

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Eliana Burtet Parmeggiani

**ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO DE NOVILHAS
SUBMETIDAS A DIETAS CONTENDO ZEARALENONA COM E SEM
ADITIVO ANTI-MICOTOXINA**

Santa Maria, RS
2018

Eliana Burtet Parmeggiani

**ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO DE NOVILHAS
SUBMETIDAS A DIETAS CONTENDO ZEARALENONA COM E SEM ADITIVO
ANTI-MICOTOXINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS
2018

Parmeggiani, Eliana Burtet
ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO DE NOVILHAS
SUBMETIDAS A DIETAS CONTENDO ZEARALENONA COM E SEM
ADITIVO ANTI-MICOTOXINA / Eliana Burtet Parmeggiani.-
2018.

57 p.; 30 cm

Orientadora: Fernanda Silveira Flores Vogel
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. Bovino de Corte 2. Micotoxina 3. Agente
Detoxicante I. Silveira Flores Vogel, Fernanda II.
Título.

Eliana Burtet Parmeggiani

**ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO DE NOVILHAS
SUBMETIDAS A DIETAS CONTENDO ZEARALENONA COM E SEM ADITIVO
ANTI-MICOTOXINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

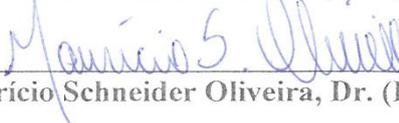
Aprovado em 31 de julho de 2018:



Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Gilson Antônio Pessoa, Dr. (UFSM)



Maurício Schneider Oliveira, Dr. (Praxis Science)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, por guiar, iluminar e abençoar meu caminho, estando sempre atento a minha prece de “Luz, sabedoria e clarividência”.

Aos que já partiram, pela coragem para seguir em frente.

À toda minha família, em especial aos meus pais Luis Alberto e Elenir, a minha irmã Marcela e ao meu cunhado Felipe, pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao meu noivo Anderson, pelo amor e sobretudo pela compreensão e companheirismo.

À orientadora Prof^a Mara Iolanda Batistella Rubin, pela oportunidade e dedicação, e por todos os ensinamentos transmitidos.

À equipe do Embryolab, ao Prof^o Gilson Antonio Pessoa, aos colegas pós-graduandos e também aos estagiários, pelo aprendizado, auxílio e amizade.

Ao meu co-orientador Prof^o Carlos Augusto Mallmann e aos colegas do LAMIC e do Instituto SAMITEC, pelo voto de confiança em meu trabalho, pela assistência e cooperação na realização deste projeto.

À Prof^a Karin Erica Brass, pela credibilidade em ceder gentilmente toda a estrutura da Cabanha Baviera para a execução do experimento e ainda pela convivência, atenção e motivação gostaria de expressar minha admiração e gratidão. Aos funcionários Marco, Henrique e Bruno, por não medirem esforços ao me auxiliarem e colaborarem com o manejo dos animais, pela troca de experiência e pelos bons momentos. À dona Maria e a sua família, pela acolhida, cuidado e carinho. Às novilhas, por integrarem a pesquisa e contribuírem em meu aprendizado.

Aos professores e colegas veterinários, por compartilharem o seu conhecimento sendo prestativos e pacientes.

À UFSM e ao PPGMV, pelo ensino e suporte proporcionado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO DE NOVILHAS SUBMETIDAS A DIETAS CONTENDO ZEARELENONA COM E SEM ADITIVO ANTI-MICOTOXINA

AUTORA: Eliana Burtet Parmeggiani
ORIENTADORA: Fernanda Silveira Flores Vogel

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por diversas espécies de fungos do gênero *Fusarium* spp. que pode interferir na fisiologia dos hormônios endógenos e afetar o sistema reprodutivo de animais de produção. Uma vez que as dietas podem estar contaminadas com ZEA, a possibilidade de diminuir a exposição é mediante a adoção de estratégias de descontaminação como o uso de aditivo anti-micotoxina (AAM). Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o aditivo anti-micotoxina à base de bentonita modificada reduziria o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona sob os aspectos clínicos, a ciclicidade e a taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Vinte e quatro novilhas taurinas de corte (n=24) com idade média de 2 anos de idade e $271 \pm 11,14$ Kg de peso corporal foram avaliadas através de exame clínico geral e ginecológico completo. As fêmeas que apresentaram-se hígdas e cíclicas foram selecionadas e distribuídas aleatoriamente para compor quatro grupos experimentais com 6 animais cada: T1 – dieta basal (controle), T2 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA, T3 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 2,5 kg/tonelada de AAM e T4 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 5,0 kg/tonelada de AAM. O experimento teve duração total de 37 dias, sendo 11 dias de período de adaptação, 21 dias de período experimental e 5 dias de período de regressão. No período de adaptação, todas as novilhas receberam protocolo hormonal para sincronização de estro e da ovulação, já no período experimental e de regressão foram realizadas as avaliações de peso corporal, coleta de sangue para dosagem hormonal de estradiol e progesterona, volume vulvar, edema da glândula mamária e ultrassonografia do trato reprodutivo avaliando a frequência de edema uterino e número e diâmetro de folículos e de corpos lúteos nos dias 0, 5, 10, 15, 20 e 25. E na estação reprodutiva (D67) as novilhas foram submetidas a um protocolo de IATF para analisar as taxas de concepção após a intoxicação. As médias de peso corporal foram similares entre os tratamentos nos diferentes dias avaliados. Não houve edema vulvar significativo entre os tratamentos nos diferentes dias avaliados. O edema da glândula mamária foi ausente em todos os tratamentos nos diferentes dias avaliados. Na avaliação do edema uterino constatou-se que, no dia 0, todas as novilhas apresentaram edema uterino independente do tratamento. Já nos dias 5, 10 e 25 o edema uterino foi ausente em todas as novilhas independente do tratamento. Nos dias 15 e 20, o edema uterino ocorreu de forma aleatória entre os tratamentos. Na avaliação ovariana as médias foram similares entre os tratamentos, quanto ao número e diâmetro de folículos e de corpos lúteos nos diferentes dias avaliados. A concentração sérica de estradiol foi similar entre os tratamentos nos diferentes dias avaliados. A dosagem de progesterona revelou que não houve diferença significativa entre os tratamentos nos dias avaliados (0, 5, 10, 15 e 25), com exceção do dia 20 (P=0.03) em que a concentração foi superior no T4. Em relação às taxas de concepção após a intoxicação foram obtidos 83% para o T1, 60% para o T2, 67% para o T3, 83% para o T4 e a taxa de concepção geral entre os tratamentos foi de 74%. O uso de aditivo anti-micotoxina na dose de 5 kg/tonelada reduziu o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona prevenindo que os efeitos da micotoxina afetassem a taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a protocolo de IATF. A contaminação das dietas com 5 mg/kg de zearalenona não afetou os aspectos clínicos e a ciclicidade durante os dias avaliados nas novilhas, porém reduziu a taxa de concepção.

Palavras-chave: Bovino de Corte. Micotoxina. Agente Detoxificante.

ABSTRACT

PHYSIOPATHOLOGICAL ASPECTS OF THE HEIFERS REPRODUCTION SUBMITTED TO DIETS CONTAINING ZEARALENONE WITH AND WITHOUT ANTI-MICOTOXIN ADDITIVE

AUTHOR: Eliana Burtet Parmeggiani
ADVISOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by several fungi species of the genus *Fusarium* spp., which can interfere with the physiology of endogenous hormones and affects the reproductive system of production animals. Since diets are contaminated with ZEA, the possibility of reducing exposure is through adoption of decontamination strategies such as use of anti-mycotoxin additive (AAM). Therefore, the aim of the present study was to evaluate whether the modified bentonite-based anti-mycotoxin additive would reduce the negative effect of zearalenone-contaminated diets on the clinical, cyclical and conception rate of beef heifers submitted to Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI). Twenty-four heifers (n=24) with average age of 2 years and 271 ± 11.14 kg of body weight were evaluated through a general and complete gynecological examination. Healthy and cyclic females were selected and randomly assigned to compose four experimental groups with 6 animals each: T1 - basal diet (control), T2 - basal diet + 5 mg/kg ZEA, T3 - basal diet + 5 mg/kg ZEA + 2.5 kg/ton AAM and T4 - basal diet + 5 mg/kg ZEA + 5.0 kg/ton AAM. The research had a total duration of 37 days, being 11 days of adaptation period, 21 days of experimental period and 5 days of regression period. In the adaptation period, all heifers received a hormonal protocol for estrus synchronization and ovulation. During the experimental and regression period were evaluated body weight, vulvar volume, mammary gland edema, blood collection for estradiol and progesterone hormone dosage, and ultrasonography of the reproductive tract for frequency of uterine edema and number and diameter of follicles and corpus luteum on days 0, 5, 10, 15, 20 and 25. At the reproductive season (D67) the heifers were submitted to a FTAI protocol to analyze conception rate after intoxication. Body weight averages were similar between treatments on the different days evaluated. There was no significant vulvar edema between treatments on the different days evaluated. The edema of the mammary gland was absent in all treatments on the different days evaluated. In the assessment of uterine edema, it was observed that at day 0, all heifers presented uterine edema regardless of the treatment. And on days 5, 10 and 25 uterine edemas were absent in all heifers regardless of the treatment. On days 15 and 20, uterine edema occurred randomly between treatments. In the evaluation of the ovaries the averages were similar between treatments, regarding the number and diameter of follicles and corpora lutea corpus luteum on the different days evaluated. Serum estradiol concentration was similar between treatments on the different days evaluated. The progesterone levels revealed that there was no significant difference between treatments on days 0, 5, 10, 15 and 25, except for day 20 (P=0.03), where concentration was higher in T4. Conception rates after intoxication was 83% for T1, 60% for T2, 67% for T3, 83% for T4, and the overall rate between treatments was 74%. The use of an anti-mycotoxin additive at a dose of 5 kg/ton reduced the negative effect of diets contaminated with zearalenone by preventing the effects of mycotoxin on conception rate of heifers submitted to FTAI protocol. The contamination of the diets with 5 mg/kg zearalenone did not affect the clinical aspects and the cyclicity during days evaluated in the beef heifers, but reduced conception rate.

Key-words: Beef Cattle. Mycotoxin. Detoxifying Agent.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
AAM	Aditivo Anti-Micotoxina
ARN	Ácido Ribonucleico
HSCAS	Aluminossilicatos Hidratados de Cátions
HSDs	Hidroxiesteróides Desidrogenases
LMT	Limites Máximos Tolerados
mg/kg	miligrama por quilograma
nm	Nanômetro
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REs	Receptores Estrogênicos
UDFGT	Uridina Difosfato Glucuronil Transferases
ZAE	Zearalanona
ZEA	Zearalenona
α -ZAL	α -Zearalanol
α -ZEL	α -Zearalenol
β -ZAL	β -Zearalanol
β -ZEL	β -Zearalenol
μ g/kg	micrograma por quilograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	ZEARALENONA.....	12
2.1.1	Características da micotoxina.....	12
2.1.2	Formação e ocorrência da micotoxina a campo.....	12
2.1.3	Limites máximos tolerados da micotoxina em alimentos.....	13
2.1.4	Biotransformação da micotoxina.....	14
2.1.5	Mecanismo de ação da micotoxina.....	16
2.1.6	Sinais clínicos e consequências da exposição <i>in vivo</i> a micotoxina.....	18
2.1.7	Aditivos anti-micotoxina.....	19
2.2	CICLO ESTRAL BOVINO.....	20
2.2.1	Oogenese e foliculogenese.....	21
3	CAPÍTULO 1.....	23
4	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular que podem ser produzidas por fungos filamentosos (BENNETT e KLICH, 2003) e apresentam toxicidade aos animais e humanos (BERTHILLER et al., 2013). As enfermidades causadas pela exposição a micotoxinas são denominadas micotoxicoses (LAZZARI, 1997).

Mais de 300 tipos de micotoxinas são conhecidas e, muitas destas possuem toxicidade em baixas concentrações significativas (BENNETT e KLICH, 2003). As micotoxinas consideradas de maior risco para a segurança alimentar são produzidas principalmente pelos fungos dos gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. (SANTINI, et al., 2012). Dentre estes, as Aflatoxinas e a Ocratoxina A são produzidas por *Aspergillus* spp., sendo a Ocratoxina A também produzida por *Penicillium* spp., já as Fumonisinias, a Zearalenona e os Tricotecenos (Desoxinivalenol, Toxina - T2, Diacetoxicerpenol e Nivalenol) são produzidos por *Fusarium* spp. (KUMAR et al., 2008; MILLER, 1995).

A presença de fungos não implica obrigatoriamente na produção de micotoxinas, mas as micotoxinas podem estar presentes mesmo na ausência dos fungos produtores (DINIZ, 2002). Logo, uma determinada micotoxina pode ser produzida por mais de um gênero de fungo, assim como um mesmo gênero pode produzir diferentes tipos de micotoxinas (MAZIERO e BERSOT, 2010). Sendo assim, múltiplas micotoxinas podem ocorrer simultaneamente em alimentos e rações e os efeitos resultantes dessa co-ocorrência podem ser sinérgicos, aditivos ou antagônicos (D' MELLO et al., 1999) e são decorrentes do tempo de consumo, do nível de contaminação e da interação toxicológica (BERTHILLER et al., 2013). Além disso, o consumo de alimentos contaminados por fungos e/ou micotoxinas pode ser recusado pelos animais (CABRAL et al., 2013).

