvida e validada no RCA do LFDA/SP (Campinas) de acordo com os procedimentos descritos no Manual da Garantia da Qualidade Analítica do Laboratório (BRASIL, 2011) e com o Regulamento 657/2002/CE (EU, 2002).

#### 4.7.1.1. Produtos químicos e reagentes

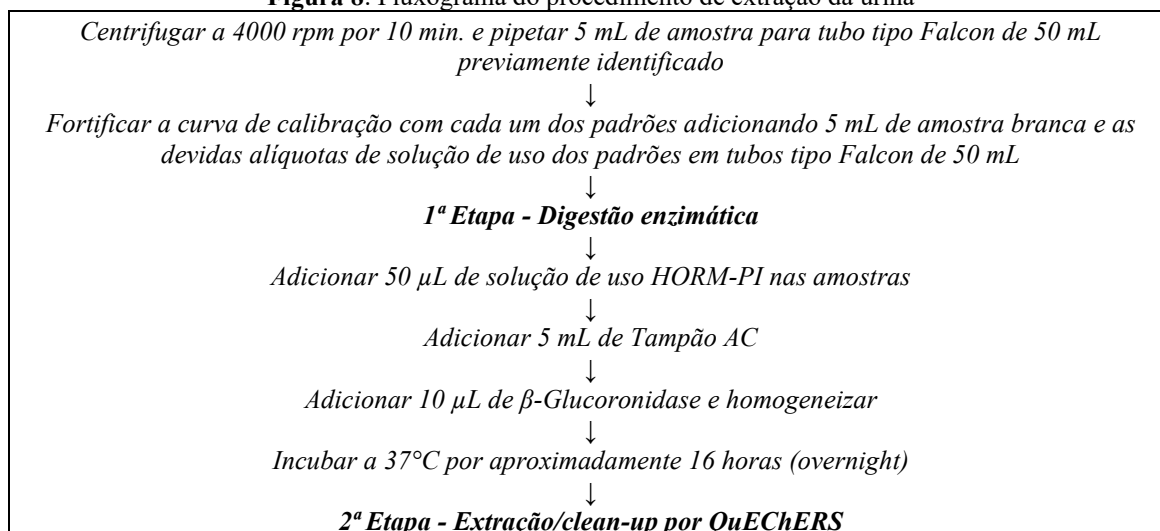
Os padrões analíticos de ZEA,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol foram obtidos do *National Measurement Institute* (Canberra, Austrália), enquanto o Estradiol-d4 (padrão interno) foi adquirido da *Toronto Research Chemicals* (Toronto, Canadá).

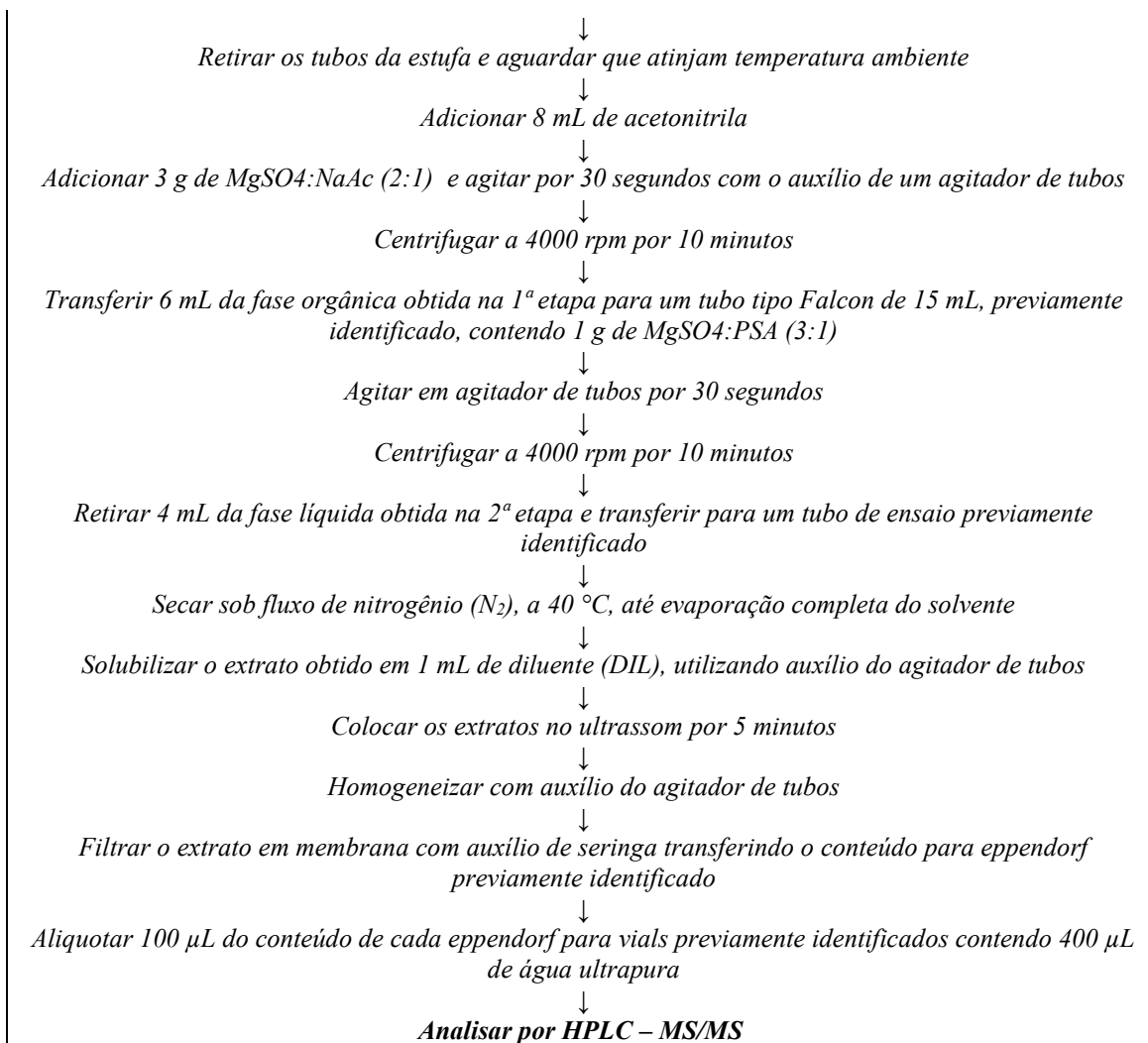
Foram usados ainda acetonitrila grau LC (*JT Baker*, Center Valley, PA, EUA), metanol grau LC e sulfato de magnésio anidro (*Scharlau*, Espanha), ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e ácido fórmico (*Merck*, Alemanha), acetato de sódio anidro (*Neon*, Brasil), acetato de amônio ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ ),  $\beta$ -Glucuronidase Tipo HP-2 da *Helix Pomatia* e PSA (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA).

#### 4.7.1.2. Procedimento de extração

Para realização do procedimento de extração, as amostras de urina foram descongeladas em geladeira 24 horas antes e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. Foram pipetados 5 mL de amostra para tubo tipo *Falcon* de 50 mL previamente identificado. A extração dos compostos foi realizada utilizando o método de digestão enzimática e extração/clean-up por *QuEChERS*. O procedimento de extração e purificação está demonstrado em forma de fluxograma na Figura 8.

**Figura 8.** Fluxograma do procedimento de extração da urina





#### 4.7.1.3. Instrumentação

As análises foram realizadas usando um sistema *Waters Technologies ACQUITY UPLC I-Class*, acoplado ao espectrômetro de massas *Xevo TQ-XS* Triplo Quadrupolo (*Waters, Milford, MA, EUA*). Uma coluna *InfinityLab Poroshell 120 EC-C18* (50 x 3,0 mm, 2,7 µm) foi usada para a separação cromatográfica a 40°C. A fase móvel A consistiu em água, e a fase móvel B usou metanol a uma vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. As condições iniciais foram definidas em 50% A e B com um gradiente linear de 50% A a 40% A por 3 min e de 40% A a 35% em 2 min e retornou a 50% A de 5,0 min a 5,6 min. Então, 50% A foi mantido até 7,0 min. O volume de injeção foi de 10 µL.

As condições operacionais do espectrômetro de massas foram estabelecidas por infusão direta dos padrões. Dois íons de produto, um para quantificação e outro para confirmação, foram estabelecidos e monitorados para cada analito. As análises foram

realizadas usando ionização por *Eletrospray* (ESI) no modo de íon negativo. O nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação a uma vazão de 1.000 L h<sup>-1</sup> e 150 L h<sup>-1</sup>, respectivamente. A temperatura de dessolvatação foi mantida em 500 °C, a voltagem capilar foi ajustada em -2,5 kV e o fluxo de gás do nebulizador em 7 bar. Argônio foi usado como gás de colisão, e o fluxo foi ajustado em 0,15 mL min<sup>-1</sup>. Os parâmetros e condições de fragmentação, bem como o tempo de retenção aproximado para os analitos pesquisados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições de fragmentação e tempo de retenção aproximado para hormônios

Analito	Q1 ( <i>m/z</i> )	Q3 ( <i>m/z</i> )	Dwell time (s)	Collision Energy (eV)	Cone Voltage (V)	Tempo de retenção (min)
Taleranol (TAL)	321,17	91,02 <b>277,18</b>	0,050	34 22	48	2,62
β-Zearalenol (bZE)	319,16	130,04 <b>174,03</b>	0,030	34 25	46	2,94
Zeranol (ZER)	321,17	91,02 <b>277,18</b>	0,022	34 22	48	3,57
α-Zearalenol (aZE)	319,16	130,04 <b>174,03</b>	0,022	34 25	46	3,83
Zearalenona (ZEA)	317,14	131,05 <b>175,04</b>	0,022	28 25	52	4,21
Estradiol-d4 (E2-d4)	274,97	243,07	0,022	42	8	3,57

\* Valores de massa/carga em negrito na tabela acima (coluna "Q3 (*m/z*)") se referem às transições utilizadas para quantificação.

#### 4.7.1.4. Análise dos dados obtidos

Os resultados da pesquisa foram avaliados de acordo com a metodologia oficial validada. No método utilizado são consideradas quantificações qualquer resultado com valores maiores ou iguais aos respectivos Limite de Decisão (CC $\alpha$ ) e que foram confirmados, dentro dos critérios estabelecidos, para "tempo de retenção relativo", razão sinal/ruído e razão de íons (*ion ratio*).

#### 4.8. Discriminação entre abuso de zeranol ou contaminação por *Fusarium* spp. toxinas pelo modelo estatístico

A equação proposta pelo EURL, que distingue o uso abusivo do promotor de crescimento zeranol da contaminação natural com toxinas de *Fusarium* spp., foi usada para interpretar os resultados obtidos. Este modelo relaciona a soma das concentrações de zeranol e taleranol (variável resposta) com as concentrações de toxinas de *Fusarium* spp. (variável explicativa), transformadas em logaritmos de base 10 (Launay *et al.*, 2004). Para calcular o intervalo de predição, a seguinte equação foi usada:

$$\alpha + \beta x_0 \pm t(d.f) \sqrt{s^2 \left( \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} + \frac{1}{n} + 1 \right)}$$

em que  $n$  é o número de observações e  $t(d.f)$  é o ponto percentual desejado da distribuição  $t$ . Assim, para um intervalo de predição de, por exemplo, 99% e um valor  $x$  de  $x_0$ , a equação acima dará dois valores entre os quais temos 99% de certeza de que o valor verdadeiro deve estar para esse valor  $x$ .

#### 4.9. Delineamento experimental

Para as avaliações da presença de ZEA, zeranol e seus metabólitos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, sendo as parcelas constituídas pelos três tratamentos com quatro machos e quatro fêmeas cada e as subparcelas constituídas pelos dias de coleta de urina. Como não foram observadas diferenças entre os sexos, cada tratamento teve oito repetições de um bovino cada.