Os efeitos tóxicos das micotoxinas podem variar, dependendo da espécie afetada, sexo, idade, condições nutricionais e fatores ambientais (MALLMANN e DILKIN, 2007). Seus efeitos estão intrinsecamente relacionados a frequência e a dose e podem ocorrer de forma aguda ou subaguda. A intoxicação é considerada aguda quando há ingestão de altas doses por um curto período de tempo e subaguda quando há ingestão de baixas doses por um longo período de tempo (BENNETT e KLICH, 2003).

O crescimento dos fungos e a conseqüente produção de micotoxinas é de ocorrência mundial e predominam em regiões de climas tropicais e subtropicais, onde o desenvolvimento fúngico é favorecido pelas condições ambientais (MALLMANN e DILKIN, 2007). O Brasil é um país de clima temperado o que permite o crescimento de quase todos os fungos produtores

de micotoxinas (MAZIERO e BERSOT, 2010), porém as diferenças geográficas implicam em mudanças climáticas e, assim algumas regiões apresentam níveis elevados de contaminação por micotoxinas específicas. Estima-se que 25% de todos os alimentos produzidos no mundo estão contaminados por micotoxinas (BENNETT e KLICH, 2003). E sabe-se que no Brasil as micotoxinas são responsáveis por expressivos prejuízos econômicos, mas praticamente não existem estimativas de perdas.

A contaminação por micotoxinas representa um crescente problema, do ponto de vista toxicológico e econômico (MARCZUK et al., 2012), no que concerne à produção vegetal e animal (BHAT et al. 2010; MAGAN e ALDRED, 2007). Muitas propriedades rurais brasileiras tem como finalidade direta a produção e a elaboração da dieta para os próprios animais, e deste modo, a contaminação por micotoxinas torna-se mais propícia, tanto no campo como nos alimentos conservados e concentrados (PAULUS e PARIS, 2016).

O setor agropecuário consome grande parte da oferta dos principais grãos de cereais (milho, soja e o trigo) produzidos em nosso país para a formulação de dietas animais. O Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES) contabiliza anualmente os dados de produção e consumo de ração animal e, no ano de 2016 atingiu 67,2 milhões de toneladas (8,2 milhões de toneladas para a pecuária de corte e leite), já em 2017 alcançou 68,6 milhões de toneladas (8,5 milhões de toneladas para a pecuária de corte e leite) (SINDIRAÇÕES, 2018). No entanto, para garantir a inocuidade dos alimentos comercializados e minimizar o risco de exposição as micotoxinas, os programas de monitoramento e rastreamento implantados trabalham em comunicação aos órgãos competentes para regulamentar a legislação existente. Evitando assim, que o fluxo de alimentos contaminados por micotoxinas imponha barreiras comerciais indesejáveis.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar se o aditivo anti-micotoxina à base de bentonita modificada reduziria o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona sob os aspectos clínicos, a ciclicidade e a taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ZEARELENONA

2.1.1 Características da micotoxina

A micotoxina zearalenona (ZEA) foi chamada inicialmente de Toxina F-2 e essa denominação foi modificada após a determinação de sua estrutura química ($C_{18}H_{22}O_5$) como uma lactona do ácido fenólico 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- β -resorcíclico (URRY et al., 1966). Essa designação resultou da combinação entre a forma sexuada do fungo *Fusarium graminearum* à *Gibberella zea* (ZEA) e das características de sua estrutura química, (RAL) da lactona do ácido resorcíclico, (EN) da dupla ligação entre os carbonos C-1' e C-2' e (ONA) da presença da cetona C-6' (URRY et al., 1966). A zearalenona (CAS 17924-92-4) é branca em cor mas de estrutura cristalizável, que quando exposta a luz ultravioleta a 366 nm exibe uma fluorescência azul esverdeada. O peso molecular relativo é de 318,34 e o ponto de fusão ocorre em 165°C, sendo insolúvel em água, mas solúvel em soluções alcalinas e a solventes orgânicos.

2.1.2 Formação e ocorrência da micotoxina a campo

A produção da ZEA está relacionada principalmente às condições ambientais que são determinadas pela variação entre umidade, temperatura, oxigênio, atividade da água e pH (FINK-GREMMELS, 1999). A ocorrência da ZEA é favorecida em temperaturas ambientais na faixa de 15°C e umidade relativa superior a 25% (AGAG, 2004). Oscilações térmicas favorecem o crescimento fúngico em temperaturas mais altas, enquanto que o metabolismo secundário necessário para a produção da toxina, é desencadeado em temperaturas mais baixas (MALLMANN e DILKIN, 2007).

A zearalenona é produzida por diversas espécies de fungo do gênero *Fusarium spp.* (KUIPER-GOODMAN et al., 1987) predominantemente por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense* e além de *F. moniliforme*, *F. equiseti* e *F. semitectum*, *F. cerealis*, *F. sambucinum* (GLENN, 2007). As espécies de fungo desse gênero são propensas a contaminar substratos alimentares, pois são de natureza onipresente (MORGAVI e RILEY, 2007).

A zearalenona é uma contaminante natural de grãos de cereais em todo o mundo (BOTTALICO, 1998; DIEKMAN e GREEN, 1992) sendo frequentemente encontrada nas culturas de milho, trigo, soja, aveia, arroz, cevada, sorgo e centeio (KUIPER-GOODMAN et

al., 1987). A formação da ZEA ocorre ainda na lavoura, mas também durante o transporte, processamento e armazenamento (MILANI, 2013). A adoção de boas práticas pode minimizar a contaminação pela micotoxina nestas etapas, porém a utilização de métodos incorretos de preparo e oferta podem propiciar a sua ocorrência (BRYDEN, 2012). A zearalenona contamina ainda alimentos concentrados como rações (HUSSEIN e BRASEL, 2001) e conservados como palha, feno e silagem (BINDER et al., 2007). E além disso, gramíneas e forrageiras de pastoreio no campo também podem estar contaminadas por ZEA (ERASMUSON et al., 1994; HASUNUMA et al., 2011) afetando assim os ruminantes.

2.1.3 Limites máximos tolerados da micotoxina em alimentos

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentou a resolução da diretoria colegiada (RDC) n. 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispôs sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas, estabelecendo aplicações admissíveis para ZEA e outras micotoxinas em alimentos prontos para a oferta ao consumidor e em matérias primas, aplicando-se a empresas que importam, produzem, distribuem e/ou comercializam alimentos, com prazos de aplicação imediata (artigo 13, anexo I) e para os anos pares de 2012 (artigo 10, anexo II), 2014 (artigo 11, anexo III) e 2016 (artigo 12, anexo IV) (ANVISA, 2011).

No entanto, em 2013 a ANVISA apresentou a RDC n. 59, de 26 de dezembro de 2013, que prorrogou os prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011, ficando os prazos prorrogados para adequação até 1º de janeiro de 2017 (ANVISA, 2013). Já em 2017, a ANVISA apresentou a RDC n. 138, de 8 de fevereiro de 2017, que alterou a RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011, e novos LMT para ZEA passaram a vigorar. Com esta RDC ficaram aceitos os LMT de 40 µg/kg em milho em grão e trigo para posterior processamento, 150 µg/kg em produtos e subprodutos a base de milho, 200 µg/kg em trigo integral e farelo de trigo, 600 µg/kg em farelo de arroz e 100 µg/kg em outros cereais e seus subprodutos (ANVISA, 2017). Até o presente momento, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não estabeleceu nenhuma legislação específica para ZEA em alimentos destinados ao consumo animal. Sendo que vários fatores podem influenciar no estabelecimento de níveis regulamentados na alimentação animal, como a disponibilidade de dados de ocorrência e de intoxicação.

A Comissão de Recomendação da União Europeia, estabelece valores de orientação aos países que fazem parte do bloco, para alimentos (com teor de umidade de 12%) contaminados por ZEA e destinados ao consumo animal, os valores aplicados são de 3000 µg/kg para o milho

e seus subprodutos e 2000 µg/kg para os demais cereais e seus subprodutos. A mesma propõe ainda que a contaminação por ZEA na dieta dos bovinos não exceda a 500 µg/kg independentemente da categoria animal (2006/576/EC). Na tentativa de garantir a segurança alimentar dos bovinos a contaminação por ZEA na dieta total não deve exceder a 250 µg/kg (AGAG, 2004; ERFANI et al., 2014; LAMIC, 2018).

As dietas dos animais de produção podem apresentar variabilidade na concentração média de micotoxinas (BINDER et al., 2007) e devido ao impacto negativo causado por estas, a qualificação e a quantificação nos ingredientes utilizados tornam-se de extrema importância. A contaminação por ZEA foi investigada por um período de 3 anos (2009 a 2011) nas *commodities* mais utilizadas para a produção de ração nos países dos continentes Americano, Europeu e Asiático. Das 5.402 amostras testadas, 45% (n=2.431) foram positivas e apresentaram concentração média de ZEA de 233 µg/kg (RODRIGUES e NAEHRER, 2012). Dados de rações de consumo animal de 25 países da União Europeia foram amostrados para ZEA ao longo dos anos de 2001 até 2015 e enviados ao Painel da EFSA sobre Contaminantes na Cadeia Alimentar (EFSA, 2017). Do total de 17.706 amostras obtidas, 84% (n=14.970) foram positivas para ZEA com concentração média de 11 µg/kg e a concentração de alcance variou de 0.03-200 µg/kg, sendo que os metabólitos da ZEA também foram detectados. Análises realizadas pelo Instituto SAMITEC para rações contaminadas por ZEA demonstraram que no ano de 2016, das 1.453 amostras avaliadas, 47% (n=683) foram positivas com concentração média de 74 µg/kg. Em 2017, das 751 amostras avaliadas, 39% (n=293) foram positivas e apresentaram concentração média de 76 µg/kg (INSTITUTO SAMITEC, 2018).

2.1.4 Biotransformação da micotoxina

Nos ruminantes, a biotransformação da ZEA ocorre no rúmen, intestino delgado (duodeno) e fígado (KALLELA e VASENIUS, 1982; KIESSLING et al., 1984; MALEKINEJAD et al., 2006a; OLSEN, 1989; WINKLER et al., 2014), sendo que a partir destes órgãos são formados os metabólitos α -Zearalenol (α -ZEL), β -Zearalenol (β -ZEL), α -Zearalanol ou Zeranol (α -ZAL), β -Zearalanol ou Taleranol (β -ZAL) e Zearalanona (ZAE) (EFSA, 2011). Estes metabólitos, também são produzidos pelos mesmos fungos produtores da ZEA, embora em quantidades reduzidas quando comparado a biotransformação da ZEA pelo organismo (ZINEDINE et al., 2007). O metabolismo da ZEA pode ocorrer em duas fases. Na fase 1, ocorre a reação de hidroxilação da ZEA que é catalisada pelas enzimas 3 α e 3 β hidroxisteróides desidrogenases (HSDs). E na fase 2, a ZEA e seus metabólitos são conjugados

com o ácido sulfônico ou glucurônico, sendo catalisados pela enzima uridina difosfato glucuronil transferases (UDFGT) e essa conjugação eleva a solubilidade da ZEA e de seus metabólitos (OLSEN, 1989).

A principal forma de exposição à ZEA é através da ingestão oral (KUMAR et al., 2008). Após a ZEA ser ingerida, a mesma alcança o rúmen onde enfrenta grande desafio pela microbiota ruminal (ROSSI et al., 2009) e neste já ocorre a conversão de ZEA em seus metabólitos (SEELING e DÄNICKE, 2005). Ao alcançarem o intestino delgado a ZEA e seus metabólitos são absorvidos pela mucosa duodenal (FINK-GREMMELS, 2008a), sendo a biodisponibilidade estimada em 80-85% em mamíferos (KUIPER-GOODMAN et al., 1987) e na mucosa duodenal também ocorre a conversão. Desta forma, ambos atingem a circulação sanguínea (MARCZUK et al., 2012) e podem ser detectados no soro de mamíferos a cerca de 30 minutos (OLSEN, 1989), porém as concentrações máximas de ZEA e de seus metabólitos no soro bovino são alcançados mais tarde, quando comparado a outras espécies (EFSA, 2017). Estudos dose-resposta em bovinos apresentaram grande variação de tempo em função da dose empregada (KENNEDY et al., 1998; PRELUSKY et al., 1990). Logo após, atingirem a circulação são distribuídos aos órgãos, e no fígado também ocorre conversão. Assim, a ZEA e seus metabólitos passam pela reciclagem entero-hepática, apresentando meia-vida de distribuição de 3,15 horas e meia vida de eliminação superior a 28,58 horas em ruminantes (DONG et al., 2010). A excreção da ZEA e de seus metabólitos pode ocorrer em um período superior à 72 horas (KUIPER-GOODMAN et al., 1987), sendo que ambos podem ser excretados na forma de compostos livres ou conjugados, influenciando na sensibilidade individual e na susceptibilidade aos efeitos (D' MELLO et al., 1999).

Dentre os ruminantes, os bovinos são considerados mais resistentes aos efeitos adversos da ZEA e de seus metabólitos quando comparados aos monogástricos (DIEKMAN e GREEN, 1992; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; FINK-GREMMELS, 2008ab; MARCZUK et al., 2012; SEELING e DÄNICKE, 2005; SEELING et al., 2005; UPADHAYA et al., 2010). Neste contexto, os bovinos de leite são mais suscetíveis a intoxicação do que os bovinos de corte, sendo que as fêmeas são mais sensíveis do que os machos. Logo, bezerras, novilhas e vacas em período de transição são mais vulneráveis por apresentarem desempenho elevado (FINK-GREMMELS, 2008b; GAJECKI, 2002; KALLELA e ETTALA, 1984).

A microbiota (bactérias, protozoários e fungos) ruminal atua como primeira linha de defesa contra a ZEA (DIEKMAN e GREEN, 1992; KIESSLING et al., 1984; ROSSI et al., 2009) e apresenta capacidade de degradar a micotoxina (FINK-GREMMELS, 2008b; KALLELA e VASENIUS, 1982; SEELING e DÄNICKE, 2005; UPADHAYA et al., 2010).

Porém, esta capacidade é saturável e varia de acordo com a dieta, o regime alimentar e os distúrbios metabólicos apresentados (DÄNICKE et al., 2005; FINK-GREMMELS, 2008ab; KHATOON et al., 2012; SEELING et al., 2005) sendo que o nível de ingestão alimentar influencia na taxa de conversão da micotoxina pelo tempo de retenção e de contato.

2.1.5 Mecanismo de ação da micotoxina

A zearalenona é considerada a única micotoxina com ação estrogênica não esteróide (MITTERBAUER et al., 2003) mas de baixa toxicidade aguda (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Esta micotoxina é reconhecida como um composto fitoestrogênico (RETANA-MÁRQUEZ et al., 2012), micoestrogênico (CORTINOVIS et al., 2013) e como disruptor endócrino (DÖLL e DÄNICKE, 2011; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; FRIZZELL et al. 2011; SEELING e DÄNICKE, 2005). Os disruptores endócrinos interferem na fisiologia dos hormônios endógenos e afetam o sistema reprodutivo de fêmeas e machos de diferentes espécies (BERTHILLER et al., 2013).

Os bovinos são mais resistentes aos efeitos adversos da ZEA do que outros animais de criação, pois eles convertem ZEA predominantemente em β -ZEL (EFSA, 2017), que é também o metabólito predominante nos fluidos biológicos (soro, bile, urina/fezes e leite) (DÄNICKE e WINKLER, 2015; EFSA, 2017). Desta forma, a conversão à α -ZEL ocorre em menor quantidade, porém este é considerado o metabólito mais estrogênico e com maior toxicidade quando comparado ao β -ZEL (FINK-GREMMELS, 2008a; GAJECKI, 2002; MALEKINEJAD et al., 2006b; UPADHAYA et al., 2010). Assim, a redução da ZEA em α -ZEL pode ser considerada uma reação de ativação, enquanto a redução a β -ZEL pode ser considerada uma reação de desativação, tornando β -ZEL o metabólito com menor toxicidade (OLSEN, 1989). A ordem da potência relativa da ZEA e de seus metabólitos é distribuída da seguinte forma: α -ZEL (92), α -ZAL (18), β -ZAL (3.5), ZAE (2.5), ZEA (1) e β -ZEL(0.44) (SHIER et al., 2001), e resulta em alguns metabólitos de maior toxicidade que a própria micotoxina (D' MELLO et al., 1999).

A estrutura da ZEA e de seus metabólitos é flexível e semelhante aos estrógenos naturais (17- β -estradiol, estriol e estrona), e ligam-se de forma competitiva aos receptores estrogênicos (REs) (DIEKMAN e GREEN, 1992; FRIZZELL et al., 2011; MARCZUK et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SHIER et al., 2001). Dois subtipos de REs são encontrados, os REs- α e os REs- β que diferem em afinidade e, sabe-se que a ZEA possui maior afinidade aos REs- α , do que aos REs- β (EFSA, 2017; TAKEMURA et al., 2007). O metabólito de maior afinidade de

ligação ao REs é o α -ZEL, embora este seja absorvido somente em pequenas concentrações (FINK GREMMELS, 2008a; GAJECKI, 2002; UPADHAYA et al., 2010), na sequência a afinidade é seguida para ZEA e β -ZEL (MALEKINEJAD et al. 2006b). A afinidade de ligação apresentada pelo metabólito α -ZEL é 10-20 vezes superior à ZEA e cerca de 100 vezes ao metabólito β -ZEL (KATZENELLENBOGEN et al., 1979).

A ligação da zearalenona e de seus metabólitos aos receptores estrogênicos citosólicos ocorre por uma interação, que atravessa a membrana celular passivamente ao alcançar o hipotálamo, hipófise, útero e/ou glândula mamária (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; MINERVINI et al., 2001). Desta forma, um complexo receptor-micotoxina é formado e transferido para o núcleo das células, ligando-se aos receptores nucleares que ativam a expressão gênica, responsável pelo aumento de ácido ribonucleico (ARN) específico e atividade polimerase, promovendo assim a síntese de novas proteínas (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

O maior potencial estrogênico da ZEA e de seus metabólitos é devido ao mecanismo de ação e ao tempo de permanência no núcleo das células, quando comparado aos estrógenos naturais (GAUMY et al., 2001). Consequentemente, a secreção das células endometriais, a síntese das proteínas locais e o volume dos órgãos reprodutivos serão aumentados (MELO, 2016).

Além da interação com os REs, a zearalenona e seus metabólitos também são um substrato competitivo para as enzimas 3α -HSDs e 3β -HSDs envolvidas na síntese e metabolismo dos hormônios esteróides (estradiol, progesterona, testosterona e cortisol) (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; FRIZZELL et al., 2011; KUIPER-GOODMAN et al., 1987). As hidroxisteróides desidrogenases estão presentes no hipotálamo, hipófise, ovário, testículos, próstata, intestino, fígado e rins (OLSEN, 1989). E nos bovinos a expressão de 3β -HSDs é prevalente (MALEKINEJAD et al., 2006a).

A principal atividade biológica da ZEA e de seus metabólitos é a estrogenicidade (EFSA, 2017) e desta forma, causa alterações funcionais e morfológicas nos órgãos reprodutivos (DIEKMAN e GREEN, 1992; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; KLEINOVA et al., 2002; KUIPER-GOODMAN et al., 1987; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008; SHIER et al., 2001). Adicionalmente, interferem na síntese e metabolismo dos hormônios esteróides (estradiol, progesterona, testosterona e cortisol) (FRIZZELL et al., 2011), podendo reduzir os níveis séricos do hormônio liberador de gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante (RADOSTITS et al., 1994).

2.1.6 Sinais clínicos e consequências da exposição *in vivo* a micotoxina

Os sinais clínicos provocados pela ZEA e seus metabólitos variam de acordo com a categoria e o estado reprodutivo, afetando principalmente as fêmeas bovinas jovens. A maioria dos surtos identificados desta micotoxicose são pela forma subaguda e sinais inespecíficos ocorrem, havendo comprometimento do sistema imune com susceptibilidade a doenças secundárias causadas pelo desequilíbrio hormonal (MORGAVI e RILEY, 2007).

A zearalenona e seus metabólitos tem sido objetivo de muitas pesquisas, e com ênfase a literatura relata a interferência negativa sobre o sistema reprodutivo (DIEKMAN e GREEN, 1992; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; KLEINOVA et al., 2002; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008) induzindo a sinais hiperestrogênicos em fêmeas bovinas (AGAG, 2004; D' MELLO et al., 1999; DIEKMAN e GREEN, 1992; KUIPER-GOODMAN et al., 1987; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008; WEAVER et al., 1986b). A eficiência reprodutiva pode ser comprometida pela redução da fertilidade (AGAG, 2004; D' MELLO et al., 1999; DIEKMAN e GREEN, 1992; FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008; WEAVER et al., 1986b) e conseqüentemente pode haver retorno ao estro com intervalos irregulares, bem como a formação de cistos ovarianos (DE SAEGER et al., 2003; KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Além disso, as fêmeas bovinas podem ser acometidas por vaginite e secreção vaginal, edema vulvar, uterino e de glândula mamária e prolapso uterino, vaginal e de reto (AGAG, 2004; DE SAEGER et al., 2003; DIEKMAN e GREEN, 1992). E ainda a maturação dos oócitos, a ovulação, a implantação e a gestação poderão ser comprometidas com conseqüente morte embrionária e aborto (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; KALLELA e ETTALA, 1984; ZINEDINE et al., 2007), bem como redução na produção leiteira (AGAG, 2004; D' MELLO et al., 1999; DIEKMAN e GREEN, 1992; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008; WEAVER et al., 1986b; ZINEDINE et al., 2007).

O diagnóstico desta micotoxicose é baseado no desempenho reprodutivo do rebanho juntamente com os sinais clínicos, achados epidemiológicos de contaminação e exames de campo e laboratoriais. O tratamento é paliativo e a recuperação das funções reprodutivas e a regressão dos sinais clínicos geralmente ocorrerão entre 1-4 semanas após a suspensão completa da ZEA na alimentação (FRASER, 1996). É essencial qualificar e quantificar o tipo de micotoxina, monitorar a exposição e indicar estratégias para a redução da contaminação (BINDER et al., 2007; BRYDEN, 2012) como o uso de aditivo anti-micotoxina (AAM) nas dietas.

Tabela 1 – Categoria animal, dose de zearalenona e os efeitos da ingestão de dietas contaminadas em fêmeas bovinas.

Categoria animal	Dose de ZEA (mg/kg)	Efeitos	Referências
Vacas + Novilhas	14 (feno) n=150	Infertilidade e aumento no número de inseminações (de 1,2 para 4)	MIROCHA et al., 1968
Vacas	3,19-9,55 (ração) n=21	Infertilidade, falso cio, edema de vulva e vaginal com secreção	ROINE et al., 1971
Novilhas virgens	sem dados de [] (ração) n=20	Edema de glândula mamária com atividade secretora em 2 animais (8 e 12 meses)	BLOOMQUIST et al., 1982
Novilhas virgens	250 mg/dia 3 ciclos estrais n=36	Redução da taxa de concepção (de 87% nas novilhas controle para 62% nas novilhas tratadas)	WEAVER et al., 1986 ^a
Vacas	500 mg/dia 2 ciclos estrais n=18	A concentração de progesterona não foi afetada e não houve alterações comportamentais e no trato genital	WEAVER et al., 1986 ^b
*	>10	Disfunção reprodutiva, ninfomania, repetição de cio, hipertrofia uterina, secreções vaginais, aborto e perda de peso	FRASER, 1996
Novilhas	<10	Infertilidade, redução da taxa de concepção, repetição de cio e edema da glândula mamária	OSWEILER, 1998
Vacas	>10	Infertilidade, redução da taxa de concepção, repetição de cio, vaginite e secreções vaginais	OSWEILER, 1998
*	1,5-3	Efeitos hiperestrogênicos	D' MELLO et al., 1999
Novilhas	1,5-5	Vaginite, edema de glândula mamária e atraso na puberdade	BRIDGES et al., 2010
Vacas cíclicas	>10	Redução da taxa de concepção	BRIDGES et al., 2010
Vacas prenhes	20	Morte embrionária e aborto	BRIDGES et al., 2010

Nota: *Categoria animal não especificada.

2.1.7 Aditivos anti-micotoxina

A fim de reduzir a biodisponibilidade da ZEA, estratégias de descontaminação por métodos biológicos (degradação), químicos (detoxificação) e físicos (remoção) tem sido amplamente recomendados (DÖLL e DÄNICKE, 2011; RAMOS et al., 1996; ZINEDINE et al., 2007), assim como o uso de AAM nas dietas de animais de produção (DEVREESE et al., 2013). Os aditivos anti-micotoxina devem ser capazes de adsorver, biotransformar ou neutralizar as micotoxinas no trato gastrointestinal, sendo que estes devem ser inertes nutricionalmente. Estes aditivos possuem capacidade de ligação às micotoxinas fazendo com que ocorra um complexo de interação, que atua de forma profilática reduzindo a exposição e a distribuição ao organismo, sendo logo eliminado. A eficiência dessa ligação depende das

propriedades químicas e físicas dos ligantes (AVANTAGGIATO et al., 2005; HUWIG et al., 2001; KOLOSOVA e STROKA, 2012) e da relação de especificidade entre eles que é atribuída ao pH, polaridade, solubilidade, forma, tamanho, distribuição e dissociação das cargas.

A ocorrência de micotoxicoses em animais de produção pode ser prevenida com o uso de AAM nas dietas, mas nem todos são eficazes em atenuar os efeitos deletérios provocados pelas micotoxinas. Os aditivos anti-micotoxina inorgânicos mais conhecidos são o carvão ativado, os aluminossilicatos contendo argilas (bentonita, zeolita, sepeolita e esmectitas) e os aluminossilicatos hidratados de cátions (HSCAS). Estes aluminossilicatos funcionam por troca de cargas e podem ser encontrados nas formas naturais ou modificadas e, ainda podem ser incorporados com compostos orgânicos tornando-os organoaluminossilicatos. A superfície hidrofílica destes é menos efetiva em adsorver micotoxinas de baixa polaridade, como a zearalenona (AVANTAGGIATO et al., 2005), porém a sua modificação aumenta a hidrofobicidade. Essa modificação consiste na incorporação de cátions à superfície dos aluminossilicatos, o que permite maior afinidade às moléculas orgânicas hidrofílicas, como a maioria das micotoxinas (LEMKE et al., 1998) induzindo assim maior adsorção. Já os aditivos anti-micotoxina orgânicos são a base de polissacarídeos naturais que incluem bactérias, leveduras e fungos, e funcionam por reações enzimáticas.