Os níveis dos metabólitos de ZEA e zeranol encontrados foram submetidos ao Modelo Aditivo Generalizado (GAM) e foram ajustados devido à natureza não linear dos resultados de cada tratamento ao longo dos dias de coleta de urina. Não foram criados modelos comparando tratamentos entre si.

Os termos de suavização do modelo (Dimensão Base  $k$ ) foram avaliados por meio dos valores de  $p$ , calculados com base nos graus de liberdade efetivos (*edf*), indicando a contribuição significativa da função de suavização para o modelo quando  $p < 0,05$ . O ajuste do modelo e seus resíduos foram analisados com a função *gam.check*, que avalia padrões residuais e o *k-index* para verificar a adequação dos termos de suavização. Modelos com *k-index* próximo a 1 e valores de  $p$  maiores que 0,05 indicam um ajuste

equilibrado em termos de suavidade e complexidade. A comparação múltipla, somente dentro do tratamento entre as diferentes ordens de coleta, foi realizada utilizando o pacote *emmeans*, com ajuste de *sidak* e nível de confiança de 95%.

Optou-se pelo GAM por ser uma extensão dos Modelos Lineares Generalizados (GLM), projetados para capturar relações não lineares entre variáveis preditoras e a variável resposta. Neste modelo, a relação entre as variáveis independentes e dependentes é expressa como uma soma de funções suaves (*splines*), proporcionando maior flexibilidade na modelagem, sem a necessidade de assumir um formato específico para a curva. Foi utilizada a família de distribuição *Gaussiana*, devido à natureza contínua dos metabólitos, a variável dependente. Os dias de coleta, variáveis independentes, entraram no modelo como uma variável discreta, relacionada à ordem de coleta, como primeira coleta, segunda coleta e assim por diante (Wood *et al.*, 2002).

Para lidar com medições repetidas nos mesmos animais em momentos diferentes, modelos de efeitos aleatórios foram ajustados. Uma variável de identificação do animal (ID) foi criada e incorporada como um efeito aleatório, permitindo capturar variações individuais entre os animais.

Dentro de cada tratamento, o perfil metabólico de cada analito foi submetido a análise não paramétrica e as médias foram comparadas usando o teste de *Tukey* com nível de significância 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

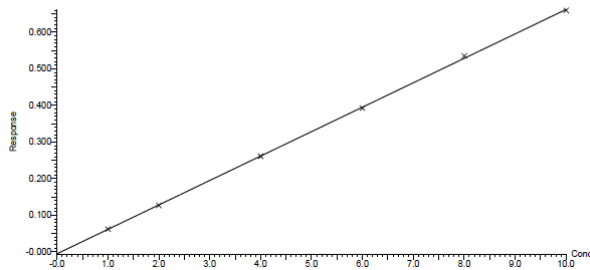
### 5.1. Curvas de calibração para a pesquisa de lactonas do ácido resorcílico

As curvas de calibração, o coeficiente de correlação ( $r$ ) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das análises de matriz branca fortificada com os padrões de ZEA,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol, obtidas na avaliação da linearidade, estão representadas na Figura 9. De acordo com os resultados observados, pôde-se concluir que o modelo foi adequado, pois o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi superior a 0,97, indicando um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani *et al.*, 2004).

**Figura 9.** Curvas de regressão da ZEA (A),  $\alpha$ -ZEL (B),  $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E), adicionados às amostras brancas de urina de bovinos

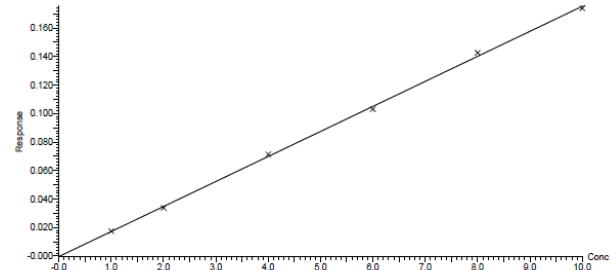
### ZEA (A)

Compound name: ZEARELENONA  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999933$ ,  $r^2 = 0.999867$   
 Calibration curve:  $0.0667413 * x + -0.00536306$   
 Response type: Internal Std ( Ref 17 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



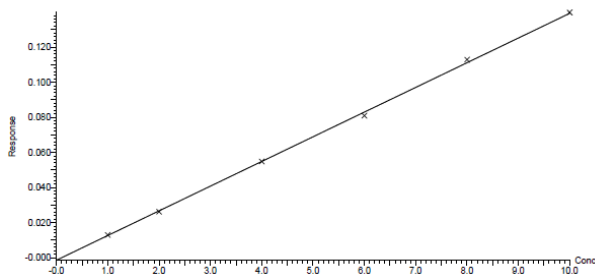
### $\alpha$ -ZEL (B)

Compound name: ALFA-ZEARELENOL  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999701$ ,  $r^2 = 0.999401$   
 Calibration curve:  $0.0175627 * x + -0.00034029$   
 Response type: Internal Std ( Ref 17 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



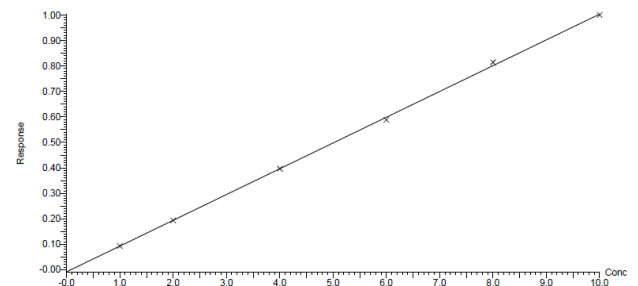
### $\beta$ -ZEL (C)

Compound name: BETA-ZEARELENOL  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999761$ ,  $r^2 = 0.999521$   
 Calibration curve:  $0.0140647 * x + -0.00141368$   
 Response type: Internal Std ( Ref 17 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



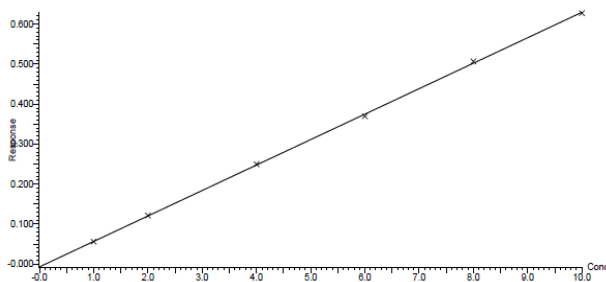
### Zeranol (D)

Compound name: ZERANOL  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999860$ ,  $r^2 = 0.999720$   
 Calibration curve:  $0.101182 * x + -0.00822272$   
 Response type: Internal Std ( Ref 17 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



### Taleranol (E)

Compound name: TALERANOL  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999914$ ,  $r^2 = 0.999829$   
 Calibration curve:  $0.0636497 * x + -0.00685247$   
 Response type: Internal Std ( Ref 17 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

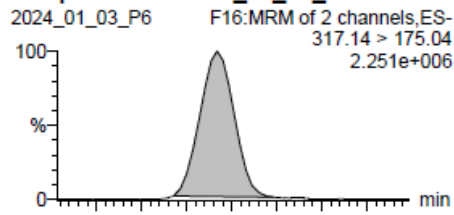


Os cromatogramas do controle positivo 100 % x LMT (CC 100) para os analitos pesquisados, além do padrão interno estão ilustrados na Figura 10.

**Figura 10.** Cromatogramas dos analitos (padrões) ZEA (A),  $\alpha$ -ZEL (B),  $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E), recuperados no controle positivo 100% x LMT (CC 100) e do padrão interno Estradiol D4 (F)

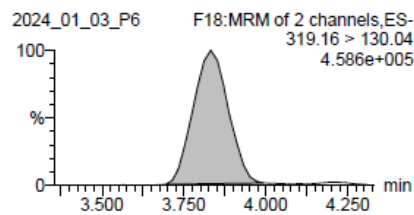
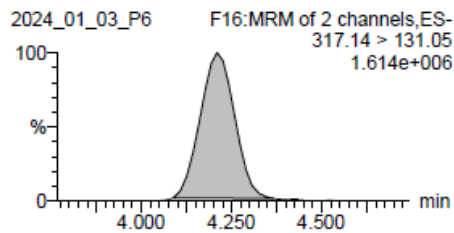
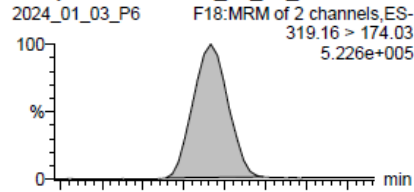
### ZEA (A)

Sample Name: 2024\_01\_03\_P6



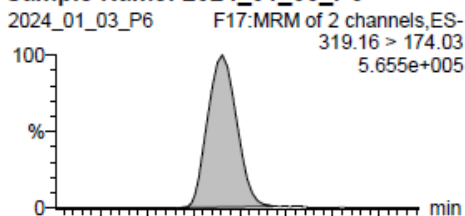
### $\alpha$ -ZEL (B)

Sample Name: 2024\_01\_03\_P6



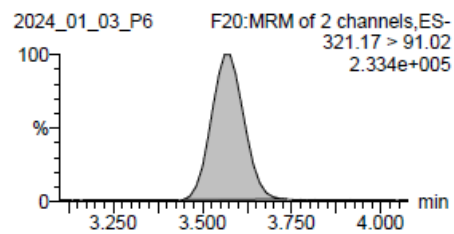
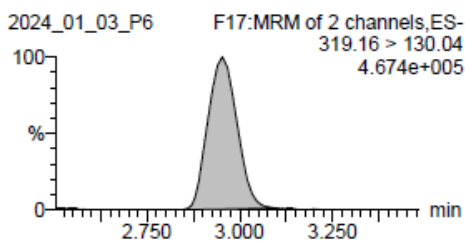
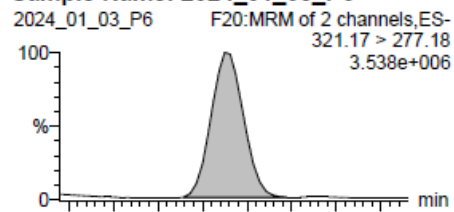
### $\beta$ -ZEL (C)

Sample Name: 2024\_01\_03\_P6



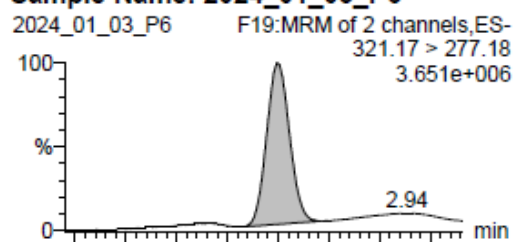
### Zeranol (D)

Sample Name: 2024\_01\_03\_P6

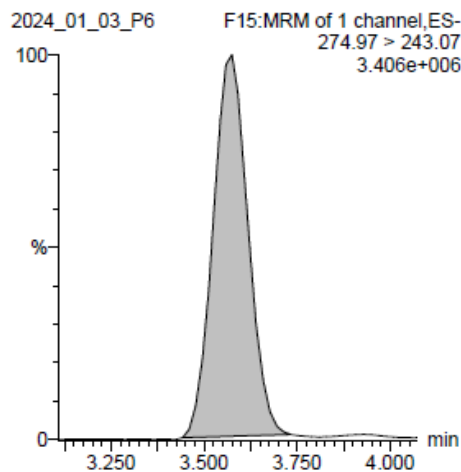
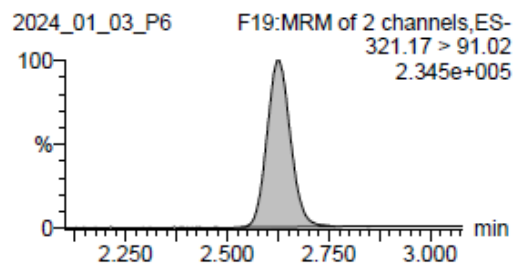


### Taleranol (E)

Sample Name: 2024\_01\_03\_P6



### Padrão Interno – ESTRADIOL – D4 (F)



## **5.2. Pesquisa de lactonas do ácido resorcílico em urina de bovinos**

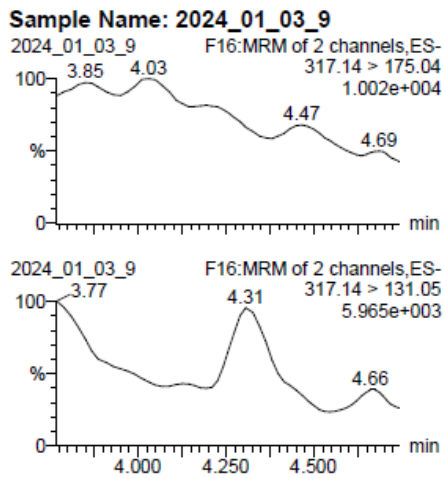
Os resultados encontrados não apresentaram diferença estatística entre os animais fêmeas e machos em todos os três tratamentos, demonstrando que, dentro das condições experimentais, o perfil metabólico da micotoxina ZEA e do implante de zeranól independe do sexo. Não foram encontrados dados na literatura demonstrando a diferença entre sexo.