Para que os aditivos anti-micotoxina sejam liberados para a comercialização, criteriosos ensaios experimentais individualizados para cada micotoxina são realizados *in vitro*, e após aprovação *in vivo*, garantindo a segurança, a capacidade e a inocuidade. Os ensaios *in vivo* permitem avaliar a influência da digestibilidade sobre os AAM, comprovando assim a sensibilidade e a eficácia (AVANTAGGIATO et al., 2005).

2.2 CICLO ESTRAL BOVINO

A fêmea bovina é considerada poliéstrica não estacional e seu ciclo estral tem duração média de 21 dias (18 a 24 dias) e compreende o intervalo regular entre dois estros consecutivos (SADLEIR, 1976). Entretanto, somente na puberdade a fêmea manifestará o primeiro estro (MORAN et al., 1989), e a maturidade sexual corresponderá ao estágio de plena atividade reprodutiva (BYERLEY et al., 1987).

O ciclo estral faz parte do processo reprodutivo da fêmea bovina e consiste em uma série de modificações cíclicas e dinâmicas na fisiologia, na morfologia e também no perfil hormonal, sendo controlado por uma complexa interação neuroendócrina, coordenada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HANSEL e CONVEY, 1983). O ciclo estral pode ser

dividido em: fase folicular – estrogênica (proestro e estro) e fase luteínica – progesterônica (metaestro e diestro) (HANSEL e CONVEY, 1983).

No proestro (3 dias) ocorre a regressão do corpo lúteo e o crescimento final do folículo ovulatório, caracterizando-se pela redução da concentração da progesterona e pela elevação progressiva da concentração de estradiol produzido pelo folículo em desenvolvimento. Neste período, o comportamento da fêmea é de atração, porém não aceita a monta do macho e de outras fêmeas.

No estro ou cio ($6-18 \pm 12$ horas) há elevada predominância da concentração de estradiol pela presença do folículo dominante, que por sua vez estimula a liberação em pulsos e o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante. O comportamento neste período é de receptividade sexual e a fêmea aceita a monta de outros animais. Algumas características do estro são: nervosismo, inquietação, fonação, elevação da temperatura corporal, aumento do tônus endometrial, edema vulvar, eliminação vaginal de secreção mucosa e cristalina com micção frequente, e perda de apetite com redução na produção leiteira.

No metaestro (2-3 dias) ocorre a ovulação espontânea após 24 a 30-32 horas do pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante ou entre 10 a 12 horas após o estro, e inicia-se o processo de luteinização com a formação do corpo lúteo. No diestro (15 dias) o corpo lúteo presente secreta elevada concentração de progesterona, e havendo fecundação após a ovulação será responsável pela manutenção da gestação. Quando não há concepção ou o concepto não sinaliza a sua existência até 15 ou 25 dias após a ovulação o corpo lúteo é lisado e regride, este processo é denominado luteólise e assim a concentração plasmática de progesterona decresce, e após a liberação da prostaglandina pelo endométrio uterino inicia-se um novo ciclo.

O anestro é considerado a ausência de ciclicidade ou manifestação estral e pode ser fisiológico quando ocorre logo após o parto ou nutricional pelo escore de condição corporal apresentado pelo animal (MORROW, 1986).

2.2.1 Oogenese e foliculogenese

A oogenese é o processo de formação, crescimento e maturação do oócito e a foliculogenese é o processo de formação, crescimento e maturação do folículo, sendo os dois processos interdependentes. O desenvolvimento dos oócitos ocorre no interior dos folículos ovarianos, formando um grande estoque que origina-se ainda na vida fetal (FAIR, 2003) e que desenvolve-se ao longo de toda a vida reprodutiva da fêmea bovina (FORTUNE et al., 1998).

Os folículos podem ser classificados em pré-antrais e antrais (MARTINS et al., 2008). Os folículos pré-antrais são representados pelos folículos primordiais, primários e secundários, e os folículos antrais englobam os folículos terciários ou pré-ovulatórios. Os folículos antrais podem ser divididos em dois estágios de desenvolvimento, um de crescimento lento e outro de rápido (PFEIFER e FERREIRA, 2015).

O estágio de crescimento lento (30-35 dias) compreende o crescimento folicular e a formação do antro, estes folículos possuem diâmetro inicial de 0,3 mm, sendo que neste estágio são parcialmente dependentes das gonadotrofinas hipofisárias (AERTS e BOLS, 2010). Já o estágio de crescimento rápido (5-10 dias) compreende o desenvolvimento da onda de crescimento folicular, onde os folículos apresentam diâmetro a partir 2-3 mm, sendo que neste estágio são completamente dependentes das gonadotrofinas (ADAMS et al., 1992).

A dinâmica folicular consiste em um processo contínuo (LUCY et al., 1992) e envolve o desenvolvimento sincronizado das ondas de crescimento folicular (SPICER e ECHTERNKAMP, 1986). Cada onda de crescimento folicular possui uma fase de emergência ou recrutamento, seleção ou desvio, dominância, seguida da regressão e atresia dos folículos subordinados, ou a ovulação do folículo dominante, culminando com a formação de um corpo lúteo (FORTUNE, 1994; GINTHER et al., 1997).

As fêmeas bovinas ao longo do ciclo estral apresentam em torno de 2 a 3 ondas de crescimento folicular (IRELAND e ROCHE, 1983; RAJAKOSKI, 1960; SIROIS e FORTUNE, 1988). Estas ondas podem ser detectadas nos animais nos dias 0 e 9-10 em ciclos de duas ondas (GINTHER et al., 1989) e nos dias 0, 8 e 15 em ciclos de três ondas (MAPLETOFT et al., 2002). Com maior frequência ocorrem ciclos com duas ondas em vacas e com três ondas em novilhas (KNOPF et al., 1989), mas somente a última onda do ciclo estral resultará em ovulação (SAVIO et al., 1988).

3 CAPÍTULO 1

Aditivo anti-micotoxina reduz o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona na taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a Inseminação Artificial em Tempo Fixo

Anti-mycotoxin additive reduces the negative effect of zearalenone-contaminated diet on the conception rate of beef taurine heifers submitted to timed artificial insemination

Artigo a ser submetido a periódico

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar se o aditivo anti-micotoxina à base de bentonita modificada reduziria o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona sob os aspectos clínicos, a ciclicidade e a taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Vinte e quatro novilhas taurinas de corte (n=24) com idade média de 2 anos de idade e $271 \pm 11,14$ Kg de peso corporal foram avaliadas através de exame clínico geral e ginecológico completo. As fêmeas que apresentaram-se híginas e cíclicas foram selecionadas e distribuídas aleatoriamente para compor quatro grupos experimentais com 6 animais cada: T1 – dieta basal (controle), T2 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA, T3 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 2,5 kg/tonelada de AAM e T4 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 5,0 kg/tonelada de AAM. O experimento teve duração total de 37 dias, sendo 11 dias de período de adaptação, 21 dias de período experimental e 5 dias de período de regressão. No período de adaptação, todas as novilhas receberam protocolo hormonal para sincronização de estro e da ovulação, já no período experimental e de regressão foram realizadas as avaliações de peso corporal, coleta de sangue para dosagem hormonal de estradiol e progesterona, volume vulvar, edema da glândula mamária e ultrassonografia do trato reprodutivo avaliando a frequência de edema uterino e número e diâmetro de folículos e de corpos lúteos nos dias 0, 5, 10, 15, 20 e 25. E na estação reprodutiva (D67) as novilhas foram submetidas a um protocolo de IATF para analisar as taxas de concepção após a intoxicação. As médias de peso corporal foram similares entre os tratamentos nos diferentes dias avaliados. Não houve edema vulvar significativo entre os tratamentos nos diferentes dias avaliados. O edema da glândula mamária foi ausente em todos os tratamentos nos diferentes dias avaliados. Na avaliação do edema uterino constatou-se que, no dia 0, todas as novilhas apresentaram edema uterino independente do tratamento. Já nos dias 5, 10 e 25 o edema uterino foi ausente em todas as novilhas independente do tratamento. Nos dias 15 e 20, o edema

uterino ocorreu de forma aleatória entre os tratamentos. Na avaliação ovariana as médias foram similares entre os tratamentos, quanto ao número e diâmetro de folículos e de corpos lúteos nos diferentes dias avaliados. A concentração sérica de estradiol foi similar entre os tratamentos nos diferentes dias avaliados. A dosagem de progesterona revelou que não houve diferença significativa entre os tratamentos nos dias avaliados (0, 5, 10, 15 e 25), com exceção do dia 20 ($P=0.03$) em que a concentração foi superior no T4. Em relação às taxas de concepção após a intoxicação foram obtidos 83% para o T1, 60% para o T2, 67% para o T3, 83% para o T4 e a taxa de concepção geral entre os tratamentos foi de 74%. O uso de aditivo anti-micotoxina na dose de 5 kg/tonelada reduziu o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona prevenindo que os efeitos da micotoxina afetassem a taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a protocolo de IATF. A contaminação das dietas com 5 mg/kg de zearalenona não afetou os aspectos clínicos e a ciclicidade durante os dias avaliados nas novilhas, porém reduziu a taxa de concepção.

Palavras-chave: bentonita modificada, micotoxina, alimentação, bovino de corte.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate whether the modified bentonite-based anti-mycotoxin additive would reduce the negative effect of zearalenone-contaminated diets on the clinical, cyclical and conception rate of beef heifers submitted Timed Artificial Insemination (TAI). Twenty-four heifers ($n=24$) with average age of 2 years and 271 ± 11.14 kg of body weight were evaluated through a general and complete gynecological examination. Healthy and cyclic females were selected and randomly assigned to compose four experimental groups with 6 animals each: T1 - basal diet (control), T2 - basal diet + 5 mg/kg ZEA, T3 - basal diet + 5 mg/kg ZEA + 2.5 kg/ton AAM and T4 - basal diet + 5 mg/kg ZEA + 5.0 kg/ton AAM. The research had a total duration of 37 days, being 11 days of adaptation period, 21 days of experimental period and 5 days of regression period. In the adaptation period, all heifers received a hormonal protocol for estrus synchronization and ovulation. During the experimental and regression period were evaluated body weight, vulvar volume, mammary gland edema, blood collection for estradiol and progesterone hormone dosage, and ultrasonography of the reproductive tract for frequency of uterine edema and number and diameter of follicles and corpus luteum on days 0, 5, 10, 15, 20 and 25. At the reproductive season (D67) the heifers were submitted to a FTAI protocol to analyze conception rate after intoxication. Body weight averages were similar between treatments on the different days evaluated. There was no significant vulvar edema between treatments on the different days evaluated. The edema of the mammary gland was absent in all treatments on the different days evaluated. In the assessment of uterine edema, it was observed that at day 0, all heifers presented uterine edema regardless of the treatment. And on days 5, 10 and 25 uterine edemas were absent in all heifers regardless of the treatment. On days 15 and 20, uterine edema occurred randomly between treatments. In the evaluation of the ovaries the averages were similar between

treatments, regarding the number and diameter of follicles and corpora lutea corpus luteum on the different days evaluated. Serum estradiol concentration was similar between treatments on the different days evaluated. The progesterone levels revealed that there was no significant difference between treatments on days 0, 5, 10, 15 and 25, except for day 20 ($P=0.03$), where concentration was higher in T4. Conception rates after intoxication was 83% for T1, 60% for T2, 67% for T3, 83% for T4, and the overall rate between treatments was 74%. The use of an anti-mycotoxin additive at a dose of 5 kg/ton reduced the negative effect of diets contaminated with zearalenone by preventing the effects of mycotoxin on conception rate of heifers submitted to TAI protocol. The contamination of the diets with 5 mg/kg zearalenone did not affect the clinical aspects and the cyclicity during days evaluated in the beef heifers, but reduced conception rate.

Key-words: modified bentonite, mycotoxin, feed, beef cattle.

INTRODUÇÃO

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por diversas espécies de fungos do gênero *Fusarium* spp. (BENNETT e KLICH, 2003) e está amplamente presente nas dietas de animais de produção como os bovinos (PLACINTA et al., 1999; PRICE et al., 1993). Uma grande variabilidade na concentração média da micotoxina é apresentada nas dietas (BINDER et al., 2007) e devido ao impacto negativo causado, a qualificação e a quantificação nos ingredientes utilizados tornam-se de extrema importância.

A principal forma de exposição à ZEA é através da ingestão oral (KUMAR et al., 2008) sendo que a biotransformação desta ocorre no rúmen, no intestino delgado (duodeno) e no fígado (KALLELA e VASENIUS, 1982; OLSEN, 1989; WINKLER et al., 2014). E a partir destes órgãos cinco metabólitos são formados (EFSA, 2011). Estes metabólitos também são produzidos pelos mesmos fungos produtores da ZEA, embora em quantidades reduzidas quando comparada a biotransformação pelo organismo (ZINEDINE et al., 2007). No entanto, a biotransformação da ZEA resulta em alguns metabólitos de maior toxicidade que a própria micotoxina (D' MELLO et al., 1999). E o nível de ingestão alimentar pode influenciar

diretamente na taxa de conversão da ZEA e de seus metabólitos pelo tempo de retenção e de contato.