### **5.2.1. Grupo controle**

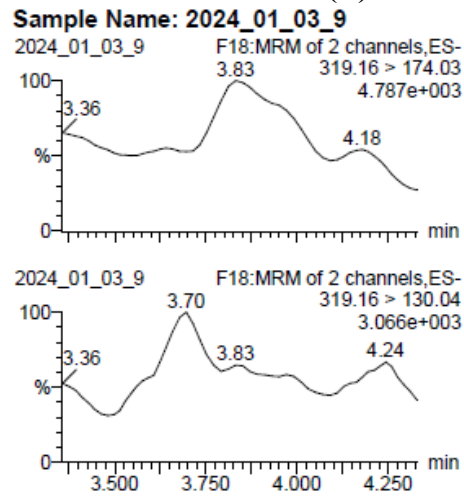
Os resultados das análises da pesquisa de ZEA, zeranól e seus metabólitos na urina de bovinos demonstraram que, nas amostras do grupo controle (dia zero de cada tratamento), não foram detectados os analitos pesquisados, confirmando que não houve contaminação por ZEA no farelo de milho previamente pesquisado, bem como na silagem de milho fornecida como volumoso durante a fase de adaptação dos animais. Os resultados das análises das amostras do grupo controle estão ilustrados na Figura 11. A partir das análises dos cromatogramas gerados não foram detectados picos cromatográficos nos tempos de retenção correspondentes às duas transições monitoradas. O método de LC-MS/MS validado foi considerado um método confirmatório para a pesquisa de ZEA, zeranól e seus metabólitos, por avaliar, além do tempo de retenção dos analitos de interesse, a relação massa carga de fragmentos específicos das substâncias a serem analisadas. Para que a amostra seja considerada positiva, devem ser detectadas pelo menos duas transições do analito de interesse, o que não foi observado nos cromatogramas avaliados.

**Figura 11.** Cromatogramas da pesquisa de ZEA (A),  $\alpha$ -ZEL (B),  $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E) em amostra de urina de bovinos do grupo controle (dia zero)

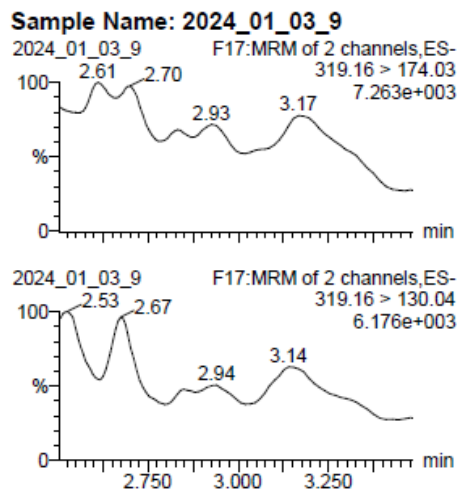
### ZEA (A)



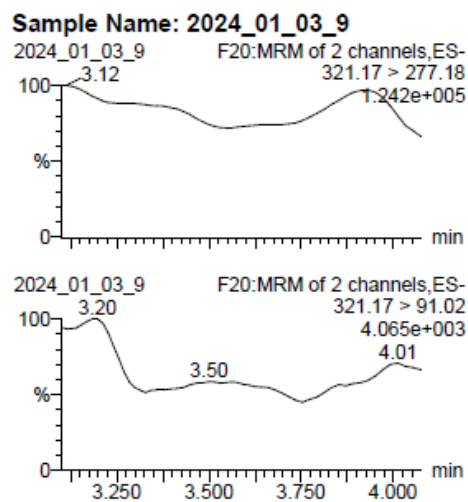
### $\alpha$ -ZEL (B)



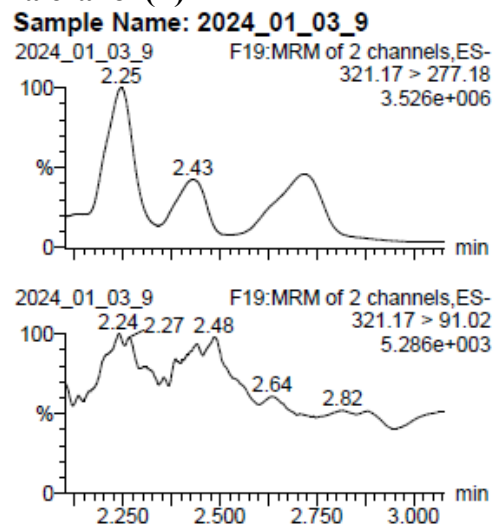
### $\beta$ -ZEL (C)



### Zeranol (D)



### Taleranol (E)



### 5.2.2. Dieta contaminada com zearalenona

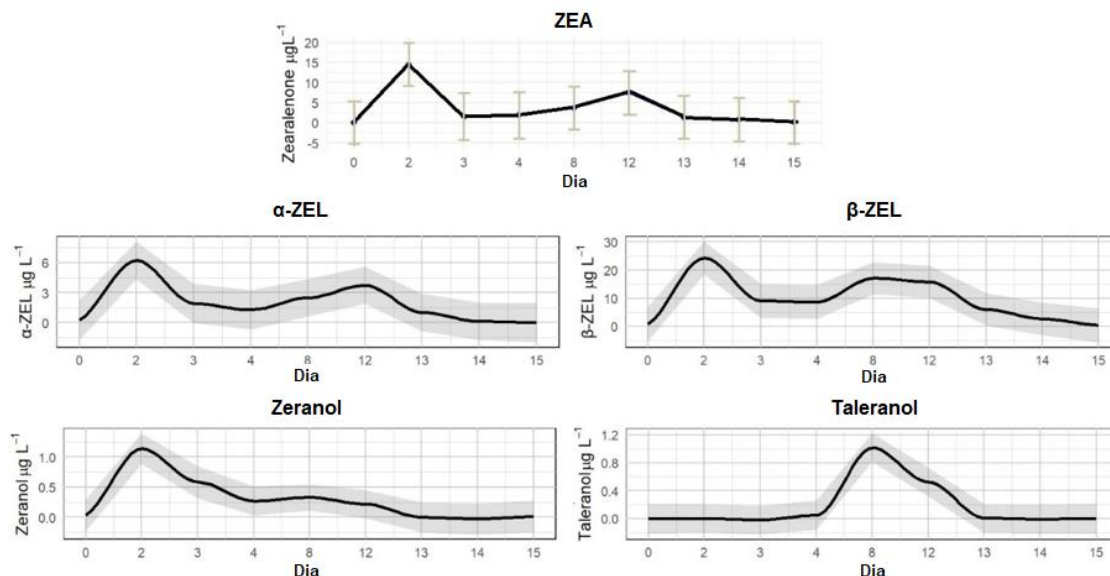
Todos os analitos pesquisados foram detectados e quantificados na urina dos animais que receberam dieta contaminada com ZEA por 12 dias, conforme demonstrado na Tabela 3. Os picos com as maiores concentrações de ZEA ( $14,45 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ),  $\alpha$ -ZEL ( $6,24 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e  $\beta$ -ZEL ( $24,37 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) foram observados no 2º dia experimental ( $P < 0,05$ ), o que demonstra o rápido metabolismo e excreção de ZEA pelo organismo animal. No terceiro dia, os níveis destes metabólitos diminuíram; porém, voltaram a apresentar aumentos estatísticos, sendo o  $\beta$ -ZEL ( $17,14 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) no 8º dia e ZEA ( $7,40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -ZEL ( $3,74 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) no 12º dia. Zeranol e taleranol foram quantificados; porém, em níveis inferiores aos dos demais metabólitos da ZEA, atingindo picos maiores no segundo dia ( $1,08 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) após o início da ingestão de milho contaminado, no caso do zeranol, e no 8º dia ( $1,01 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), no caso do taleranol ( $P < 0,05$ ), demonstrando que  $\alpha$ -ZEL foi mais rapidamente convertido em zeranol do que  $\beta$ -ZEL em taleranol, que só foi quantificado entre o 8º e 12º dia. No 15º dia, a presença de  $\alpha$ -ZEL não foi mais detectada, enquanto  $\beta$ -ZEL e ZEA estavam presentes em quantidades traço em apenas algumas amostras. No 13º dia, ou seja, no 1º dia após a retirada da dieta contaminada com o milho, a presença de zeranol e taleranol não foi mais detectada na urina dos bovinos. As curvas com as concentrações resíduos de cada analito durante os 15 dias experimentais para os animais que receberam a dieta contaminada com ZEA encontram-se na Figura 12.

**Tabela 3.** Concentrações de resíduos de ZEA,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol na urina de bovinos alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de  $2.100 \pm 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$  por dia durante 12 dias

Dia	ZEA	$\alpha$ -ZEL	$\beta$ -ZEL	Zeranol	Taleranol
0	ND	ND	ND	ND	ND
2	14.45 <sup>a</sup>	6.24 <sup>a</sup>	24.37 <sup>a</sup>	1.08 <sup>a</sup>	ND
3	1.54 <sup>b</sup>	1.92 <sup>b</sup>	9.10 <sup>bcd</sup>	0.65 <sup>ab</sup>	ND
4	1.81 <sup>b</sup>	1.28 <sup>b</sup>	8.63 <sup>bcd</sup>	0.26 <sup>bc</sup>	ND
8	3.63 <sup>ab</sup>	2.49 <sup>ab</sup>	17.14 <sup>ab</sup>	0.32 <sup>bc</sup>	1.01 <sup>a</sup>
12	7.40 <sup>ab</sup>	3.74 <sup>ab</sup>	15.80 <sup>abc</sup>	0.19 <sup>bc</sup>	0.52 <sup>b</sup>
13	1.34 <sup>b</sup>	1.02 <sup>b</sup>	6.04 <sup>bcd</sup>	ND	ND
14	0.68 <sup>b</sup>	0.13 <sup>b</sup>	2.71 <sup>cd</sup>	ND	ND
15	0.07 <sup>b</sup>	ND	0.34 <sup>d</sup>	ND	ND

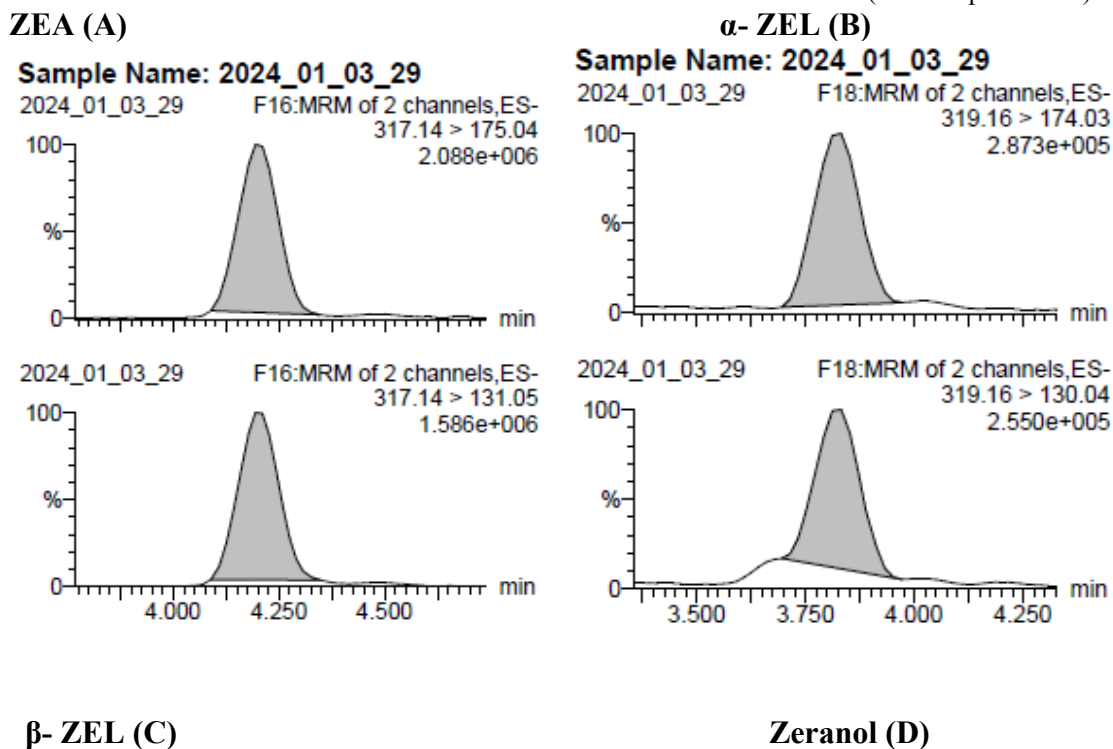
\* Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas são diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).  
ND: Não Detectado

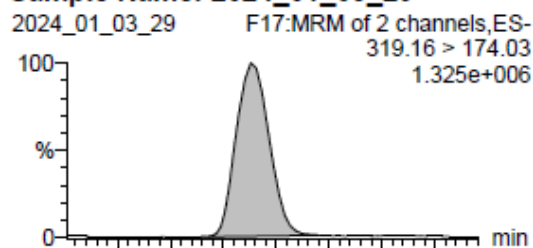
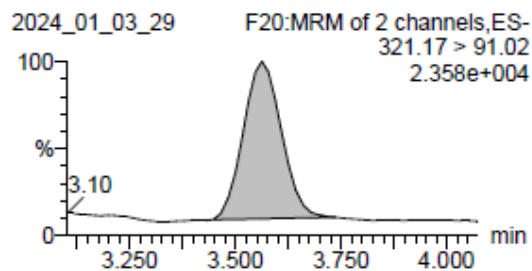
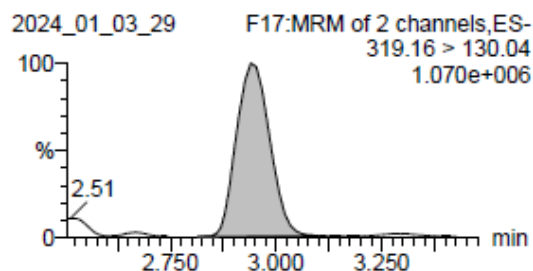
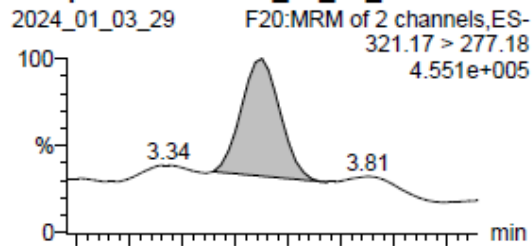
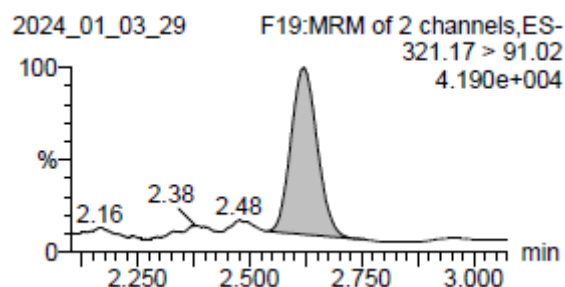
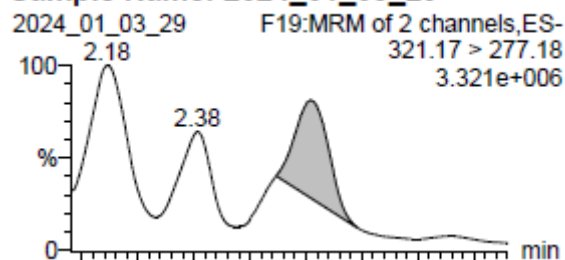
**Figura 12.** Concentrações de resíduos de ZEA,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranól e taleranol na urina de bovinos alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de  $2.100 \pm 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$  por dia durante 12 dias. \*A área cinza escura ao redor da linha preta representa o intervalo de confiança



A Figura 13 exemplifica o resultado da análise de uma amostra de urina do grupo de bovinos tratados com 500g de farelo de milho contaminado com  $2.100 \pm 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de ZEA, coletada no 2º dia do experimento. Nela, foram observados picos cromatográficos com alta intensidade de sinal para os analitos ZEA e seus metabólitos.

**Figura 13.** Cromatogramas da pesquisa de ZEA (A),  $\alpha$ -ZEL (B),  $\beta$ -ZEL (C), zeranól (D) e taleranol (E) em amostra de urina de bovinos alimentados com milho contaminado com ZEA (2º dia experimental)



**Sample Name: 2024\_01\_03\_29****Sample Name: 2024\_01\_03\_29****Taleranol (F)****Sample Name: 2024\_01\_03\_29**

Durante todo o período experimental, observou-se que os valores numéricos de  $\alpha$ -ZEL foram menores que os valores de  $\beta$ -ZEL. Estes dados concordam com Fink-Gremmels (2008) e Dänicke *et al.* (2014), que indicam que, nos bovinos, ao final de todo o processo de biotransformação hepático, a ZEA é predominantemente convertida em  $\beta$ -ZEL, mais que  $\alpha$ -ZEL, o que confere aos ruminantes maior resistência aos efeitos deletérios da ZEA quando comparados a outros animais de produção, que tem o  $\alpha$ -ZEL como principal metabólito da biotransformação da ZEA. A principal atividade biológica da ZEA no organismo animal, imediatamente após sua ingestão e metabolização, principalmente em  $\alpha$ -ZEL, é sua estrogenicidade, ou seja, a capacidade de atuar de forma similar ao hormônio sexual esteroidal endógeno 17- $\beta$ -estradiol e se ligar

competitivamente aos receptores de estrogênio, resultando em efeitos no sistema reprodutivo (EFSA, 2017).

Poucos são os dados disponíveis publicados na literatura sobre a detecção e quantificação de ZEA e seus metabólitos na urina de animais de produção alimentados com esta micotoxina e/ou implantados com o promotor de crescimento zeranol. Kleinova *et al.* (2002) alimentaram bovinos com aveia contaminada com 2.740  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de ZEA por 84 dias consecutivos. Eles analisaram a urina dos animais e encontraram, predominantemente,  $\beta$ -ZEL (20 a 65  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), seguido por ZEA (5 a 8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -ZEL (3 a 5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Também foram encontrados e quantificados nesta pesquisa zeranol (2 a 3  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e taleranol (2 a 3  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

Salvat *et al.* (2015) alimentaram bovinos com 1.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de ZEA por dia do 1º ao 5º dia, e depois 2.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de ZEA por dia do 6º ao 16º dia e quantificaram maiores concentrações de  $\beta$ -ZEL (36,30  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), seguido de ZEA (15,28  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -ZEL (5,39  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), enquanto zeranol e taleranol foram detectados em concentrações de 2,41 e 0,19  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente, na urina.

### 5.2.3. Implante de zeranol e dieta livre de zearalenona

Nos animais que receberam implantes de zeranol e dieta livre de ZEA, os resultados obtidos (Tabela 4) demonstram que os níveis de zeranol aumentaram rapidamente a partir do 2º dia e atingiram um pico, com concentrações máximas de 27,24  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , no 14º dia ( $P < 0,05$ ). Após esse período, observou-se uma diminuição gradual nos níveis de zeranol até o último dia do experimento (dia 110), quando ainda foi encontrado em baixa concentração (1,42  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Para o taleranol, o mesmo padrão foi observado; porém, as maiores concentrações foram observadas no 3º dia, quando atingiu um pico de 31,40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ), e no 12º dia, quando atingiu novo pico de 31,40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  novamente ( $P < 0,05$ ), e começaram a diminuir, mas ainda foram quantificadas até o último dia do experimento (2,39  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Os níveis dos metabólitos zeranol e taleranol, que apresentaram padrões semelhantes ao longo do período de estudo, revelaram que há uma liberação inconstante de zeranol dos pellets e demonstraram a ocorrência de oxidação do zeranol para ZAE e posterior redução para taleranol. As curvas com as concentrações de resíduos para cada analito durante os 110 dias experimentais dos animais que receberam implantes de zeranol e dieta livre de ZEA encontram-se na Figura 14.

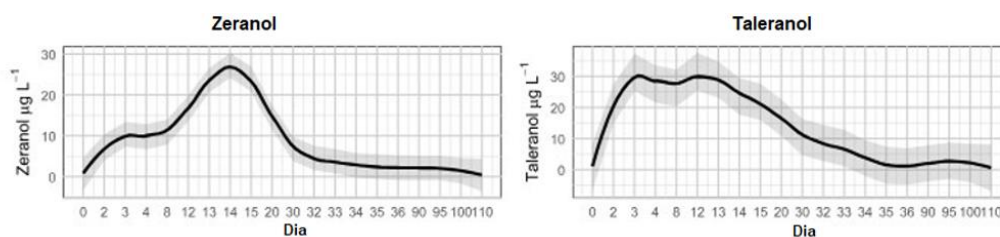
**Tabela 4.** Concentrações de ZEA,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol na urina de bovinos que receberam implante de zeranol na concentração de 36.000  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  por um período de 110 dias e dieta livre de ZEA

Dia	ZEA	$\alpha$ -ZEL	$\beta$ -ZEL	Zeranol	Taleranol
0	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	7.13 <sup>defgh</sup>	21.35 <sup>abc</sup>
3	ND	ND	ND	10.35 <sup>cdef</sup>	31.40 <sup>a</sup>
4	ND	ND	ND	9.80 <sup>cdefg</sup>	27.45 <sup>a</sup>
8	ND	ND	ND	10.86 <sup>cde</sup>	26.26 <sup>a</sup>
12	ND	ND	ND	16.66 <sup>bc</sup>	31.40 <sup>a</sup>
13	ND	ND	ND	23.60 <sup>ab</sup>	29.00 <sup>a</sup>
14	ND	ND	ND	27.24 <sup>a</sup>	23.56 <sup>ab</sup>
15	ND	ND	ND	23.90 <sup>ab</sup>	21.83 <sup>abc</sup>
20	ND	ND	ND	14.43 <sup>cd</sup>	16.78 <sup>abcd</sup>
30	ND	ND	ND	6.80 <sup>efgh</sup>	10.50 <sup>bcde</sup>
45	ND	ND	ND	4.61 <sup>efgh</sup>	8.56 <sup>bcde</sup>
60	ND	ND	ND	3.77 <sup>efgh</sup>	6.97 <sup>cde</sup>
75	ND	ND	ND	2.74 <sup>efgh</sup>	3.73 <sup>de</sup>
85	ND	ND	ND	2.43 <sup>gh</sup>	1.45 <sup>de</sup>
90	ND	ND	ND	2.15 <sup>gh</sup>	1.04 <sup>de</sup>
95	ND	ND	ND	2.08 <sup>gh</sup>	2.02 <sup>de</sup>
100	ND	ND	ND	2.11 <sup>gh</sup>	2.99 <sup>de</sup>
110	ND	ND	ND	1.42 <sup>h</sup>	2.39 <sup>de</sup>

\* Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas são diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

ND: Não Detectado

**Figura 14.** Concentrações de zeranol e taleranol na urina de bovinos que receberam implantes de zeranol usado como promotor de crescimento na concentração de 36.000  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de zeranol por um período de 110 dias e dieta livre de ZEA. \*A área cinza escura ao redor da linha preta representa o intervalo de confiança

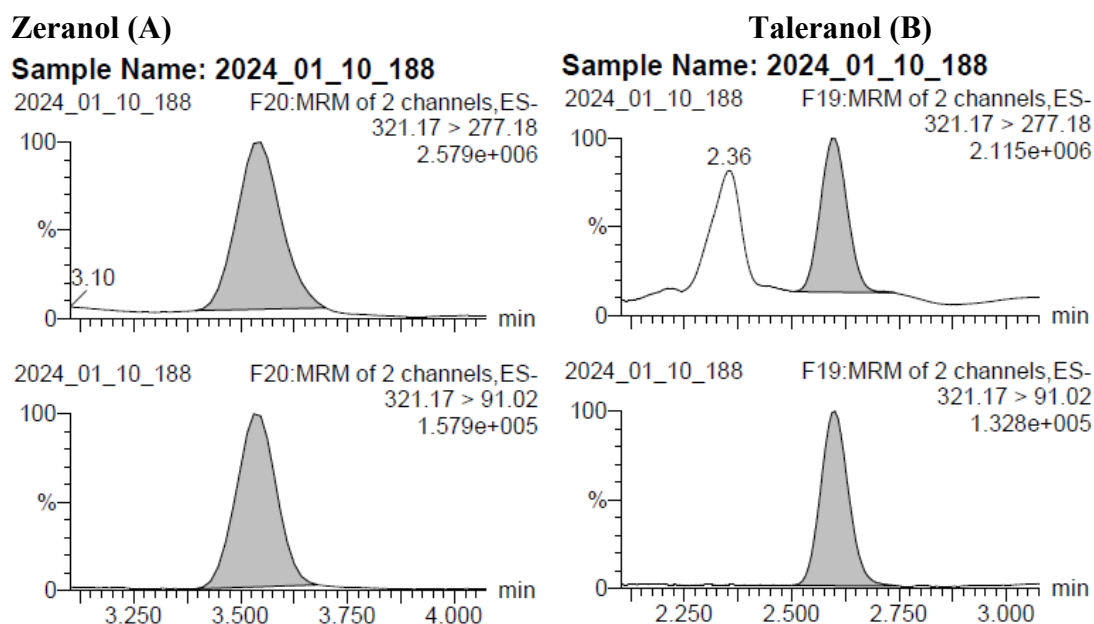


Neste tratamento, não foi observada a presença de ZEA e dos seus metabólitos  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL na urina dos animais durante todo o período experimental, o que demonstrou que não houve contaminação da dieta. A ausência destes três analitos na pesquisa está de acordo com Kleinova *et al.* (2002), que indica como resultado do metabolismo do zeranól a interconversão entre zeranól, ZAE e taleranol. Porém, o método analítico validado utilizado na pesquisa de ZEA, zeranól e seus metabólitos não contempla a pesquisa de ZAE, que, provavelmente, estaria presente nas amostras.

Salvat *et al.* (2015) analisaram a urina de bovinos que receberam implantes de zeranól e também observaram um aumento progressivo de zeranól e taleranol do dia 1 ao dia 7, com pico de excreção no dia 10. Após isso foi observada uma diminuição de ambos os metabólitos até o final do experimento.

A Figura 15 exemplifica o resultado da análise de uma amostra de urina do grupo de bovinos que receberam implantes auriculares de zeranól com  $36.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de zeranól, coletada no dia 13 do experimento. Foram observados picos cromatográficos com alta intensidade de sinal para os analitos zeranól e taleranol.

**Figura 15.** Cromatogramas da pesquisa de zeranól (A) e taleranol (B) em amostra de urina de bovinos que receberam implante de zeranól e dieta livre de ZEA (14º dia experimental)



#### 5.2.4. Implante de zeranól e dieta contaminada com zearalenona

Semelhantemente aos tratamentos anteriores, no grupo de bovinos que foram implantados com zeranól e alimentados com milho contaminado com ZEA durante 12 dias, todos analitos pesquisados foram detectados (Tabela 5). Os picos com as maiores

concentrações de ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL foram observados no 4º dia, com as maiores concentrações médias de 2,60  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , 1,92  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 13,70  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente ( $P<0,05$ ). Após esse período, os níveis de ZEA e seus metabólitos na urina dos animais diminuiram até não serem mais detectados no 20º dia do experimento. Para o zeranól, dois picos ( $P<0,05$ ) foram observados 2º dia (10,33  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e no 14º dia (15,07  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Para o taleranol, as maiores concentrações ( $P<0,05$ ) foram observadas 2º dia (26,37  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), 3º dia (22,63  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e 14º dia (16,32  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) do experimento.

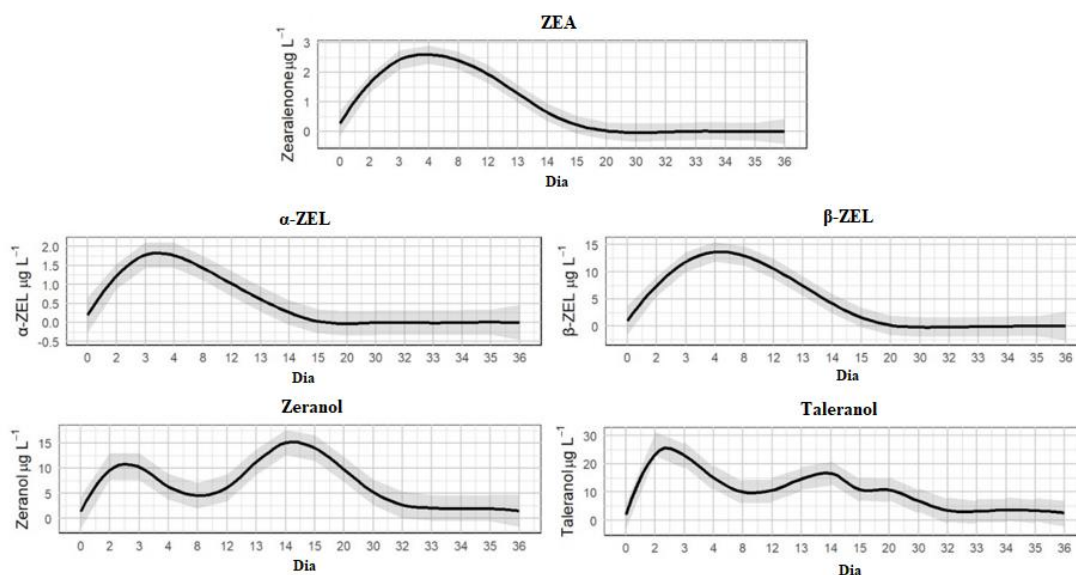
**Tabela 5.** Concentrações de ZEA,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranól e taleranol na urina de bovinos que receberam implante de zeranól na concentração de 36.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e foram alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de 2.100  $\pm$  200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  por dia do 1º ao 12º dia do experimento

Dia	ZEA	$\alpha$ -ZEL	$\beta$ -ZEL	Zeranól	Taleranol
0	ND	ND	ND	ND	ND
2	1.60 <sup>cde</sup>	1.38 <sup>bc</sup>	7.32 <sup>def</sup>	10.33 <sup>abc</sup>	26.37 <sup>a</sup>
3	2.40 <sup>ab</sup>	1.92 <sup>ab</sup>	11.88 <sup>abc</sup>	10.20 <sup>abc</sup>	22.63 <sup>ab</sup>
4	2.60 <sup>ab</sup>	1.92 <sup>ab</sup>	13.70 <sup>ab</sup>	6.26 <sup>bcd</sup>	14.60 <sup>bc</sup>
8	2.40 <sup>ab</sup>	1.60 <sup>ab</sup>	12.93 <sup>ab</sup>	4.52 <sup>cd</sup>	9.60 <sup>cd</sup>
12	1.93 <sup>bcd</sup>	1.20 <sup>abcd</sup>	10.56 <sup>bcd</sup>	6.09 <sup>bcd</sup>	10.26 <sup>cd</sup>
13	1.30 <sup>e</sup>	0.80 <sup>cde</sup>	7.40 <sup>cde</sup>	11.16 <sup>ab</sup>	14.23 <sup>bc</sup>
14	0.64 <sup>f</sup>	0.42 <sup>e</sup>	4.17 <sup>fg</sup>	15.07 <sup>a</sup>	16.32 <sup>abc</sup>
15	0.21 <sup>f</sup>	ND	1.60 <sup>h</sup>	13.99 <sup>a</sup>	10.40 <sup>cd</sup>
20	ND	ND	ND	9.75 <sup>abc</sup>	10.49 <sup>cd</sup>
30	ND	ND	ND	5.19 <sup>bcd</sup>	6.50 <sup>cd</sup>

\* Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas são diferentes pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ).  
ND: Não Detectado

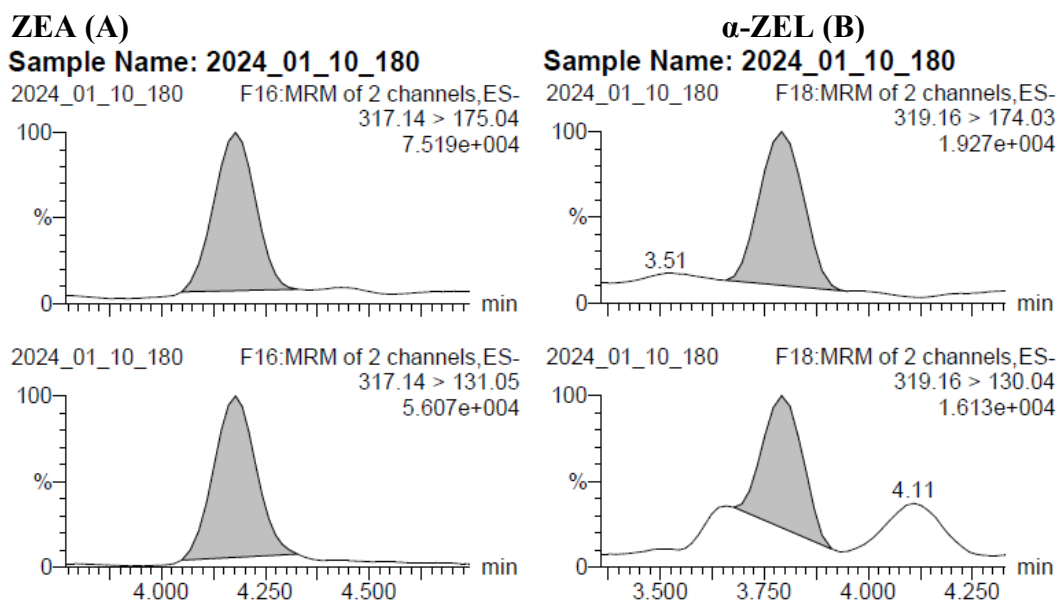
A Figura 16 apresenta as curvas com as concentrações de resíduos de ZEA, zeranól e seus metabólitos para cada analito durante os 30 dias experimentais dos animais que receberam implantes de zeranól e dieta contaminada com ZEA.