A zearalenona é uma lactona do ácido fenólico resorcíclico com ação estrogênica não esteróide, de atividade metabólica muito alta, porém com baixa toxicidade aguda (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). E tem sido reconhecida como um composto disruptor endócrino (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; FRIZZELL et al., 2011) que interfere na fisiologia dos hormônios endógenos e afeta o sistema reprodutivo de animais e humanos (BERTHILLER et al., 2013).

Os bovinos são considerados mais resistentes aos efeitos adversos da ZEA e de seus metabólitos (DIEKMAN e GREEN, 1992; FINK-GREMMELS, 2008ab; MARCZUK et al., 2012), pois a microbiota ruminal apresenta capacidade de degradar e até mesmo inativar a micotoxina (KALLELA e VASENIUS, 1982; UPADHAYA et al., 2010). Porém, esta capacidade é saturável e varia de acordo com a dieta, o regime alimentar e os distúrbios metabólicos apresentados (FINK-GREMMELS, 2008ab; KHATOON et al., 2012). As fêmeas bovinas são mais sensíveis do que os machos, e sinais hiperestrogênicos são induzidos (AGAG, 2004; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008; WEAVER et al., 1986ab) variando de acordo com a categoria e o estado reprodutivo.

Uma vez que as dietas podem estar contaminadas com ZEA, a possibilidade de diminuir a exposição é mediante a adoção de estratégias de descontaminação como a inclusão de agentes detoxificantes nas dietas. O uso de aditivo anti-micotoxina (AAM) como medida corretiva tem sido amplamente utilizado (DEVREESE et al., 2013; DÖLL e DÄNICKE, 2011; RAMOS et al., 1996) pois estes devem ser capazes de adsorver as micotoxinas, reduzindo a absorção e a distribuição pelo organismo, logo sendo eliminados.

Os aditivos anti-micotoxina à base de bentonita modificada são constituídos principalmente por argilominerais como a montmorilonita (EISENHOUR e BROWN, 2009).

A bentonita é considerada um aluminossilicato, que possui capacidade de expansão quando em presença de líquidos, e de forma geral são partículas muito finas, com elevada carga e área superficial e também alta capacidade de troca catiônica. A superfície hidrofílica de alguns AAM, é menos efetiva em adsorver micotoxinas de baixa polaridade como a zearalenona (AVANTAGGIATO et al., 2005). Porém, a modificação destes consiste na incorporação de cátions na superfície e permite maior afinidade às moléculas orgânicas hidrofílicas (LEMKE et al., 1998).

Com a intensificação da pecuária nos diferentes sistemas de criação, o aporte nutricional foi incorporado com dietas mais elaboradas e variadas em componentes, visando explorar ao máximo o potencial zootécnico, elevar o desempenho produtivo, e os índices reprodutivos principalmente em novilhas. No entanto, a qualidade das dietas fornecidas e a suscetibilidade à contaminação por ZEA favorece a intoxicação pela exposição diária. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se o aditivo anti-micotoxina à base de bentonita modificada reduziria o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona sob os aspectos clínicos, a ciclicidade e a taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e período de execução

O experimento foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Quaraí (30°23'15" Sul e 56°27'05" Oeste), no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, de agosto a setembro do ano de 2017.

Animais e delineamento

Vinte e quatro novilhas taurinas de corte (n=24) com idade média de 2 anos de idade e $271 \pm 11,14$ Kg de peso corporal foram avaliadas através de exame clínico geral e ginecológico completo. A partir das avaliações, fêmeas que apresentaram-se híginas e cíclicas foram

selecionadas por critérios de homogeneidade (peso corporal e volume vulvar) e distribuídas de forma randomizada por tratamento para compor quatro grupos experimentais com 6 animais cada: T1 – dieta basal (controle), T2 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA, T3 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 2,5 kg/tonelada de AAM e T4 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 5,0 kg/tonelada de AAM.

O experimento teve duração total de 37 dias, sendo 11 dias de período de adaptação (-D11 ao D0), 21 dias de período experimental (D0 ao D20) e 5 dias de período de regressão (D21 ao D25). No período de adaptação, todas as novilhas foram condicionadas ao manejo do experimento recebendo a mesma dieta basal para padronização e protocolo hormonal para sincronização de estro e da ovulação. No período experimental as novilhas receberam a dieta basal incorporada com os tratamentos específicos. E no período de regressão as novilhas receberam a mesma dieta basal de padronização.

O protocolo de sincronização de estro e da ovulação iniciou no -D11 com a aplicação de 2mg de benzoato de estradiol IM (Gonadiol[®], Zoetis) associada a inserção de um pessário intravaginal de progesterona de segundo uso (DIB[®], Zoetis). No -D2 foi administrado 0,6mg de cipionato de estradiol IM (ECP[®], Zoetis), 12,5mg de dinoprost trometamina IM (Lutalyse[®], Zoetis) e 200UI de gonadotrofina coriônica equina IM (Novormon[®], Zoetis) além da remoção do pessário intravaginal. Adicionalmente, todas as novilhas foram marcadas com bastão de cera na base da cauda para identificação de estro. No D0 foi observado a presença de estro através da remoção da tinta na base da cauda e neste dia também iniciou-se o período experimental. A inseminação artificial não foi realizada neste momento, pois o objetivo do protocolo foi sincronizar as fêmeas, para que estas estivessem na mesma fase do ciclo estral.

Manejo e alimentação

As novilhas foram submetidas a condições similares de manejo e alimentação durante todo o experimento, sendo alocadas em campo com área total de 24 ha, mantidas em pastejo

contínuo de gramínea nativa em rebanho único, com livre acesso à água potável. A suplementação da dieta foi realizada em curral apropriado para o manejo de bovinos com 4 partes, o que possibilitou a separação das fêmeas por tratamento, bem como a oferta de 1,8 kg/animal/dia (oferta estimada a 0,7% do peso corporal médio do lote, para ajuste de perda) em comedouros individuais.

Preparo da dieta e dos tratamentos

A elaboração da dieta, a produção e a quantificação da ZEA assim como a incorporação e o preparo dos tratamentos foi efetuado pelo Instituto SAMITEC (Santa Maria/RS, Brasil). O aditivo anti-micotoxina introduzido nos tratamentos foi a base de bentonita modificada.

A composição da dieta basal foi a mesma para os períodos de adaptação, experimental e de regressão. A dieta isonutritiva foi formulada de acordo com as exigências nutricionais da categoria animal seguindo as recomendações do NRC (2016), e composta de 52% de farelo de milho, 25% de farelo de soja, 20% de farelo de trigo e 3% de núcleo premix vitamínico-mineral e sal. Uma amostra homogeneizada foi colhida após o preparo e enviada a um laboratório comercial para verificar a composição do concentrado com energia metabolizável (346,33kcal/100g), fibra bruta (3,59%), gorduras totais (2,80g/100g), matéria seca (89,42g/100g), proteína total (14,71g/100g) e resíduo mineral fixo – cinzas (5,61g/100g).

A zearalenona foi produzida em câmaras de fermentação e os esporos do fungo foram produzidos em ágar batata, cultivados a 25°C por cinco dias. Após o período, os esporos foram lavados com água estéril e solubilizados. Uma alíquota de 1 ml dessa solução foi aplicada ao material de cultura. A incubação compreendeu um período de duas semanas com temperatura de 28°C seguido de outro período de duas semanas com temperatura de 15°C. O material foi seco, triturado, quantificado e estocado a -4°C até a mistura nos tratamentos. Logo após, a quantificação da ZEA nos tratamentos foi efetuada para verificar se os níveis de ZEA encontravam-se dentro do valor esperado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada

a espectrometria de massas (HPLC-MS/MS), com limite de quantificação de 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e coeficiente de recuperação de 89%. As matérias primas utilizadas e os tratamentos também foram avaliados quanto a presença de outras micotoxinas e foram considerados livres.

Avaliações

As avaliações de peso corporal, coleta de sangue, volume vulvar, edema da glândula mamária e ultrassonografia do trato reprodutivo foram realizadas nos dias 0, 5, 10, 15, 20 e 25. O manejo das fêmeas foi conduzido em curral com tronco de contenção próprio para a espécie bovina. O peso corporal foi avaliado por balança eletrônica acoplada ao tronco de contenção.

O volume vulvar foi mensurado com o auxílio de paquímetro, registrando-se as distâncias vertical, horizontal e de profundidade da vulva, sendo que o volume vulvar foi obtido pela multiplicação destas medidas. O edema da glândula mamária foi avaliado por uma escala visual adaptada de HEMKEN et al. (1969), a qual classifica em escore 0 = sem edema, escore 1 = edema leve, escore 2 = edema moderado, escore 3 = edema acentuado e escore 4 = edema severo.

A coleta de sangue foi realizada por punção da veia jugular com sistema acoplado de agulha e tubo a vácuo contendo ativador de coágulo e gel separador. Os tubos permaneceram em repouso por pelo menos 30 minutos e após foram centrifugados a 700 x G por 15 minutos para separação do soro. O soro foi armazenado em microtubos de 2 ml, identificados e conservados a -20°C até o envio para análise. As provas sorológicas para dosagem hormonal de estradiol e progesterona foram analisadas em laboratório especializado através de quimioluminescência.

A ultrassonografia por via transretal com transdutor linear de 5-7,5 MHz avaliou em diferentes planos o trato reprodutivo das novilhas. No útero, a frequência (presença ou ausência) de edema uterino foi avaliada. Os ovários foram monitorados quanto ao número e diâmetro de

folículos e de corpos lúteos, observando o recrutamento e o desenvolvimento das estruturas, formações de cistos e ovulações.

Estação reprodutiva

Após 42 dias do período experimental as novilhas foram submetidas a um protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) para analisar as taxas de concepção após a intoxicação. Todas as novilhas receberam protocolo de sincronização de estro e da ovulação no D67 que consistiu na aplicação de 2mg de benzoato de estradiol IM (Gonadiol[®], Zoetis) associada a inserção de um pessário intravaginal de progesterona 1g (DIB[®], Zoetis). No D74 foi administrado 12,5mg de dinoprost trometamina IM (Lutalyse[®], Zoetis). No D76 foi aplicado 0,6mg de cipionato de estradiol IM (ECP[®], Zoetis), 12,5mg de dinoprost trometamina IM (Lutalyse[®], Zoetis) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina IM (Novormon[®], Zoetis) além da remoção do pessário intravaginal. Adicionalmente, todas novilhas foram marcadas com bastão de cera na base da cauda para identificação do estro. No D78 foi observado a presença de estro através da remoção da tinta na base da cauda. E a Inseminação Artificial (IA) foi efetuada com sêmen de um único touro com fertilidade comprovada de acordo com o descrito pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), sendo que 30 dias após a IA (D108) foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software SAS[®] (versão 9.4, SAS Inst. Inc., Cary, NC). As médias por tratamento de peso corporal, volume vulvar, dosagem hormonal (estradiol e progesterona) e ovários (número e diâmetro de folículos e de corpos lúteos) foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) e a comparação foi efetuada através do Teste de Tukey. Estes dados estão representados pela média \pm desvio padrão e os valores foram considerados significativos quando o valor de $P < 0.05$. No útero, a frequência (presença ou

ausência) de edema uterino foi avaliada e analisada pelo teste de distribuição Qui-Quadrado. O edema da glândula mamária foi ausente, portanto nenhuma análise foi conduzida.

RESULTADOS

As médias de peso corporal foram similares ($P>0.05$) entre os tratamentos (T1, T2, T3 e T4) nos diferentes dias avaliados (0, 5, 10, 15, 20 e 25) (Tabela 1). Não houve edema significativo no volume vulvar ($P>0.05$) entre os tratamentos nos diferentes dias avaliados (Tabela 1). Além disso, o edema da glândula mamária foi ausente (escore 0 = sem edema) em todos os tratamentos nos diferentes dias avaliados.

No útero a frequência (presença ou ausência) de edema uterino (Tabela 2) foi avaliada. No dia 0, todas as novilhas apresentaram edema uterino independente do tratamento (T1, T2, T3 e T4). Já nos dias 5, 10 e 25 o edema uterino foi ausente em todas as novilhas independente do tratamento. Nos dias 15 e 20, o edema uterino ocorreu de forma aleatória entre os tratamentos (T1, T2, T3 e T4). Na avaliação ovariana as médias foram similares ($P>0.05$) entre os tratamentos (T1, T2, T3 e T4), quanto ao número e diâmetro de folículos e de corpos lúteos nos diferentes dias avaliados (0, 5, 10, 15, 20 e 25) (Tabela 3).

A concentração sérica de estradiol foi similar ($P>0.05$) entre os tratamentos (T1, T2, T3 e T4) nos diferentes dias avaliados (0, 5, 10, 15, 20 e 25) (Tabela 4). Na progesterona também não houve diferença significativa ($P>0.05$) entre os tratamentos nos dias avaliados (0, 5, 10, 15 e 25), com exceção do dia 20 ($P=0.03$) em que a concentração de progesterona foi superior no T4 (Tabela 4).