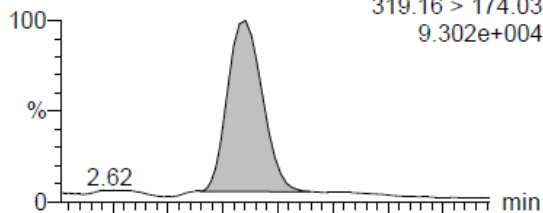
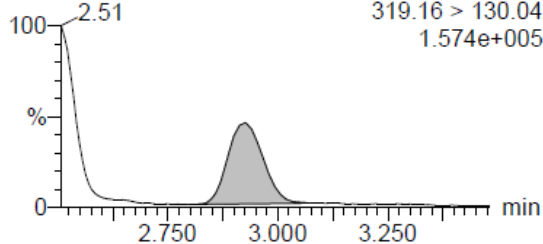
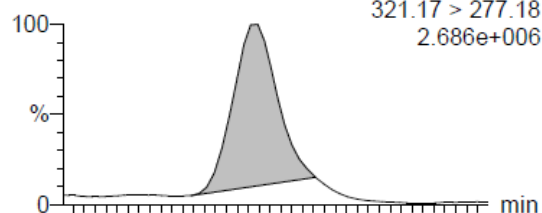
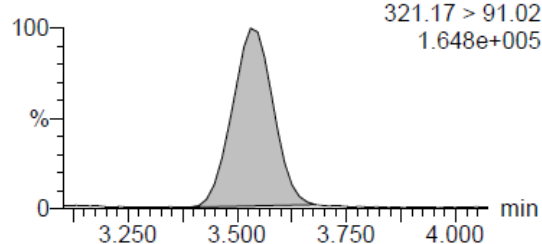
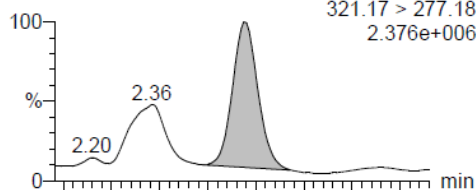
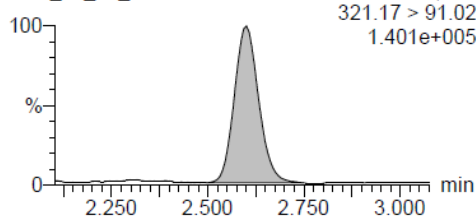
**Figura 16.** Concentrações de ZEA,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, zeranol e taleranol na urina de bovinos que receberam implante de zeranol na concentração de  $36.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e foram alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de  $2.100 + 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$  do 1º ao 12º dia do experimento. \*A área cinza escura ao redor da linha preta representa o intervalo de confiança



A Figura 17 exemplifica o resultado da análise de uma amostra de urina do grupo de bovinos tratados com farelo de milho contaminado com ZEA e que receberam implantes auriculares de zeranol. Foram observados, no 13º dia do experimento, picos cromatográficos com alta intensidade de sinal para os analitos ZEA e seus metabólitos.

**Figura 17.** Cromatogramas da pesquisa de ZEA (A),  $\alpha$ -ZEL (B),  $\beta$ -ZEL (C), zeranol (D) e taleranol (E) em amostra de urina de bovinos que receberam implante de zeranol e dieta contaminada com ZEA (13º dia experimental)



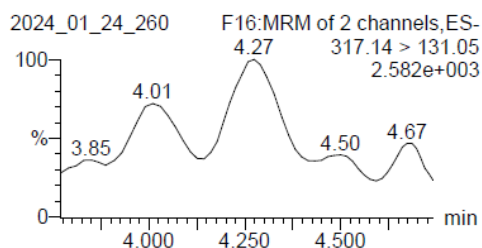
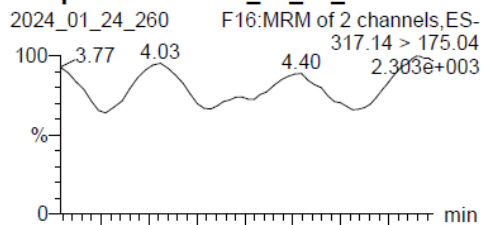
**$\beta$ -ZEL (C)****Sample Name: 2024\_01\_10\_180**2024\_01\_10\_180 F17:MRM of 2 channels,ES-  
319.16 > 174.03  
9.302e+0042024\_01\_10\_180 F17:MRM of 2 channels,ES-  
319.16 > 130.04  
1.574e+005**Zeranol (D)****Sample Name: 2024\_01\_10\_180**2024\_01\_10\_180 F20:MRM of 2 channels,ES-  
321.17 > 277.18  
2.686e+0062024\_01\_10\_180 F20:MRM of 2 channels,ES-  
321.17 > 91.02  
1.648e+005**Taleranol (E)****Sample Name: 2024\_01\_10\_180**2024\_01\_10\_180 F19:MRM of 2 channels,ES-  
321.17 > 277.18  
2.376e+0062024\_01\_10\_180 F19:MRM of 2 channels,ES-  
321.17 > 91.02  
1.401e+005

A Figura 18 exemplifica o resultado da análise de uma amostra de urina do mesmo grupo de bovinos; porém, no 30º dia do experimento. Neste dia foram observados picos cromatográficos com alta intensidade de sinal para os analitos zeranol e taleranol, mas ausência total de picos para os analitos ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL.

**Figura 18.** Cromatogramas da pesquisa de ZEA (A),  $\alpha$ -ZEL (B),  $\beta$ -ZEL (C), zeranól (D) e taleranol (E) em amostra de urina de bovinos que receberam implante de zeranól e dieta contaminada com ZEA (30º dia experimental)

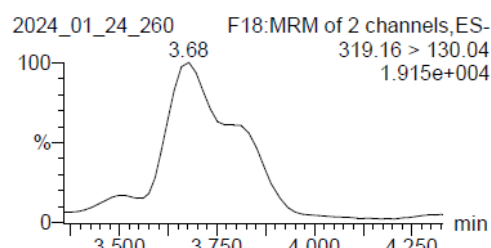
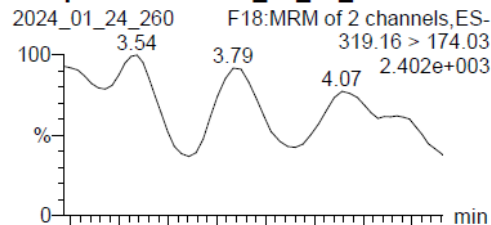
### ZEA (A)

Sample Name: 2024\_01\_24\_260



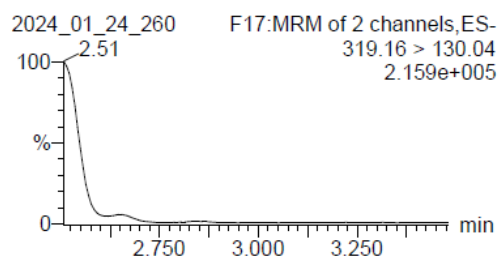
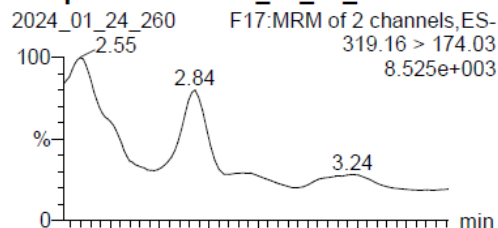
### $\alpha$ -ZEL (B)

Sample Name: 2024\_01\_24\_260



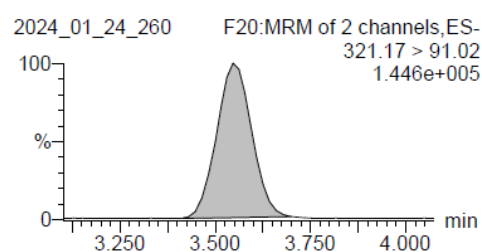
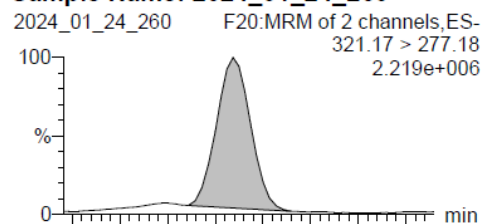
### $\beta$ -ZEL (C)

Sample Name: 2024\_01\_24\_260



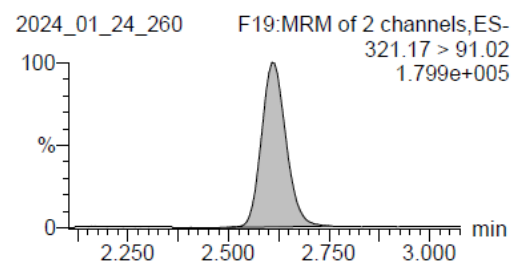
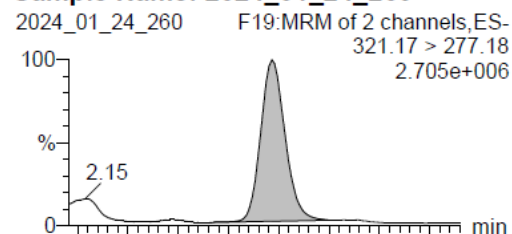
### Zeranól (D)

Sample Name: 2024\_01\_24\_260



### Taleranol (E)

Sample Name: 2024\_01\_24\_260

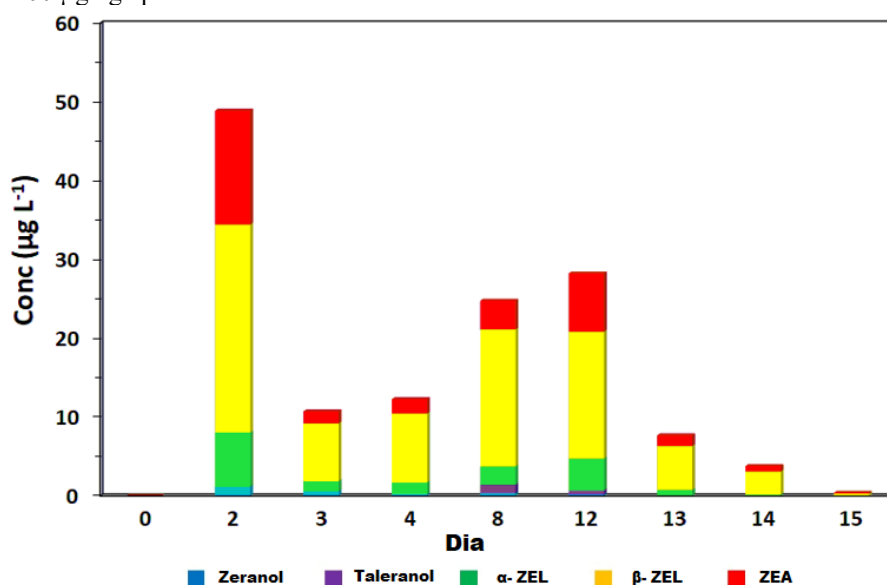


### 5.3. Discriminação entre abuso de zeranol ou contaminação por ZEA

A discriminação entre o uso ilegal de zeranol e o consumo de ração contaminada com a micotoxina ZEA foi baseada na comparação da soma das concentrações de zeranol e taleranol com a soma de ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL, visto que as diferenças nas quantificações de zeranol e taleranol *versus* ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL permitem diferenciar uma contaminação natural de abuso intencional (Blokland *et al.*, 2006).

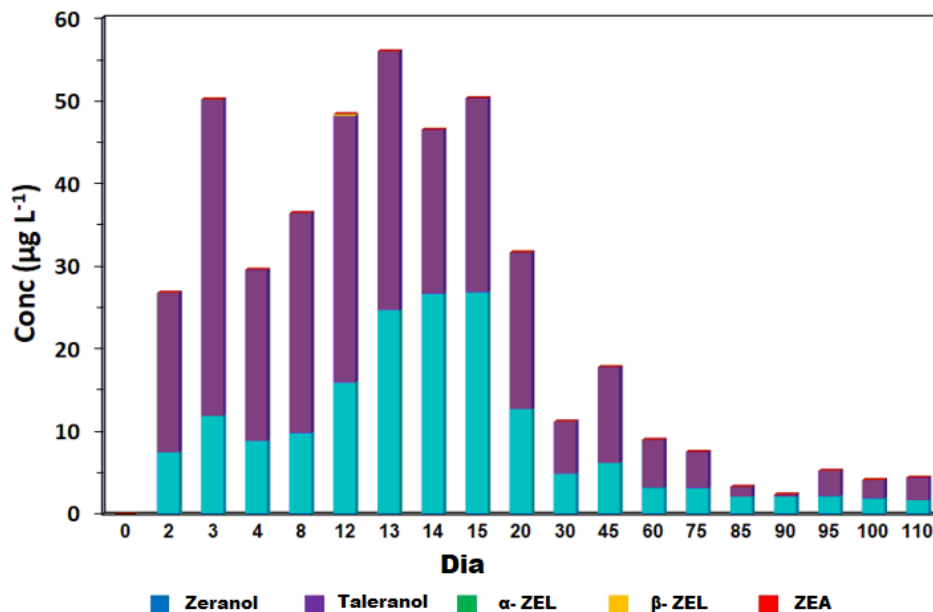
No presente estudo, nenhuma amostra de urina de animais que foram alimentados somente com milho contaminado com ZEA foi classificada como abuso segundo a equação da EURL. Após o início desse tratamento, desde o 1º dia de coleta (dia 2), os níveis de ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL estavam acima dos níveis de zeranol e taleranol, conforme demonstra a figura 19.