Em relação às taxas de concepção obtidas por IATF após a intoxicação foram obtidos 83% ($n=5/6$) para o T1, 60% ($n=3/5$) para o T2, 67% ($n=4/6$) para o T3, 83% ($n=5/6$) para o T4 e a taxa de concepção geral entre os tratamentos foi de 74% ($n=17/23$) (Figura 1). Ao comparar a taxa de concepção entre os tratamentos observamos que as taxas no T2 e T3 foram semelhantes, mas inferiores ao T1 e T4 que foram similares.

DISCUSSÃO

No período de adaptação todas as novilhas foram condicionadas ao manejo do experimento recebendo a mesma dieta basal e protocolo hormonal para sincronização do ciclo estral. No dia 0 iniciou-se o período experimental, e todas as novilhas independentemente do tratamento apresentaram volume vulvar e edema uterino aumentado, com elevada concentração sérica de estradiol. Sendo esta ocorrência atribuída ao protocolo utilizado no período de adaptação, onde foi administrado 0,6mg de cipionato de estradiol IM (ECP[®], Zoetis) no -D2 para a sincronização de estro e ovulação.

A principal atividade biológica da ZEA e de seus metabólitos é a estrogenicidade (EFSA, 2017), ambos são flexíveis e semelhantes aos estrógenos naturais, e ligam-se de forma competitiva aos receptores estrogênicos (DIEKMAN e GREEN, 1992; FRIZZELL et al., 2011) e desta forma, causam alterações funcionais e morfológicas nos órgãos reprodutivos (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008). O maior potencial estrogênico da ZEA e de seus metabólitos é devido ao mecanismo de ação e ao tempo de permanência no núcleo, quando comparado aos estrógenos naturais (GAUMY et al., 2001). Conseqüentemente, a secreção das células endometriais, a síntese das proteínas locais e o volume dos órgãos reprodutivos serão aumentados (MELO, 2016).

As médias de peso corporal foram similares entre os tratamentos nos dias avaliados. O que está de acordo com a literatura que relata que dietas contaminadas com ZEA em concentrações próximas aos valores de orientação não exercem efeitos negativos nos parâmetros de desempenho como o peso corporal (WINKLER et al., 2014). Ao decorrer das avaliações observamos que todas as novilhas ganharam peso corporal, sendo que a dieta basal formulada, foi a mesma para os períodos de adaptação, experimental e de regressão.

Neste experimento a concentração utilizada de ZEA no T2, T3 e T4 foi de 5 mg/kg. A perda de peso em bovinos foi relacionada a ingestão de ZEA em doses superiores à 10 mg/kg

(FRASER, 1996). No trabalho de PRELUSKY et al. (1990), a ZEA foi incluída na alimentação de 3 vacas leiteiras. As mesmas fêmeas foram utilizadas em três experimentos sucessivos, e previamente ao início e no intervalo um período de desintoxicação de 21 dias foi realizado. No primeiro experimento as fêmeas receberam 50 mg/dia por 21 dias, no segundo experimento 165 mg/dia por 21 dias, já no terceiro experimento o tratamento foi individual, tratamento A (544,5 mg/dia por 21 dias), tratamento B (1800 mg em dose única) e tratamento C (6000 mg em dose única). Similaridade na ingestão da dieta e no ganho de peso corporal foi verificado no primeiro e no segundo experimento, no entanto no terceiro experimento houve redução transitória na ingestão da dieta e foram observados sinais de edema e inflamação vulvar.

Ao avaliar o volume vulvar observamos que o edema no T2 foi superior aos demais tratamentos nos dias avaliados, porém não houve diferença significativa. Vacas leiteiras (n=21) que foram alimentadas com ração produzida a partir de grãos mofados apresentaram efeitos de infertilidade, falso estro, edema vulvar e edema vaginal com secreção, sendo que as concentrações de ZEA variaram de 3,19-9,55 mg/kg nas amostras de ração (ROINE et al., 1971). Deste modo, o efeito de edema vulvar relatado foi em concentrações próximas as utilizadas neste experimento. Este é o primeiro trabalho que dimensiona o volume vulvar em novilhas e, constatamos que o edema de vulva estendeu-se também ao períneo dificultando o dimensionamento pela conformação apresentada.

O edema da glândula mamária foi avaliado por escala visual, e foi ausente em todas as novilhas independente do tratamento e do dia avaliado. A observação visual requer a avaliação por diferentes ângulos, e por muitas vezes o posicionamento do animal interfere nesta. No entanto, doses de ZEA de 1,5-5 mg/kg (BRIDGES et al., 2010) e inferiores a 10 mg/kg (OSWEILER, 1998) foram relatadas como causadoras de edema de glândula mamária em novilhas. Já novilhas pré-púberes (n=2/20) desenvolveram edema de glândula mamária com

atividade secretória ao serem alimentadas com farelo de milho mofado, sem valor de concentração para ZEA identificada (BLOOMQUIST et al., 1982).

A frequência de edema uterino foi avaliada quanto a presença ou ausência. Nos dias 5, 10 e 25 o edema uterino foi ausente em todas as novilhas independente do tratamento, e esta ausência pode ser atribuída a fase do ciclo estral em que as fêmeas encontravam-se. Já nos dias 15 e 20, o edema uterino ocorreu de forma aleatória entre os tratamentos, sendo que no dia 15 ocorreu antecipação do edema uterino nos T2 e T3, e no dia 20 (proestro) o edema uterino ocorreu para o T1 e T4. A presença de edema uterino em fêmeas bovinas pode acarretar em hipertrofia quando as concentrações de ZEA são superiores a 10 mg/kg (FRASER, 1996) e pode também induzir a fibrose e ao carcinoma endometrial em animais (ZINEDINE et al., 2007). Isso ocorre devido a sensibilidade do útero e ao modo de ação da micotoxina, que possui efeito sobre a síntese de proteínas locais, a secreção das células endometriais e no aumento do volume do órgão, sendo a zearalenona considerada uma micotoxina uterotrófica (MELO, 2016).

Na avaliação ultrassonográfica dos ovários esquerdo e direito não houve diferença significativa entre os tratamentos, quanto ao número e diâmetro de folículos e de corpos lúteos nos dias avaliados, demonstrando que a dose de ZEA não afetou estas variáveis durante o período experimental que correspondeu a um ciclo estral. Porém, a oferta de baixas concentrações de zearalenona não pode ser descartada como um contribuinte prejudicial para a atividade estrogênica futura, pois há evidências que efeitos aditivos são exercidos pela ZEA e por seus metabólitos no organismo (MINERVINI et al., 2001). Sendo que, a ZEA é transportada pela circulação sanguínea e atravessa a barreira folicular chegando aos folículos, e cerca de 50% da ZEA detectada no soro também pode ser detectada no fluido folicular (WINKLER et al., 2015). O fluido folicular desempenha um papel fundamental para o desenvolvimento do oócito, e a exposição a ZEA e a seus metabólitos pode afetar a sua competência, pois podem modular o

desenvolvimento folicular induzindo a apoptose das células da granulosa e a atresia dos folículos antrais (FUSHIMI et al., 2015). O estudo de TAKAGI et al. (2008), avaliou a taxa de detecção da ZEA e dos metabólitos α -Zearalenol e β -Zearalenol no fluido folicular de ovários de vacas coletados de abatedouros que foi de 18,8% nos folículos normais com diâmetro 10-20 mm (n=6/32) e de 35% nos folículos císticos com diâmetro maior de 25 mm (n=7/20). Desta forma, 13 das 52 amostras estavam contaminadas e produziram uma taxa de detecção geral de 25%, havendo similaridade entre o diâmetro dos folículos e a concentração da ZEA e dos metabólitos α -Zearalenol e β -Zearalenol nos grupos.

A zearalenona e seus metabólitos são um substrato competitivo para as enzimas hidroxisteróides desidrogenases, presentes em diferentes órgãos e envolvidas na síntese e metabolismo dos hormônios esteróides (FRIZZELL et al., 2011; KUIPER-GOODMAN et al., 1987). A zearalenona e seus metabólitos ao inibirem os hormônios esteróides provocam modificações subsequentes na esteroidogênese ovariana (OLSEN, 1989). E compostos disruptores endócrinos como a ZEA interferem na função das células da granulosa, comprometendo o crescimento normal dos folículos, o desenvolvimento dos oócitos e a sobrevivência do óvulo (PETRO et al., 2012).

A concentração sérica de estradiol foi similar entre os tratamentos nos dias avaliados, e há grande discordância na literatura sobre os níveis de concentração. Em vacas, as concentrações de estradiol são próximas de 1-15 pg/ml, e elevam-se para 5-15 pg/ml durante a fase folicular e na fase luteal regridem para 2-5 pg/ml (MORROW, 1986), sendo que em vacas e novilhas durante a fase luteal também são descritas concentrações de 1-8 pg/ml (ENDO et al., 2012; SPICER e ECHTERNKAMP, 1986). Durante o ciclo estral da fêmea bovina as concentrações de estradiol podem alcançar 25-30 pg/ml (PALMA, 2008), sendo que neste experimento as concentrações variaram próximas a esta descrita.

A concentração sérica de progesterona elevou-se no dia 5 após a ovulação e a formação dos corpos lúteos, e manteve-se elevada pelos dias 10 e 15, mas não houve diferença significativa entre os tratamentos. No dia 20, a concentração de progesterona foi reduzida pela luteólise nos tratamentos, e houve diferença significativa no T4 onde a concentração de progesterona foi superior (1,97 ng/ml). Já no dia 25 as concentrações séricas de progesterona elevaram-se devido a nova ovulação e formação dos corpos lúteos, mas não houve também diferença significativa entre os tratamentos. No experimento de WEAVER et al. (1986b), vacas de leite (n=18) intoxicadas com ZEA (500 mg/dia/animal) por 2 ciclos estrais consecutivos, não apresentaram diferença na concentração sérica de progesterona e também não houve alterações comportamentais e no trato genital. Em vacas, as concentrações de progesterona durante a fase luteal é de 4-20 ng/ml (MORROW, 1986), mas em fêmeas bovinas também são descritas concentrações de 6-7 ng/ml (PALMA, 2008), sendo que neste experimento as concentrações foram próximas a estas.

Após o período experimental, já na estação reprodutiva todas as novilhas deste experimento foram submetidas a um protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) para analisar as taxas de concepção após a intoxicação, sendo que o diagnóstico de gestação por ultrassonografia foi realizado 30 dias após a IA. A taxa de concepção geral neste experimento após a intoxicação foi de 74%, sendo superior a taxa de concepção de 49,77% (n=177/357) do experimento de PINTO et al. (2017) que fizeram uso do mesmo protocolo hormonal e categoria animal em 2 distintas regiões do estado do Rio Grande do Sul. No experimento de WEAVER et al. (1986a), novilhas de leite intoxicadas com ZEA (250 mg/dia/animal) por 3 ciclos estrais, reduziram a taxa de concepção de 87% nas controle (n=18) para 62% nas tratadas (n=18), produzindo uma redução de 25%. Já neste experimento ao comparar a redução da taxa de concepção do T1 para o T2, tivemos uma redução de 23%.

Ao comparar a taxa de concepção após a intoxicação neste experimento, observamos que o T2 e T3 foram semelhantes, mas inferiores ao T1 e T4, sendo que estes dois foram similares entre si. No T2 somente a ZEA estava inclusa na dieta basal, já no T3 a ZEA estava associada a menor dose de aditivo anti-micotoxina (2,5 kg/tonelada), e no T4 a maior dose de aditivo anti-micotoxina (5,0 kg/tonelada), demonstrando que a maior dose foi eficiente em reduzir os efeitos negativos da ZEA após o período experimental. Sendo que em novilhas a taxa de concepção é reduzida com doses inferiores a 10 mg/kg de ZEA (OSWEILER, 1998), já em vacas adultas e cíclicas doses maiores de 10 mg/kg de ZEA são descritas como necessárias para afetar a taxa de concepção (BRIDGES et al., 2010; OSWEILER, 1998).

CONCLUSÃO

O uso de aditivo anti-micotoxina na dose de 5 kg/tonelada reduziu o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona prevenindo que os efeitos da micotoxina afetassem a taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo. A contaminação das dietas com 5 mg/kg de zearalenona não afetou os aspectos clínicos e a ciclicidade durante os dias avaliados nas novilhas, porém reduziu a taxa de concepção.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) sob parecer nº 5706070417. O experimento foi realizado seguindo as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para registro e uso de aditivos anti-micotoxina.

REFERÊNCIAS

- AGAG, B. I. Mycotoxins in foods and feeds 3-zearalenone. **Assiut University Bulletin for Environmental Researches**, v. 7, n. 2, p. 169-176, 2004.
- AVANTAGGIATO, G. et al. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 379-388, 2005.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BERTHILLER, F. et al. Masked mycotoxins: a review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 1, p. 165-186, 2013.
- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 265-282, 2007.
- BLOOMQUIST, C. et al. Zearalenone toxicosis in prepubertal dairy heifers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 2, p. 164-165, 1982.
- BRIDGES, A. et al. Zearalenone concerns in reproducing livestock. **Purdue Extension, Purdue University**, v. 598, n. 1, p. 01-03, 2010.
- D'MELLO, J. P. F. et al. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3, p. 183-205, 1999.
- DEVREESE, M. et al. Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 82, n. 4, p. 181-190, 2013.
- DIEKMAN, M. A.; GREEN, M. L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1615-1627, 1992.
- DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 132-145, 2011.

EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2011. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. **EFSA Journal**, v. 9, n. 6, p. 1-124, 2011.

EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2017. Scientific opinion on the risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, p. 1-123, 2017.

EISENHOUR, D. D.; BROWN, R. K. Bentonite and its impact on modern life. **Elements**, v. 5, n. 2, p. 83-88, 2009.

ENDO, N. et al. Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 3, p. 112-118, 2012.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008b.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84-92, 2008a.

FINK-GREMMELS, J.; MALEKINEJAD, H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 326-341, 2007.

FRASER, C. M. **Manual Merck de veterinária**: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7. ed. São Paulo: Roca, 1996. 2119p.

FRIZZELL, C. et al. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. **Toxicology Letters**, v. 206, n. 2, p. 210-217, 2011.

- FUSHIMI, Y. et al. Effects of dietary contamination by zearalenone and its metabolites on serum Anti-Müllerian Hormone: impact on the reproductive performance of breeding cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n.5, p. 834-839, 2015.
- GAUMY, J. L. et al. Zearalenone: proprietes and toxicite experimentale. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 152, n. 3, p. 217-234, 2001.
- HEMKEN, R. W. et al. Salt and water intake as related to udder edema. **Journal of Animal Science**, v. 28, n. 6, p. 874, 1969.
- KALLELA, K.; VASENIUS, L. The effects of rumen fluid on the content of zearalenone in animal fodder. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 34, n. 10, p. 336-339, 1982.
- KHATOON, A. et al. Ruminal microflora, mycotoxin inactivation by ruminal microflora and conditions favouring mycotoxicosis in ruminants: a review. **International Journal of Veterinary Science**, v. 1, n. 1, p. 37-44, 2012.
- KUIPER-GOODMAN, T. et al. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 253-306, 1987.
- KUMAR, V. et al. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891-905, 2008.
- LEMKE, S. L. et al. Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3789-3796, 1998.
- 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.
- MELO, M. M. Micotoxinas e micotoxicoses. **Revista Leite Integral: Revista Técnica da Bovinocultura de Leite**, v. 84, n. 10, p. 16-20, 2016.
- MINERVINI, F. et al. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on *in vitro* maturation of bovine oocytes and 17 β -estradiol levels in mural granulosa cell cultures. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 4, p. 489-495, 2001.

- 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.
- MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1986. 1143p.
- OLSEN, M. Metabolism of zearalenone in farm animals. In: Chelkowski, J. **Fusarium: mycotoxins, taxonomy, pathogenicity**. Volume 2 in Topics in Secondary Metabolism. Amsterdam: Elsevier, 1989. Cap. 9, p. 167-177.
- OSWEILER, G. D. **Toxicologia veterinária**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 526p.
- PALMA, G. A. **Biología de la reproducción**. 2. ed. Mar del Plata: Rebiotec, 2008. 669p.
- PETRO, E. M. L. et al. Endocrine disruptors and female fertility: focus on (bovine) ovarian follicular physiology. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 1887-1900, 2012.
- PINTO, H. F. et al. Different doses of equine chorionic gonadotropin in FTAI protocol on *Bos taurus* beef heifers: impact on ovarian response, occurrence of estrus and pregnancy rate. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 679, 2017.
- PLACINTA, C. M. et al. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 1, p. 21-37, 1999.
- PRELUSKY, D. B. et al. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. **Journal of Environmental Science and Health: Part B**, v. 25, n. 1, p. 87-103, 1990.
- PRICE, W. D. et al. Naturally occurring toxins in feedstuffs: center for veterinary medicine perspective. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 9, p. 2556-2562, 1993.
- RAMOS, A. J. et al. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 6, p. 631-641, 1996.

ROINE, K. et al. Mycotoxicosis as a probable cause of infertility in dairy cows. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 23, n. 12, p. 628-633, 1971.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 428-451, 1986.

TAKAGI, M. et al. Detection of zearalenone and its metabolites in naturally contaminated follicular fluids by using LC/MS/MS and *in vitro* effects of zearalenone on oocyte maturation in cattle. **Reproductive Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 164-169, 2008.

UPADHAYA, S. D. et al. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 9, p. 1250-1260, 2010.

WEAVER, G. A. et al. Effect of zearalenone on dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 8, p. 1826-1828, 1986b.

WEAVER, G. A. et al. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 6, p. 1395-1397, 1986a.

WINKLER, J. et al. Diagnostic opportunities for evaluation of the exposure of dairy cows to the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN): reliability of blood plasma, bile and follicular fluid as indicators. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 5, p. 847-855, 2015.

WINKLER, J. et al. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed *Fusarium* contaminated maize and their relationships to performance parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, n. 1, p. 196-204, 2014.

ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.

Tabela 1 – Valores (média±desvio padrão) de peso corporal (kg) e volume vulvar (cm³) nos dias de avaliação 0, 5, 10, 15, 20 e 25, de novilhas tratadas com T1 – dieta basal (controle), T2 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA, T3 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 2,5 kg/tonelada de AAM e T4 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 5,0 kg/tonelada de AAM.

Dia de Avaliação	T1 – DB	T2 – DB + ZEA	T3 – DB + ZEA + 0,25% AAM	T4 – DB + ZEA + 0,50% AAM	Valor de P
Peso Corporal (kg)					
0	265,50±10,96	274,66±10,83	270,16±12,99	273,66±10,11	0.50
5	278,00±8,92	286,00±6,48	284,83±14,62	286,83±7,73	0.41
10	283,50±11,16	291,16±5,07	290,16±12,40	291,66±8,95	0.45
15	288,50±11,04	300,66±8,71	295,66±15,37	295,00±8,62	0.34
20	293,00±6,95	306,16±11,51	300,16±12,59	301,00±9,20	0.20
25	299,83±9,45	308,40±5,27	305,16±14,13	305,16±7,80	0.55
Volume Vulvar (cm³)					
0	136,92±3598	136,98±3333	133,03±2430	132,51±1246	0.98
5	122,03±3271	138,57±3886	122,59±2052	124,78±1210	0.71
10	111,60±3568	136,45±4163	109,55±1520	114,52±1197	0.37
15	102,83±3342	141,87±4440	105,33±1982	107,45±1325	0.11
20	111,37±5085	143,39±4523	104,24±3244	118,74±1472	0.34
25	100,23±5097	119,58±1108	92,84±2583	107,15±1590	0.54

Tabela 2 – Valores (média) da frequência (presença ou ausência) de edema uterino (%) nos dias de avaliação 0, 5, 10, 15, 20 e 25, de novilhas tratadas com T1 – dieta basal (controle), T2 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA, T3 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 2,5 kg/tonelada de AAM e T4 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 5,0 kg/tonelada de AAM.

Dia de avaliação	Frequência de edema uterino (%)	T1 – DB	T2 – DB + ZEA	T3 – DB + ZEA + 0,25% AAM	T4 – DB + ZEA + 0,50% AAM
Edema Uterino (%)					
0	+	100% (n=6)	100% (n=6)	100% (n=6)	100% (n=6)
	-	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)
5	+	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)
	-	100% (n=6)	100% (n=6)	100% (n=6)	100% (n=6)
10	+	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)
	-	100% (n=6)	100% (n=6)	100% (n=6)	100% (n=6)
15	+	0% (n=0)	33,33% (n=2)	50% (n=3)	0% (n=0)
	-	100% (n=6)	66,67% (n=4)	50% (n=3)	100% (n=6)
20	+	50% (n=3)	33,33% (n=2)	33,33% (n=2)	83,33% (n=5)
	-	50% (n=3)	66,67% (n=4)	66,67% (n=4)	16,67% (n=1)
25	+	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)
	-	100% (n=6)	100% (n=6)	100% (n=6)	100% (n=6)

*Frequência de edema uterino (%): presença (+) ou ausência (-)

Tabela 3 – Valores (média±desvio padrão) ovarianos quanto ao número e diâmetro de folículos (mm) e de corpos lúteos (mm) nos dias de avaliação 0, 5, 10, 15, 20 e 25, de novilhas tratadas com T1 – dieta basal (controle), T2 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA, T3 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 2,5 kg/tonelada de AAM e T4 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 5,0 kg/tonelada de AAM.

Dia de Avaliação	T1 – DB	T2 – DB + ZEA	T3 – DB + ZEA + 0,25% AAM	T4 – DB + ZEA + 0,50% AAM	Valor de P
Ovários					
Número de Folículos					
0	7,66±3,44	13,00±4,77	11,66±3,83	10,33±5,04	0,20
5	22,16±7,33	22,66±10,76	19,16±5,26	19,00±8,14	0,79
10	16,33±8,33	24,33±24,35	9,16±2,92	13,50±7,84	0,29
15	13,16±6,91	18,50±16,96	9,00±2,09	7,66±3,50	0,21
20	10,33±5,64	16,33±9,22	15,16±9,02	8,33±3,32	0,20
25	10,66±3,93	14,66±12,92	15,00±4,24	10,50±2,58	0,56
Diâmetro de Folículos (mm)					
0	7,39±3,04	7,85±3,47	8,67±2,25	9,05±3,42	0,78
5	5,00±3,55	5,10±2,79	7,32±2,93	6,00±1,77	0,47
10	6,02±3,71	6,56±3,78	9,84±2,95	6,10±2,60	0,17
15	6,35±2,93	6,63±4,79	8,96±1,53	7,74±2,56	0,49
20	7,08±2,13	6,36±2,93	8,64±1,33	7,62±1,26	0,29
25	7,69±1,30	7,02±2,33	8,08±2,57	8,65±2,31	0,63
Diâmetro de Corpos Lúteos (mm)					
0	16,20±0	.	14,65±0	.	.
5	16,49±2,85	16,52±4,27	17,16±4,59	14,77±3,16	0,74
10	17,25±2,74	16,15±3,68	15,21±2,28	15,55±3,99	0,79
15	16,30±3,37	9,85±1,06	14,05±2,46	13,21±1,73	0,09
20	12,98±3,92	15,30±5,37	14,10±3,73	15,71±2,39	0,83
25	12,89±3,37	19,08±1,46	14,83±2,85	18,20±4,37	0,05

Tabela 4 – Valores (média±desvio padrão) de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) nos dias de avaliação 0, 5, 10, 15, 20 e 25, de novilhas tratadas com T1 – dieta basal (controle), T2 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA, T3 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 2,5 kg/tonelada de AAM e T4 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 5,0 kg/tonelada de AAM.

Dia de Avaliação	T1 – DB	T2 – DB + ZEA	T3 – DB + ZEA + 0,25% AAM	T4 – DB + ZEA + 0,50% AAM	Valor de P
Estradiol (pg/ml)					
0	39,20±11,58	44,43±11,36	44,56±8,43	44,58±21,99	0.88
5	31,18±4,36	38,25±13,59	36,08±9,77	31,76±17,04	0.70
10	26,25±7,58	32,68±14,00	32,31±9,86	33,36±18,11	0.76
15	28,73±6,49	30,38±17,08	31,08±7,84	32,42±15,07	0.96
20	27,23±11,00	30,76±13,46	32,23±9,07	29,41±16,84	0.92
25	28,60±10,91	28,46±16,16	33,50±9,10	31,21±17,08	0.90
Progesterona (ng/ml)					
0	1,31±1,15	1,50±1,43	0,74±0,72	1,43±1,35	0.68
5	2,73±1,85	3,22±2,87	3,64±2,01	3,52±1,27	0.87
10	7,14±4,87	8,11±7,17	10,03±5,31	7,38±2,47	0.77
15	5,58±4,27	5,28±5,48	5,22±4,43	5,38±4,37	0.99
20	0,60±0,35 ^b	0,79±0,65 ^{ab}	0,72±0,60 ^{ab}	1,91±1,25 ^a	0.03
25	3,97±3,54	4,67±4,38	5,44±5,22	6,35±4,86	0.82

*Letras diferentes em uma mesma linha diferem entre si (P<0.05, teste de Tukey).