**Figura 19.** Perfil de zeranol, taleranol,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL e ZEA determinados pela análise por LC-MS/MS das amostras de urina coletadas de bovinos alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de  $2.100 + 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$  por dia durante 12 dias



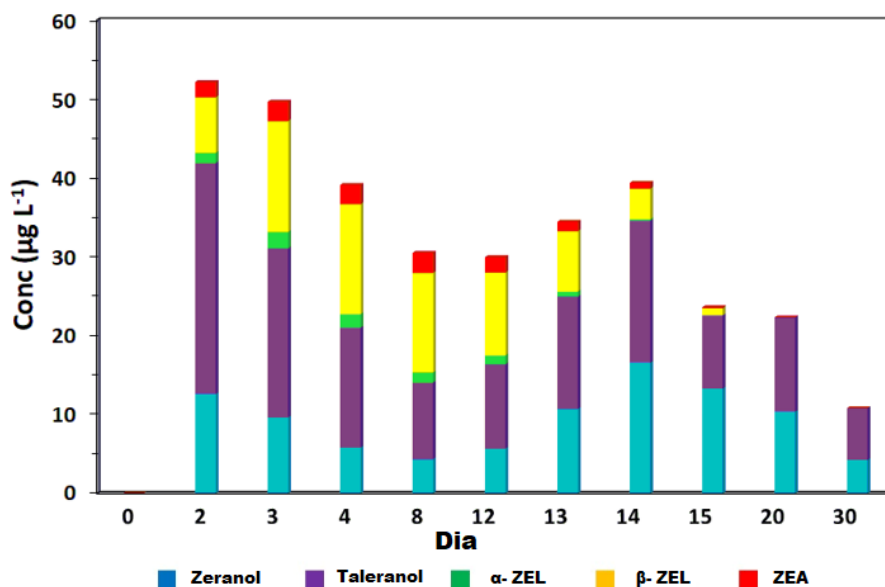
No grupo de animais que receberam o implante de zeranol e dieta livre da micotoxina ZEA, as amostras foram classificadas como abuso do 1º dia de coleta (dia 2), após a colocação dos implantes, até o último dia avaliado. Neste tratamento, a presença de ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL não foram observadas em nenhuma amostra analisada, conforme demonstra a figura 20.

**Figura 20.** Perfil de zeranol, taleranol,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZAL e ZEA determinados pela análise por LC-MS/MS das amostras coletadas de urina de bovinos que receberam implantes de zeranol na concentração de 36.000  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  por um período de 110 dias



As amostras de urina de animais que receberam o implante e foram alimentados com milho contaminado com a ZEA também foram classificadas como abuso de promotor de crescimento. Embora essas amostras tenham apresentado altos níveis de ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL, os níveis de zeranol e taleranol foram maiores, conforme demonstra a figura 21. Quando a soma logarítmica de zeranol e taleranol é maior que a soma logarítmica de ZEA,  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL, as amostras são classificadas como abuso.

**Figura 21.** Perfil de zeranol, taleranol,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZAL e ZEA determinados pela análise por LC-MS/MS das amostras de urina coletadas de bovinos que receberam implantes de zeranol na concentração de 36.000  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  e foram alimentados com milho contaminado com ZEA na concentração de 2.100 + 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  do 1º ao 12º dia do experimento



Tejja & Mavromati (2024) usaram a equação do EURL em amostras de urina de ovelhas, cabras e suínos para distinguir o uso ilegal de zeranol do consumo de alimentos contaminados com ZEA e concluíram que, de fato, a ração estava contaminada com ZEA e que o modelo foi apropriado para discriminá-lo do uso ilegal de zeranol. Anteriormente, Arrizabalaga-Larrañaga *et al.* (2023) demonstraram que a equação do EURL, já usada quando o uso proibido de zeranol é detectado na urina bovina, também pode ser usada para urina suína.

Embora os resultados deste trabalho sejam com animais em ambiente experimental, a diferença no perfil de RALs tornou possível ter uma hipótese de contaminação com ZEA e/ou administração ilegal com implante de zeranol. O modelo estatístico é apenas uma ferramenta de triagem que pode ajudar laboratórios de controle e autoridades a decidir se uma descoberta não conforme requer uma ação de acompanhamento ou pode estar relacionada à ingestão de ração contaminada com *Fusarium* spp. toxinas. Dessa forma, é possível afirmar que o modelo matemático da UE pode ser usado para avaliar o uso ilegal de zeranol no Brasil.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo detectou aumentos e diminuições marcantes na quantificação dos RALs na urina bovina ao longo do tempo. As condições simuladas de metabólitos que podem surgir no ambiente de produção demonstraram que a equação recomendada pelo EURL permitiu diferenciar o abuso de zeranol da ingestão de milho naturalmente contaminado e concluiu, portanto, que o uso da equação pode ajudar as autoridades competentes a decidir se um resultado de RALs não conforme requer ação de acompanhamento ou pode estar relacionado à ingestão de ração contaminada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Brasil bate recorde nas exportações de carne bovina em 2024.** Disponível em: <https://www.abiec.com.br/brasil-bate-recorde-nas-exportacoes-de-carne-bovina-em-2024/>.

ALEXANDER, N. J. *et al.* The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, Madison, v. 48, p. 54-62, 2011.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ALTOMARE, C.; LOGRIECO, A. F.; GALLO, A. Micotoxinas e fungos micotoxigênicos: risco e gestão. Um desafio para a segurança alimentar global futura. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00032-9>.

ALTOMARE, C. *et al.* Mycotoxins and mycotoxigenic fungi: risk and management. A challenge for future global food safety and security. **Encyclopedia of Mycology**, p. 64-93, 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa – **IN No 160, de 1 de julho de 2022.** Disponível em: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6354042/IN\\_289\\_2024\\_.pdf/ec565fb0-e17e-4e0a-a8c0-a88935fb6cca](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6354042/IN_289_2024_.pdf/ec565fb0-e17e-4e0a-a8c0-a88935fb6cca).

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC no 722, de 1 de julho de 2022. Disponível em: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_722\\_2022\\_.pdf/15cda9ff-74a4-456e-9fd3-6610125adb75](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_722_2022_.pdf/15cda9ff-74a4-456e-9fd3-6610125adb75). Acesso em: 25 ago. 2024.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa - IN no 160, de 1 de julho de 2022. Disponível em: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN\\_160\\_2022\\_.pdf/03a02bb0-7856-4da4-a6f86a1e99d487d9#:~:text=1%C2%BA%20Esta%20Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20estabelece,LMT%20de%20metais%20em%20alimentos.>](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_160_2022_.pdf/03a02bb0-7856-4da4-a6f86a1e99d487d9#:~:text=1%C2%BA%20Esta%20Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20estabelece,LMT%20de%20metais%20em%20alimentos.>) Acesso em: 7 jul.2024.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Instrução Normativa - IN no 160, de 1 de julho de 2022.* Disponível em: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN\\_160\\_2022\\_.pdf/03a02bb0-7856-4da4-a6f86a1e99d487d9#:~:text=1%C2%BA%20Esta%20Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20estabelece,LMT%20de%20metais%20em%20alimentos.](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_160_2022_.pdf/03a02bb0-7856-4da4-a6f86a1e99d487d9#:~:text=1%C2%BA%20Esta%20Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20estabelece,LMT%20de%20metais%20em%20alimentos.) Acesso em: 7 jul. 2024.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction.** Huddersfield: Wiley, 2003.

ARRIZABALAGA-LARRAÑAGA, A. A., LINDERS, R., BLOKLAND, M. H., & STERK, S. **Occurrence of resorcylic acid lactones in porcine urine: discrimination between illegal use and contamination, Food Additives & Contaminants: Part A**, 40(7), 838–851. 2023. <https://doi.org/10.1080/19440049.2023.2222008>

ARRIZABALAGA-LARRAÑAGA, A. A.; LINDERS, R.; BLOKLAND, M. H.; STERK, S. Occurrence of resorcylic acid lactones in porcine urine: discrimination between illegal use and contamination. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 40, n. 7, p. 838-851, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2023.2222008>.

BARBERO, L. M.; CECATO, U.; LUGÃO, S. M. B.; GOMES, J. A. N.; MURAKAMI, J. K.; ABRAHÃO, J. J. S.; SANTOS, A. L. Suplementação animal com resíduo de agroindústria na época das secas. In: **Anais da 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Maringá, 2009. Maringá: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009.

BARRETO, G. G. **Caracterização morfológica de *Fusarium spp.* do feijão fava e controle biológico via sementes-plântulas**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2018.

BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1/2, p. 33-37, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.022>.

BISCOTO, G. L. Micotoxinas na alimentação de bovinos no Brasil: um estudo de 2017 a 2021. 2022. Tese (Doutorado em Ciências Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2022.

BISCOTO, G. L., SALVATO, L. A., ALVARENGA, É. R., DIAS, R. R. S., PINHEIRO, G. R. G., RODRIGUES, M. P., PINTO, P. N., FREITAS, R. P., KELLER, K. M. (2022). Mycotoxins in Cattle Feed and Feed Ingredients in Brazil: A Five-Year Survey. *Toxins*, 14(8). <https://doi.org/103390/TOXINS14080552>

BISCOTO, G. L. *et al.* Mycotoxins in cattle feed and feed ingredients in Brazil: a five-year survey. *Toxins*, v. 14, n. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins14080552>.

BLOKLAND, M. H. *et al.* Determination of resorcylic acid lactones in biological samples by GC–MS: discrimination between illegal use and contamination with *Fusarium* toxins. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 5, p. 1221-1227, 2006. DOI: 10.1007/s00216-005-0274-4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº 42, de 20 de dezembro de 1999**. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC/Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1999. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-42-de-20-de-dezembro-de-1999.pdf/view>.

BRASIL. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed.pdf>. Acesso em 20 ago. 2024.

BRASIL. Portaria nº 55, de 1º de dezembro de 2011. Dispõe sobre a proibição, a importação, a produção, a comercialização e o uso de substâncias naturais ou artificiais com atividade anabolizante. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 dez. 2011. Seção 1, p. 228.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório dos resultados do subprograma de Monitoramento e Subprograma Exploratório do Plano Nacional**

**de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC**. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/pdf-2020-consolidado-pncrc-portugues.pdf>.

BRETAS, A. A. Inclusão de adsorventes de micotoxinas para leitões. **Revista CES Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 1, p. 80-95, 2018.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Edufscar, 2001. 77 p.

CAST. Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: economics and health risks**. Task Force Report, 139. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CUSTÓDIO, L. Identification and control effects of mycotoxins in Nellore bulls finished in feedlot. 2018. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2018.

D'MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, p. 183-205, 1999.

DÄNICKE, S.; KEESE, C.; MEYER, U.; STARKE, A.; KINOSHITA, A.; REHAGE, J. Zearalenone (ZEN) metabolism and residue concentrations in physiological specimens of dairy cows exposed long-term to ZEN-contaminated diets differing in concentrate feed proportions. **Archives of Animal Nutrition**, v. 68, p. 492–506, 2014.