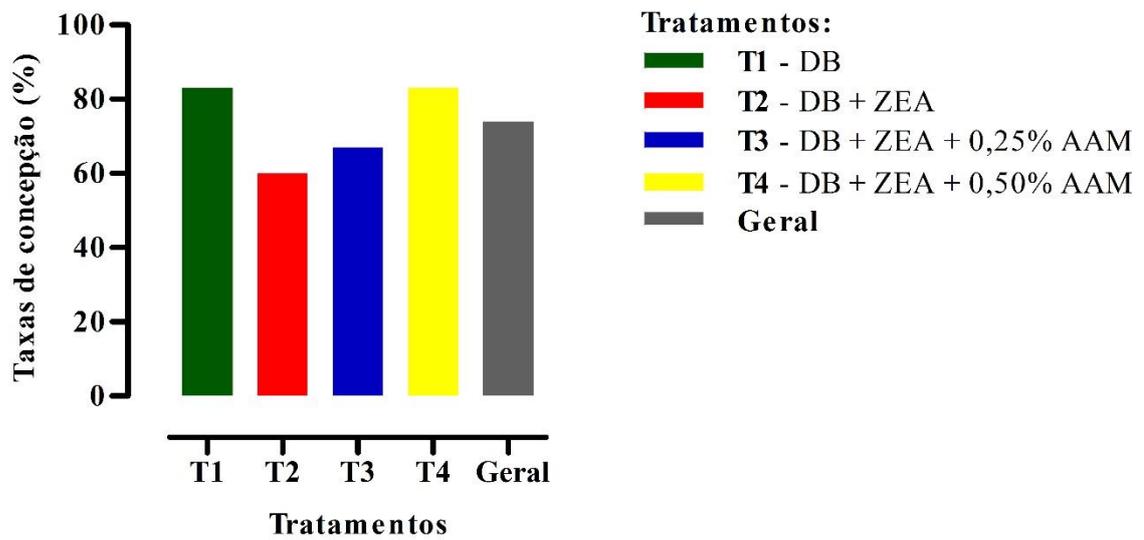


Figura 1 – Taxas de concepção após intoxicação de novilhas tratadas com T1 – dieta basal (controle), T2 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA, T3 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 2,5 kg/tonelada de AAM e T4 – dieta basal + 5 mg/kg de ZEA + 5,0 kg/tonelada de AAM que foram submetidas a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

4 CONCLUSÃO

A contaminação das dietas com 5 mg/kg de zearalenona não afetou os aspectos clínicos e a ciclicidade durante os dias avaliados nas novilhas, porém reduziu a taxa de concepção. O uso de aditivo anti-micotoxina na dose de 5 kg/tonelada reduziu o efeito negativo de dietas contaminadas com zearalenona prevenindo que os efeitos da micotoxina afetassem a taxa de concepção de novilhas taurinas de corte submetidas a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

REFERÊNCIAS

- 2006/576/EC. Commission Recommendation (EU) 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. **Official Journal of the European Union**. L. 229, p. 7-9. 2006.
- ADAMS, G. P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 171-179, 2010.
- AGAG, B. I. Mycotoxins in foods and feeds 3-zearalenone. **Assiut University Bulletin for Environmental Researches**, v. 7, n. 2, p. 169-176, 2004.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011). Resolução RDC N. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de mar. Seção 1, nº 46, p. 66-67.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013). Resolução RDC N. 59, de 26 de dezembro de 2013 que dispõe sobre a prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da RDC n.7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de dez. Seção 1, nº 252, p. 756.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). Resolução RDC N. 138, de 8 de fevereiro de 2017 que altera a RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina desoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de fev. Seção 1, nº 761, p. 45.
- AVANTAGGIATO, G. et al. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 379-388, 2005.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BERTHILLER, F. et al. Masked mycotoxins: a review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 1, p. 165-186, 2013.
- BHAT, R. et al. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57-81, 2010.

BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 265-282, 2007.

BLOOMQUIST, C. et al. Zearalenone toxicosis in prepubertal dairy heifers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 2, p. 164-165, 1982.

BOTTALICO, A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. **Journal of Plant Pathology**, v. 80, n. 2, p. 85-103, 1998.

BRIDGES, A. et al. Zearalenone concerns in reproducing livestock. **Purdue Extension, Purdue University**, v. 598, n. 1, p. 01-03, 2010.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1, p. 134-158, 2012.

BYERLEY, D. J. et al. Pregnancy rates of beef heifers bred either on pubertal or third estrus. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 3, p. 645-650, 1987.

CABRAL, L. C. et al. A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 1-14, 2013.

CORTINOVIS, C. et al. *Fusarium* mycotoxins: effects on reproductive function in domestic animals - a review. **Theriogenology**, v. 80, n. 6, p. 557-564, 2013.

D'MELLO, J. P. F. et al. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3, p. 183-205, 1999.

DÄNICKE, S. et al. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, n. 9, p. 303-315, 2005.

DÄNICKE, S.; WINKLER, J. Invited review: diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, n.1, p. 225-249, 2015.

DE SAEGER, S. et al. Analysis of zearalenone and α -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 487, n. 2, p. 137-143, 2003.

DEVREESE, M. et al. Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 82, n. 4, p. 181-190, 2013.

DIEKMAN, M. A.; GREEN, M. L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1615-1627, 1992.

DINIZ, S. P. S. S. **Micotoxinas**. 1. ed. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2002. 181p. 2002.

DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 132-145, 2011.

DONG, M. et al. The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goats. **Toxicol**, v. 55, n. 2, p. 523-530, 2010.

EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2011. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. **EFSA Journal**, v. 9, n. 6, p. 1-124, 2011.

EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2017. Scientific opinion on the risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, p. 1-123, 2017.

ERASMUSON, A. F. et al. Natural zearalenone (alpha-zearalenol) in the urine of pasture fed animals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2721-2725, 1994.

ERFANI, S. et al. Effect of zearalenone on estrogen receptor, IGF-I and IGF-II genes expression in bovine oviduct epithelial cell culture. **Scientific Journal of Animal Science**, v. 3, n. 5, p. 139-146, 2014.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 203-216, 2003.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008b.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. **Journal Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 115-120, 1999.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84-92, 2008a.

FINK-GREMMELS, J.; MALEKINEJAD, H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 326-341, 2007.

FORTUNE, J. E. et al. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 441-449, 1998.

FORTUNE, J. E. et al. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82, n. 1, p. 109-126, 2004.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FRASER, C. M. **Manual Merck de veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário**. 7. ed. São Paulo: Roca, 1996. 2119p.

- FRIZZELL, C. et al. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. **Toxicology Letters**, v. 206, n. 2, p. 210-217, 2011.
- GAJECKI, M. Zearalenone-undesirable substances in feed. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 5, n. 2, p. 117-122, 2002.
- GAUMY, J. L. et al. Zearalenone: proprietes and toxicite experimentale. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 152, n. 3, p. 217-234, 2001.
- GINTHER, O. J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 75-87, 1997.
- GINTHER, O. J. et al. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.
- GLENN, A. E. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 213-240, 2007.
- HANSEL, W.; CONVEY, E. M. Physiology of the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 2, p. 404-424, 1983.
- HASUNUMA, H. et al. Monitoring natural feed contamination in beef cattle by measurements of urinary zearalenone concentrations after oral administration of mycotoxin adsorbents as a top dressing. **Journal of Applied Animal Research**, v. 39, n. 3, p. 292-295, 2011.
- HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, n. 2, p. 179-188, 2001.
- INSTITUTO SAMITEC. Instituto de Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas, Santa Maria, RS, Brasil. Resultados de análises micotoxicológicas de zearalenona em rações nos anos de 2016 e 2017. Disponível em: <<https://www.samitec.com.br/site/>>. Acesso em: 08 fev. 2018
- IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. **Endocrinology**, v. 112, n. 1, p. 150-156, 1983.
- KALLELA, K.; ETTALA, E. The oestrogenic *Fusarium* toxin (zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 36, n. 9, p. 305-309, 1984.
- KALLELA, K.; VASENIUS, L. The effects of rumen fluid on the content of zearalenone in animal fodder. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 34, n. 10, p. 336-339, 1982.
- KATZENELLENBOGEN, B. S. et al. Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β -resorcylic acid lactones. **Endocrinology**, v. 105, n. 1, p. 33-40, 1979.

KENNEDY, D. G. et al. Zeranol is formed from *Fusarium spp.* toxins in cattle in vivo. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 4, p. 393-400, 1998.

KHATOON, A. et al. Ruminal microflora, mycotoxin inactivation by ruminal microflora and conditions favouring mycotoxicosis in ruminants: a review. **International Journal of Veterinary Science**, v. 1, n. 1, p. 37-44, 2012.

KIESSLING, K. H. et al. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1070-1073, 1984.

KLEINOVA, M. et al. 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, n. 17, p. 4769-4776, 2002.

KNOPF, L. et al. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 111-119, 1989.

KOLOSOVA, A.; STROKA, J. Evaluation of the effect of mycotoxin binders in animal feed on the analytical performance of standardized methods for the determination of mycotoxins in feed. **Food Additives e Contaminants: Part A**, v. 29, n. 12, p. 1959-1971, 2012.

KUIPER-GOODMAN, T. et al. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 253-306, 1987.

KUMAR, V. et al. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891-905, 2008.

LAMIC. Laboratório de Análises Micotoxicológicas, Santa Maria, RS, Brasil. Tabela de recomendações para os limites máximos toleráveis de micotoxinas em alimentos de algumas espécies de animais domésticos, 2018. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/>>. Acesso em: 08 fev. 2018.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Paranaset, 1997. 148p.

LEMKE, S. L. et al. Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3789-3796, 1998.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 131-139, 2007.

MALEKINEJAD, H. et al. Hydroxysteroid dehydrogenases in bovine and porcine granulosa cells convert zearalenone into its hydroxylated metabolites α -zearalenol and β -zearalenol. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 4, p. 445-453, 2006b.

- MALEKINEJAD, H. et al. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 96-102, 2006a.
- MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. 1. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. 238p.
- MAPLETOFT, R. J. et al. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 6, p. 601-611, 2002.
- 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.
- MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.36-49, 2008.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.
- MELO, M. M. Micotoxinas e micotoxicoses. **Revista Leite Integral: Revista Técnica da Bovinocultura de Leite**, v. 84, n. 10, p. 16-20, 2016.
- MILANI, J. M. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 8, p. 405-411, 2013.
- MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.
- MINERVINI, F. et al. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on *in vitro* maturation of bovine oocytes and 17 β -estradiol levels in mural granulosa cell cultures. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 4, p. 489-495, 2001.
- 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.
- MIROCHA, C. J. et al. Detection of a fungal estrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 797-798, 1968.
- MITTERBAUER, R. et al. A sensitive and inexpensive yeast bioassay for the mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 805-811, 2003.
- MORAN, C. et al. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 18, n. 1, p. 167-182, 1989.
- MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 201-212, 2007.
- MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1986. 1143p.

- OLSEN, M. Metabolism of zearalenone in farm animals. In: Chelkowski, J. *Fusarium: mycotoxins, taxonomy, pathogenicity*. Volume 2 in Topics in Secondary Metabolism. Amsterdam: Elsevier, 1989. Cap. 9, p. 167-177.
- OSWEILER, G. D. **Toxicologia veterinária**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 526p.
- PAULUS, D.; PARIS, W. **Técnicas de manejo agropecuário sustentável**. 1. ed. Curitiba: UTFPR, 2016. 329p.
- PFEIFER, L. F.; FERREIRA, R. **Ginecologia e ultrassonografia reprodutiva em bovinos**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 167p.
- PRELUSKY, D. B. et al. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. **Journal of Environmental Science and Health: Part B**, v. 25, n. 1, p. 87-103, 1990.
- RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 8. ed. London: Bailliere Tindall, 1994. 1763p.
- RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. **Acta Endocrinologica**, v. 34, n. 3, p. 7-68, 1960.
- RAMOS, A. J. et al. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 6, p. 631-641, 1996.
- RETANA-MÁRQUEZ, S. et al. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 15, n. 1, p. 129-145, 2012.
- RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. **Toxins**, v. 4, n. 9, p. 663-675, 2012.
- ROINE, K. et al. Mycotoxicosis as a probable cause of infertility in dairy cows. **Nordisk Veterinær Medicin**, v. 23, n. 12, p. 628-633, 1971.
- ROSSI, F. et al. Effects of mycotoxins on fertility of dairy cow. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria Università di Parma**, v. 29, n. 1, p. 153-166, 2009.
- SADLEIR, R. M. F. S. Fortpflanzungszyklen und perioden. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. Fortpflanzungsbiologie der Säugetiere. Pareys Studentexte Band 1. Keimzellen und Befruchtung. 1. ed. Paul Parey: Berlin, 1976.
- SANTINI, A. et al. Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: occurrence in food – a review. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, n. 1, p. 71-81, 2012.
- SANTOS, R. R. et al. Mycotoxins and female reproduction: in vitro approaches. **World Mycotoxin Journal**, v. 6, n. 3, p. 245-253, 2013.
- SAVIO, J. D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988.
- SEELING, K. et al. On the effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 9, p. 847-855, 2005.

SEELING, K.; DÄNICKE, S. Relevance of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol and zearalenone in ruminant nutrition: a review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 14, n. 1, p. 3-40, 2005.

SHIER, W. T. et al. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1435-1438, 2001.

SINDIRAÇÕES. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal, São Paulo, SP, Brasil. Boletim informativo do setor de alimentação animal, maio e dezembro, 2017. Disponível em: <<http://www.sindiracoes.org.br/>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 428-451, 1986.

TAKEMURA, H. et al. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol *in vivo* and *in vitro*. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, n. 2, p. 170-177, 2007.

UPADHAYA, S. D. et al. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 9, p. 1250-1260, 2010.

URRY, W. H. et al. The structure of zearalenone. **Tetrahedron Letters**, v. 7, n. 27, p. 3109-3114, 1966.

WEAVER, G. A. et al. Effect of zearalenone on dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 8, p. 1826-1828, 1986b.

WEAVER, G. A. et al. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 6, p. 1395-1397, 1986a.

WINKLER, J. et al. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed *Fusarium* contaminated maize and their relationships to performance parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, n. 1, p. 196-204, 2014.

ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.