DÄNICKE, S.; SWIECH, E.; BURACZEWSKA, L.; UEBERSCHAR, K. H. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, p. 268-276, 2005.

DI NARDO, F.; BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; SPANO, G.; ANFOSSI, L. Multicolor immunochromatographic strip test based on gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B1 and fumonisins. **Microchimica Acta**, v. 184, p. 1295-1304, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00604-017-2121-7>>. Acesso em: 7 ago. 2024.

DICKSON, L. C. et al. Quantitative screening of stilbenes and zearanol and its related residues and natural precursors in veal liver by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6536-6542, 2009.

DIRETIVA DO CONSELHO 96/22/CEE, de 29 de abril de 1996. Relativa à proibição do uso na criação de gado de certas substâncias com ação hormonal ou tireostática e de  $\beta$ -agonistas, e que revoga as diretivas 81/602/CEE, 88/146/CEE e 88/299/CEE. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, L125, p. 3–9, 1996.

DEAN, J. A.; VAN KAN, Z. A.; PRETORIUS, K. E.; HAMMOND-KOSACK, A.; DI PIETRO, P. D. Top 10 patógenos fúngicos em patologia molecular de plantas. **Patologia Molecular de Plantas**, v. 13, p. 414-430, 2012.

DONG, M. W. **Modern HPLC for Practicing Scientists**. Hoboken: Wiley, 2006.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 471-481, 2003.

DUARTE, K. M. R.; SILVA, F. M. S. M.; MEIRELLES, F. Resíduos de anabolizantes na produção animal: importância e métodos de detecção. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 731-737, ago. 2002.

EFSA CONTAM PANEL. Scientific opinion on risk for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**, v. 15, p. 4851, 2017.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. **EFSA Journal**, v. 12, p. 3916, 2014.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. **Mass spectrometry: instrumentation, interpretation and applications**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. 388 p.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 44, n. 3, p. 210-230, 2009.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization-World Health Organization). Zearalenone. Prepared by the Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). In: **Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Food Additives Series 44**. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2000.

FDA (U.S. Food and Drug). Disponível em: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/product-safety-information/steroid-hormone-implants-used-growth-food-producing-animals>. Acesso em 14 de fev. 2025.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **Veterinary Journal**, v. 176, p. 84-92, 2008.

FINK-GREMMELS, J.; MALEKINEJAD, H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 326-341, 2007.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Anuário da Carne: cadeia produtiva 2023**. 2023. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1160117/1/Anuario-CiCarne-cadeia-produtiva-2023.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2025.

GALLO, A. et al. Revisão sobre problemas de micotoxinas em ruminantes: ocorrência em forragens, efeitos da ingestão de micotoxinas no estado de saúde e desempenho animal e estratégias práticas para neutralizar seus efeitos negativos. **Toxins (Basel)**, 2015.

GROMADZKA, K. et al. Occurrence of estrogenic mycotoxin zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. **Water Research**, v. 43, p. 1051-1059, 2009.

GUERRERA, I. C.; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. **Bioscience Reports**, v. 25, n. 1-2, p. 71-93, 2005.

GRUPTA, R. C. **Veterinary toxicology: basic and clinical principles**. 1. ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 2007.

HOFF, R. Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas. 2008. 134 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3. ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 489 p.

HOSSAIN, M. Z.; MARAGOS, C. M. Gold nanoparticle-enhanced multiplexed imaging surface plasmon resonance (iSPR) detection of *Fusarium* mycotoxins in wheat. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 101, p. 245-252, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.033>. Acesso em: 9 ago. 2024.

KENNEDY, D. G.; HEWITT, S. A.; MCEVOY, J. D. G.; CURRIE, J. W.; CANNAVAN, A.; BLANCHFLOWER, J.; ELLIOT, C. T. O zeranol é formado a partir de *Fusarium* spp. toxinas em bovinos in vivo. **Additives in Food Contaminants**, p. 393-400, 1998.

KESKIN, E.; EYUPOGLU, O. E. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-MS/MS and health risk assessment of the mycotoxins in bee products of Turkey. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134086, 2023.

KLEINOVA, M.; ZOLLNER, P.; KAHLBACHER, H.; HOCHSTEINER, W.; LINDNER, W. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter Zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4769-4776, 2002.

KINANI, S. et al. Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography-mass spectrometry analysis of environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, n. 1-2, p. 307-315, 2008.

KOOTSTRA, P. R. et al. Multi-residue screening of a minimum package of anabolic steroids in urine with GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1-2, p. 82-92, 2007.

KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; MOLINELLI, A.; SULYOK, M.; MACDONALD, S.; CREWS, C. Mycotoxin analysis: an update. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 152-163, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/02652030701765723>. Acesso em: 8 ago. 2024.

- LANÇAS, F. M., A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v.1, p.35-61, 2009.
- LAUNAY, F. M. *et al.* Prevalence of zeranol, taleranol and Fusarium spp. toxins in urine: implications for the control of zeranol abuse in the European Union. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 9, p. 833-839, 2004.
- LIMA, A. L. Pesquisa de resíduos de anticoccidianos por LC-MS/MS em frangos de corte submetidos a tratamento farmacológico. 2016. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- MAIA, K. M. *et al.* Micotoxinas e adsorventes na alimentação animal. **Ciência Animal**, v. 31, n. 4, p. 82–91, 2021.
- MAKINDE, O. A.; SOYELU, O. T.; ADERIBIGBE, A. O. Effect of Zeranol and estradiol-17 $\beta$  on carcass and sensory characteristics of zero-grazed White Fulani bulls. **Nigerian Journal of Animal Production**, v. 47, n. 3, p. 110–115, 2020. <https://doi.org/10.51791/njap.v47i3.143>.
- MALAKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 96-102, 2006.
- MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.
- MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. 1. ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul: Sociedade Vicente Pallotti, 2007.
- MARCZUK, J. *et al.* Zearalenone and deoxynivalenol mycotoxicosis in dairy cattle herds. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 2, p. 365–372, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/V10181-012-0055-X>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- MARIN, D. E. *et al.* Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 6, p. 956–963, 2010.
- MARIN, S. *et al.* Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 60, p. 218–237, 2013.
- MATRASZEK-ZUCHOWSKA, I.; WOZNIAK, B.; ZMUDZKI, J. Determination of zeranol, taleranol, zearalanone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol and zearalenone in urine by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 6, p. 987–994, 2013.
- MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 5. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2010.
- MINERVINI, F.; DELL’AQUILA, M. E. Zearalenone and reproductive function in farm animals. **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 12, p. 2570–2584, 2008.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. Mycotoxins: an underhand food problem. In: MORETTI, A.; SUSCA, A. (Org.). **Mycotoxigenic fungi**. New York: Humana Press, 2017. p. 1-24. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_1).

NIESSEN, W. M. A. **Liquid chromatography-mass spectrometry**. 3. ed. (Chromatographic Science). Boca Raton: CRC Press, 2006. 632 p.

NEME, K.; MOHAMMED, A. T. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategy: a review. **Food Control**, v. 78, p. 412-425, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>. Acesso em: 19 jul. 2024.

OLDENBURG, E.; HÖPPNER, F.; ELLNER, F.; WEINERT, J. Fusarium diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 3, p. 167-182, 2017.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2002.

PANG, J.; ZHOU, Q.; SUN, X.; LI, L.; ZHOU, B.; ZENG, F.; ZHAO, Y.; SHEN, W.; SUN, Z. Effect of low-dose zearalenone exposure on reproductive capacity of male mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 333, p. 60-67, 2016.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, A. I.; AROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PASTORE, V. A. A. Desenvolvimento e validação de método de ensaio quantitativo e confirmatório por UPLC/MS-MS para determinação de monensina e fipronil em fígado bovino. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, v. 31, p. 2190-2193, 2008.

PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H.; COLE, M. B. Mycotoxin production in major crops is influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. **Food Control**, v. 32, p. 205-215, 2013.

PITTET, A. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 96, p. 424-444, 2005.

PORTO, H. S. M. Avaliação de aspectos críticos à transferência e validação de métodos analíticos. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Portugal.

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

RAI, A.; DAS, M.; TRIPATHI, A. Occurrence and toxicity of a *Fusarium* mycotoxin, Zearalenone. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2710–2729, 2019. DOI: 10.1080/10408398.2019.1655388.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, D. G. Determinação de resíduos de anabolizantes em músculo, pelo e soro bovino por LC-MS/MS: desenvolvimento analítico e estudos in vivo. 2020. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Faculdade de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.

ROPEJKO, K.; TWARUZEK, M. Zearalenone and its metabolites: general overview, occurrence, and toxicity. **Toxins**, v. 13, p. 35, 2021. DOI: 10.3390/toxins13010035.

SALVAT, A. E.; BALBUENA, O.; RICCA, A.; COMERIO, R. M.; ROSELLO BRAJOVICH, J. E.; ROJAS, D.; CRISTOS, D.; RONCO, S.; SALERNO, J. C. Zeranol y metabolitos urinários de zearalenona en bovinos para carne. **RIA**, p. 149-154, 2015.

SARTORI, A. V. Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias analíticas para determinação de micotoxinas em amendoim, leite, fórmulas infantis e alimentação infantil à base de cereais por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. 2015. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SCHMIDT, K.; STACHEL, C.; GOWIK, P. Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 4, p. 1199-1210, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-1943-x>. Acesso em: 10 ago. 2024.

SILVEIRA, A. L. Desenvolvimento e validação de método por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial para análise de resíduos de anabolizantes em urina de bovino. 2017. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Faculdade de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.

SILVIA, W. J.; HATLER, T. B.; NUGENT, A. M.; LARANJA DA FONSECA, L. F. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 167-177, 2002.

SINGH, J.; MEHTA, A. Detecção rápida e sensível de micotoxinas por métodos analíticos avançados e emergentes: uma revisão. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 2183-2204, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1474>.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2. ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2009.

SOARES, R. R. G.; RICELLI, A.; FANELLI, C.; CAPUTO, D.; DE CESARE, G.; CHU, V.; AIRES-BARROS, M. R.; CONDE, J. P. Advances, challenges and opportunities for point-of-need screening of mycotoxins in foods and feeds. **The Analyst**, v. 143, n. 5, p. 1015-1035, 2018.

TEQJA, S.; MAVROMATI, J. Resorcylic acid lactones interpretation, discrimination abuse or contamination through the statistical model. **Scholars Journal of Agricultural and Veterinary Sciences**, v. 11, n. 6, p. 77-81, 2024. DOI: 10.36347/sjavs.2024.v11i06.001.

UHLIG, S.; JESTOI, M.; PARIKKA, P. *Fusarium avenaceum* - The North European situation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 17-24, 2007.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) nº 1319/2016, de 9 de agosto de 2016. **Diário Oficial da União Europeia**, 2016. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reco/2016/1319/oj>. Acesso em: 25 ago. 2024.

UPADHAYA, S. D.; PARK, M. A.; HA, J. K. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, p. 1250–1260, 2010.

VEDOVATTO, M. G. *et al.* Micotoxinas na dieta de bovinos de corte: revisão. **Archivos de zootecnia**, v. 69, n. 266, p. 234–244, 2020.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227-236, 2001.

WOOD, S. N.; AUGUSTIN, N. H. GAMs with integrated model selection using penalized regression splines and applications to environmental modelling. **Ecological Modelling**, v. 157, n. 2-3, p. 157-177, 2002.

YANG, C.; WANG, J.; LI, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 799, p. 8-22, 2013.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129–144, 2011.

ZANELLA, R. *et al.* QuEChERS. In: **BORGES, K. B.; FIGUEREDO, E. D.; QUEIROZ, M. E. C.** (Org.). *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC, 2015. cap. 24, p. 231-244.

ZHANG, X.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; ZHONG, L. O papel do estresse oxidativo no dano ao DNA induzido por desoxinivalenol em células HepG2. **Toxicon**, v. 54, p. 513-518, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.05.021.

ZHAO, J. Impact of enteral nutrition on energy metabolism in patients with Crohn's disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 21, n. 4, p. 1299, 2015.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007.